



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

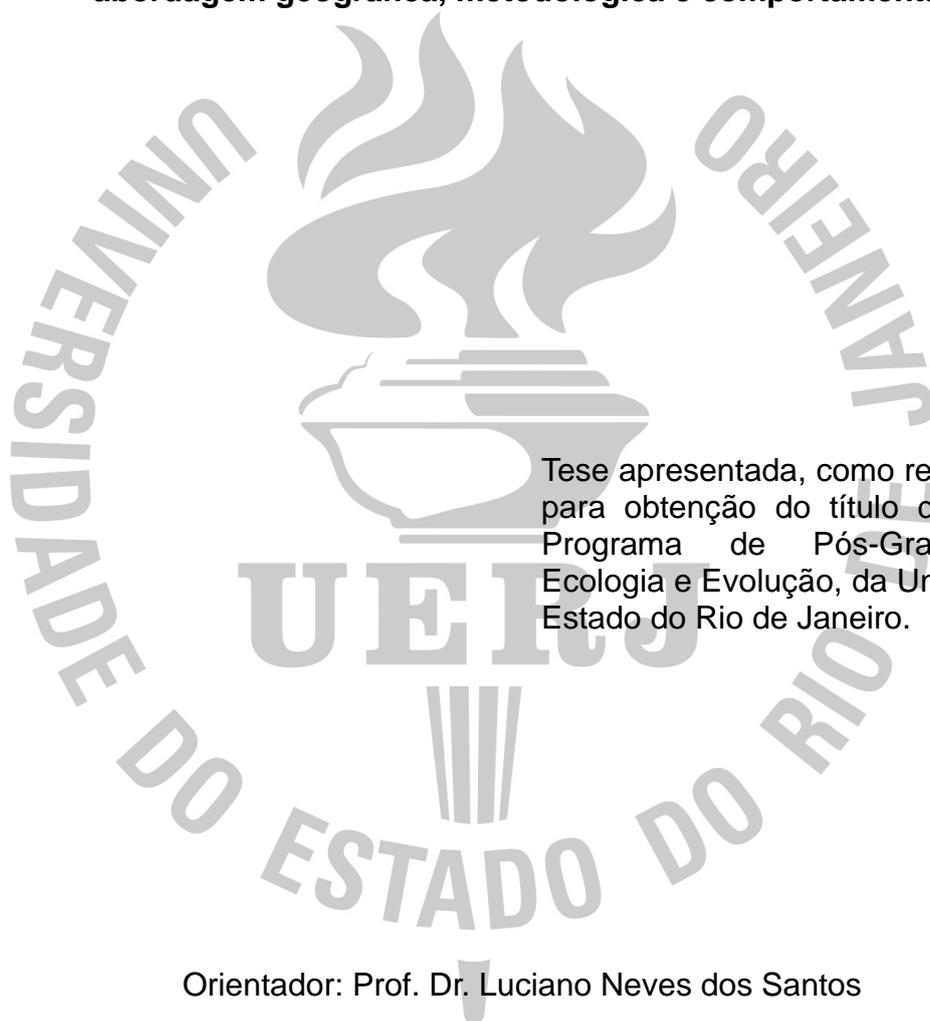
Amanda Vaccani do Carmo

**Biofluorescência do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg,
1933: uma abordagem geográfica, metodológica e comportamental**

Rio de Janeiro
2024

Amanda Vaccani do Carmo

Biofluorescência do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933: uma abordagem geográfica, metodológica e comportamental



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neves dos Santos
Coorientadora: Prof.^a Dra. Natalie Villar Freret Meurer

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C287 Carmo, Amanda Vaccani do.
Biofluorescência do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg,
1933: uma abordagem geográfica, metodológica e comportamental/
Amanda Vaccani do Carmo.– 2024.
91 f. : il.

Orientador: Luciano Neves dos Santos
Coorientador: Natalie Villar Freret Meurer
Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Universidade do
Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara
Gomes.

1. Biofluorescência - Teses. 2. Cavalo-marinho - Teses. I.
Santos, Luciano Neves dos. II. Meurer, Natalie Villar Freret. III.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes. IV. Título

CDU 597.556.255

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte

Assinatura

Data

Amanda Vaccani do Carmo

Biofluorescência do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933: uma abordagem geográfica, metodológica e comportamental

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de agosto de 2024.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Neves dos Santos (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Natalie Villar Freret Meurer (Coorientadora)
Universidade Santa Úrsula – USU

Prof.^a Dra. Maria Alice dos Santos Alves
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Daniela Rodrigues
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof.^a Dra. Mônica Yumi Tsuzuki
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Nilton e Maria Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares por todo amor incondicional, apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Luciano Neves dos Santos pela confiança durante o desenvolvimento dessa pesquisa, pela oportunidade de ampliar meu conhecimento em outras atividades, e experiência.

À minha coorientadora, Dra. Natalie Villar Freret Meurer por fazer parte de toda minha trajetória, por ser uma inspiração, exemplo de dedicação e força, por todo incentivo e por fazer parte da minha vida acadêmica há tantos anos. Obrigada por confiar em mim, no meu trabalho, por me fazer crescer sempre.

Ao Prof. Dr. Vinicius Neres de Lima pela contribuição, dedicação, paciência e por compartilhar seus conhecimentos. Sua expertise foi muito importante para o desenvolvimento de análises fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

Ao MSc. Bruno Piato por embarcar na minha ideia e quebrar meu preconceito com análise de dados. Obrigada por toda disposição, paciência com minhas perguntas, e principalmente por compartilhar seu conhecimento e brilhantismo.

À Tatiane Fernández do Carmo, minha dupla de mergulho e de vida; por dividir comigo tantos momentos, fazer parte da minha trajetória acadêmica e pessoal. Ter você ao meu lado é fundamental para tornar o caminho mais leve.

À equipe do Laboratório de Comportamento Animal e Conservação pelo auxílio nos experimentos, campos, e pelo companheirismo em todos esses anos. Em especial à Gabriela Cabiró pelo apoio e parceria durante tantos anos, e por me lembrar de sorrir até nos momentos mais estressantes.

À equipe do Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada, em especial às minhas amigas Ana Clara Franco, Joice Souza, Marcela Rosa e Vanessa Bettcher, por dividirem tantos momentos de alegria, angústia, mas principalmente por serem ponto de apoio durante esses longos anos.

Às minhas amigas Nayara, Natalia, Juliana e Cynthia pela amizade, amor, incentivo, apoio, e por compreenderem minhas ausências em momentos importantes das suas vidas justificados pela elaboração desta tese.

Agradeço também ao Aurélio Brandão, Maiquel Gomes e Thierry Gregório pela disponibilidade e pelo incansável esforço em me ajudar a resolver os problemas

que surgiram ao longo do desenvolvimento desta tese, assim como pela paciência e pelo apoio.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro pela oportunidade de elaboração deste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação de Ecologia e Evolução da UERJ pelas contribuições na minha formação acadêmica.

À Universidade Santa Úrsula pelo apoio logístico essencial para a elaboração desta tese.

À Fundação de Amparo à pesquisa (FAPERJ) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Maria Alice S. Alves, Profa. Dra. Daniela Rodrigues, Profa. Dra. Mônica Tsuzuki, Profa. Dra. Gisele Lôbo Hajdu, e Prof. Dr. Miguel Correia por dedicarem seu tempo e expertise para avaliar este trabalho e fornecer valiosas contribuições, sugestões e feedbacks.

A todos vocês, meu sincero e profundo agradecimento.

Tenho esperança de que um maior conhecimento do mar, que há milênios dá sabedoria ao homem, inspire mais uma vez os pensamentos e as ações daqueles que preservarão o equilíbrio da natureza e permitirão a conservação da própria vida.

Jacques Cousteau

RESUMO

VACCANI, Amanda do Carmo. *Biofluorescência do cavalo-marinho Hippocampus reidi Ginsburg, 1933: uma abordagem geográfica, metodológica e comportamental*. 2024. 92 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Esta tese aborda a biofluorescência em diferentes contextos, utilizando a espécie *Hippocampus reidi* como modelo. A pesquisa foi dividida em três capítulos principais, onde no primeiro buscou-se por meio de uma pesquisa bibliográfica avaliar a relação entre a distribuição de espécies de peixes ósseos e suas cores de biofluorescência, com ênfase na ordem Syngnathiformes. Os resultados indicaram a distribuição dos padrões biofluorescentes, especialmente a predominância no Oceano Pacífico e a ocorrência de um gradiente latitudinal, com a concentração de espécies biofluorescentes na zona tropical. No capítulo dois, avaliamos três técnicas como ferramentas de análise de imagens de biofluorescência, visando a sugestão de um método para padronização das análises de imagens de biofluorescência para cavalos-marinhos e outros grupos de animais. Nos resultados apresentamos vantagens e desvantagens para cada software testados, levando em consideração o objetivo da análise, o objeto de estudo, e o ambiente onde as imagens são realizadas. Além disso recomendamos um novo *script* elaborado no software *Python* para análise de biofluorescência. Já no terceiro capítulo, utilizamos o método de análise indicado no capítulo anterior para investigar experimentalmente se a biofluorescência exibida pelo cavalo-marinho *H. reidi* funciona como uma resposta para dois contextos com diferentes níveis de ameaça: a inserção de um objeto novo relacionado às diferentes personalidades, e à predação. Nossos resultados não encontraram relação entre o padrão da biofluorescência para as diferentes personalidades de cavalos-marinhos, e nem para o comportamento em relação ao objeto novo, porém nossas descobertas indicam que indivíduos de cavalo-marinho da espécie *H. reidi* utilizam a biofluorescência como resposta ao estresse na predação, onde a cor vermelha ocupa uma maior área de cobertura no corpo do animal. Os resultados obtidos por meio dessa tese nos permitiram compilar dados existentes na literatura sobre biofluorescência até o momento, identificando lacunas e sugerindo que a evolução da biofluorescência pode estar diretamente ligada à evolução das espécies. Identificamos a necessidade de padronização de métodos de análises e recomendamos métodos para futuros estudos. Além disso, dados experimentais revelaram que a biofluorescência pode funcionar como resposta aos níveis de estresse de cavalos-marinhos, e nossos resultados podem servir como material de referência para novos estudos experimentais não só com cavalos-marinhos, mas com outros grupos taxonômicos.

Palavras-chave: comunicação Biológica; emissão de luz; métodos de análise; comportamento Animal; Syngnathiformes.

ABSTRACT

VACCANI, Amanda do Carmo. *Biofluorescence of the seahorse Hippocampus reidi Ginsburg, 1933: a geographic, methodological, and behavioral approach*. 2024. 92 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

This thesis addresses biofluorescence in different contexts, using the species *Hippocampus reidi* as a model. The research was divided into three main chapters. The first chapter aims to evaluate, through a bibliographic review, the relationship between the distribution of bony fish species and their biofluorescent hues, with an emphasis on the order Syngnathiformes. The results indicated the distribution of biofluorescent patterns, particularly the predominance of these patterns in the Pacific Ocean and along the latitudinal gradient, with a concentration of biofluorescent species in the tropical zone. In the second chapter, we evaluated three techniques as tools for biofluorescence image analysis, aiming to propose a method for standardizing biofluorescence image analyses for seahorses and other animal groups. In the results, we presented the advantages and disadvantages of each software tested, considering the analysis objectives, the study subject, and the environment in which the images were captured. Additionally, we proposed a new script in Python for biofluorescence analysis. In the third chapter, we utilized the method suggested in the previous chapter to experimentally investigate whether the biofluorescence exhibited by the seahorse *H. reidi* serves as a response to two contexts with different levels of threat: the introduction of a novel object related to varying personalities and predation. Our results did not find a relationship between the biofluorescence patterns and the different personalities of seahorses, nor in relation to behavior towards the novel object. However, our findings indicate that individuals of the seahorse species *H. reidi* utilize biofluorescence as a response to stress during predation, with the red hue covering a larger area of the animal's body. The data obtained from this thesis allowed us to compile existing literature on biofluorescence, identifying gaps and suggesting that the evolution of biofluorescence may be directly linked to species evolution. We identified the need for standardization of analytical methods and proposed methods for future studies. Furthermore, experimental data revealed that biofluorescence may function as a response to stress levels in seahorses, and our findings can serve as a reference material for new experimental studies, not only with seahorses but also with other taxonomic groups.

Keywords: analysis methods; animal behavior; biological communication. light emission; scientific methodology; Syngnathiformes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Número de artigos publicados por ano sobre biofluorescência em peixes ósseos marinhos.....	23
Figura 2 -	Relação entre as cores de biofluorescência e o número de espécies de peixes ósseos nos diferentes mares do mundo.....	24
Figura 3 -	Distribuição das cores de biofluorescência em diferentes espécies de peixes ao longo do gradiente latitudinal.....	25
Figura 4 -	Distribuição das espécies com biofluorescência por ordem	26
Figura 5 -	Distribuição das espécies de Syngnathiformes com biofluorescência por oceano e cor de biofluorescência descrita.....	27
Figura 6 -	Distribuição das espécies com biofluorescência da ordem Syngnathiformes no gradiente latitudinal e suas colorações.....	27
Figura 7 -	Relação entre o total de espécies descritas e espécies com e sem registros de biofluorescência para as famílias da ordem Syngnathiformes	28
Figura 8 -	Relação entre as espécies descritas e espécies com biofluorescência para o grupo de Syngnathideos	29
Figura 9 -	Mapa da área de estudo onde foram amostrados indivíduos de cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i>	41
Figura 10 -	Proporção média da cor vermelha de biofluorescência para os diferentes números de pontos analisados no cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	45
Figura 11 -	Proporção média da cor verde de biofluorescência para os diferentes números de pontos analisados no cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	45

Figura 12 -	Análise no software PhotoQuad para quantificar a biofluorescência no cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	46
Figura 13 -	Imagem com RGB da cor vermelha para quatro indivíduos de cavalos-marinhos analisados quanto à biofluorescência através do software RStudio com o pacote patternize.....	47
Figura 14 -	Imagem final com máscaras de identificação geradas pelo software Python, para visualização da biofluorescência no cavalo-marinhos <i>Hippocampus reidi</i>	48
Figura 15 -	Mapa da área de estudo onde foram amostrados indivíduos do cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	59
Figura 16 -	Experimento de identificação da personalidade dos cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i> em contexto exploratório.....	61
Figura 17 -	Identificação da personalidade dos cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i> no contexto de neofilia/neofobia.....	61
Figura 18 -	Identificação da personalidade dos cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i> para avaliação de comportamento antipredatório.....	62
Figura 19 -	Experimento de Biofluorescência versus Personalidade em cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i>	63
Figura 20 -	Tratamento do experimento agonístico com cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i>	64
Figura 21 -	Média de biofluorescência vermelha exibida pelos cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i> durante os experimentos controle, objeto novo (T1) e de predação (T2)	69
Figura 22 -	Média de biofluorescência verde exibida pelos cavalos-marinhos <i>Hippocampus reidi</i> durante os experimentos controle, objeto novo (T1) e de predação (T2)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Área de cobertura de cada cor de biofluorescência do cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i> , comparando as três ferramentas de análise	48
Tabela 2 –	Resultados da ANOVA para a cor vermelha de biofluorescência do cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i> , entre os softwares amostrados.....	49
Tabela 3 -	Resultados da ANOVA de medida repetida para a cor vermelha entre o experimento controle e os dois tratamentos. T0: controle, T1: tratamento objeto novo, T2: tratamento agonístico	69
Tabela 4 -	Resultados da ANOVA de medida repetida para a cor verde entre o experimento controle e os dois tratamentos. T0: controle, T1: tratamento objeto novo, T2: tratamento agonístico	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
MMA	Ministério do Meio Ambiente
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	VARIAÇÃO GEOGRÁFICA NOS PADRÕES DE BIOFLUORESCÊNCIA ENTRE PEIXES ÓSSEOS MARINHOS DA ORDEM SYNGNATHIFORMES: UMA REVISÃO	19
1.1	Introdução	19
1.2	Material e métodos	21
1.3	Resultados	22
1.3.1	<u>Distribuição da biofluorescência nos oceanos</u>	24
1.3.2	<u>Biofluorescência e o gradiente latitudinal</u>	25
1.3.3	<u>Biofluorescência em Syngnathiformes</u>	26
1.4	Discussão	29
	REFERÊNCIAS	33
2	O USO DE DIFERENTES FERRAMENTAS PARA ANÁLISE DE BIOFLUORESCÊNCIA: CALIBRANDO OS MÉTODOS DE ANÁLISE	38
2.1	Introdução	38
2.2	Material e métodos	40
2.2.1	<u>Área de estudo</u>	40
2.2.2	<u>Aquisição de imagem</u>	41
2.2.3	<u>Análise das imagens</u>	42
2.2.4	<u>Análise de dados</u>	43
2.3	Resultados	44
2.4	Discussão	49
	REFERÊNCIAS	53
3	BIOFLUORESCÊNCIA COMO RESPOSTA COMPORTAMENTAL EM CAVALOS-MARINHOS: RELAÇÃO ENTRE PERSONALIDADE E DIFERENTES CONTEXTOS	56
3.1	Introdução	56
3.2	Material e métodos	58
3.2.1	<u>Área de estudo</u>	58
3.2.2	<u>Captura dos Animais</u>	59
3.2.3	<u>Experimento para identificação da personalidade</u>	60
3.2.4	<u>Experimentos de biofluorescência</u>	62
3.2.5	<u>Análise de dados</u>	65
3.3	Resultados	66
3.4	Discussão	70
	REFERÊNCIAS	74
4	DISCUSSÃO	78

REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A - Lista de referências obtidas por meio da pesquisa eletrônica sobre a biofluorescência em peixes ósseos. Material suplementar do Capítulo 1 “Variação geográfica nos padrões de biofluorescência entre peixes ósseos marinhos da ordem Syngnathiformes: uma revisão”	84
APÊNDICE B - Script R. Material suplementar do Capítulo 2 “O uso de diferentes ferramentas para análise de biofluorescência: calibrando a confiança de métodos de análise”	87
APÊNDICE C - Script Python. Material suplementar do Capítulo 2 “O uso de diferentes ferramentas para análise de biofluorescência: calibrando a confiança de métodos de análise”	90

INTRODUÇÃO

Os animais frequentemente utilizam displays elaborados para se comunicar com indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes em uma variedade de contextos e por diversas razões. Essas interações intra e interespecíficas podem ser baseadas em troca de informações, o que faz da comunicação uma área essencial do comportamento animal. É amplamente aceito que os sinais animais modulam a tomada de decisão dos receptores das informações (DAWKINS; KREBS, 1978; DAWKINS, 1993; HASSON, 1994; WILEY, 1994; GUILFORD; DAWKINS, 1995; HURD, 1995; HAUSER, 1996; JOHNSTONE, 1997; BRADBURY; VEHRENCAMP, 1998; OWINGS; MORTON, 1998). A comunicação visual possui vantagens por ter propagação instantânea e alta direcionalidade (BRADBURY; VEHRENCAMP, 1998), podendo ser utilizada em diversas situações, como defesa contra predadores, identificação e seleção de parceiros reprodutivos e reconhecimento de indivíduos intraespecíficos (DUSENBERY, 1992; BUCHANAN-SMITH, 2005). Porém, a intensidade e a distribuição do espectro da luz encontrada por um organismo estabelecem limites para a geração e recepção de sinais visuais, fato que se torna especialmente relevantes para organismos aquáticos, pois ambientes aquáticos modificam as características da luz que penetra nesses sistemas (CHIAO et al., 2000). O ambiente fótico subaquático oferece uma oportunidade única para examinar as respostas evolutivas em receptores visuais e variações nas cores corporais em resposta à qualidade espectral da luz do ambiente, especialmente no que tange à utilização dessas estratégias como ferramentas para maximizar os atributos de história de vida das espécies (LEVINE et al., 1980).

Os peixes teleósteos são bons modelos para o estudo de cores e pigmentações, pois abrigam um grande número de células pigmentares, o que pode explicar sua diversidade de cores e padrões (SALIS et al., 2019). Os padrões de cores são um excelente modelo de sistema para entender a evolução, pois são usados durante as interações com parceiros sexuais, sociais, predadores, presas, e ajudam na termorregulação (ENDLER; MAPPE, 2017). Essas cores variam de acordo com cada sistema visual. O espectro visível para humanos está restrito a uma faixa de 380 a 700 nm, porém outros animais são capazes de perceber cores em outras faixas espectrais (PINTO, 2013).

A biofluorescência é um fenômeno não visível para humanos, porém perceptível para muitas espécies de peixes e outros organismos (SIEBECK; MARSHALL, 2000). Este fenômeno é resultante da absorção de radiação eletromagnética em um comprimento de onda, seguido da sua reemissão em um comprimento de onda mais curto ou longo, gerando a emissão de diversas colorações, sendo verde, vermelha e laranja as cores descritas até o momento para os organismos marinhos, podendo ser encontradas em diferentes tonalidades (SPARKS et al., 2014).

Apesar de ser um tema relatado primeiramente para lepidópteros nos anos de 1920 (MOTTRAM; COCKAYNE, 1920; COCKAYNE, 1924), os estudos sobre fenômenos biofluorescentes não se consolidaram até o início da década de 1990, e só recentemente este assunto está sendo reconhecido para determinar a taxonomia em diversos grupos, incluindo plantas (IRIEL; LAGORIO, 2010), corais (SALIH et al., 2000), insetos (VUKUSIC; HOOPER, 2005), anfíbios (LAMB; DAVIS, 2020), e tem sido amplamente difundido para espécies de peixes ósseos (SPARKS et al., 2014). Ainda assim existem muitas lacunas a serem preenchidas sobre a biofluorescência, não somente em relação à história evolutiva, como também sobre o espectro visual, função e outros propósitos associados ao fenômeno (GRAY; KARLSSON, 2022). Até o momento a biofluorescência continua sendo uma parte negligenciada das informações da história natural dos táxons (BRECKO; PAUWELS, 2024).

A biofluorescência pode ser um fenômeno fisiológico e/ou ecologicamente adaptativo em algumas espécies, com impactos específicos, desconhecidos ou insignificantes na aptidão individual (MARSHAL; JOHNSEN, 2017). Essas questões em aberto mostram que a biofluorescência tem grande potencial de investigação (ENDLER; MAPPES, 2017), sendo um dos campos em aberto para conhecimento a biofluorescência em cavalos-marinhos.

O cavalo-marinho é um peixe ósseo da ordem dos Syngnathiformes, que possui diversas características peculiares, incluindo a mudança nos padrões de coloração durante a comunicação. São animais sedentários, crípticos, e os machos realizam a incubação dos filhotes (LOURIE et al., 1999). Ocupam uma diversidade de habitats e se distribuem globalmente, exceto pelos continentes Ártico e Antártico (LOURIE et al., 1999). A espécie *Hippocampus reidi* Ginsburg 1933 apresenta alto grau de vulnerabilidade sendo categorizado como “vulnerável” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas do governo brasileiro (ICMBIO 2018), e categorizada

globalmente como “quase ameaçada” pela lista vermelha da IUCN (OLIVEIRA; POLLON, 2017). Essa espécie possui relatos de biofluorescência (VACCANI et al., 2019) e, por serem animais sedentários, e pequenos, há viabilidade de captura para experimentação e possíveis testes em ambiente controlado, se tornando um bom modelo para elucidar possíveis lacunas levantadas.

Além das lacunas existentes sobre a temática da biofluorescência, a complexidade para registrar (fotograficamente ou por meio de vídeos) diferentes comprimentos de onda, dificulta ainda mais a realização das pesquisas. O registro de imagens é crucial para essa documentação e para dar robustez aos resultados obtidos nos estudos realizados sobre o tema. Além disso, a forma como esses dados fotográficos são analisados também é importante para gerar dados quantitativos e documentar a biofluorescência com precisão. De acordo com Hakanson et al. (2022), alguns protocolos já foram padronizados para essa documentação, porém ainda não foram amplamente adotados pela comunidade científica. Uma discussão sobre os métodos existentes, assim como suas aplicabilidades se fazem necessárias para uma maior aceitação da comunidade e para facilitar a escolha do método adotado.

Identificar os padrões de coloração dos peixes marinhos é importante para ampliar o conhecimento relativo à sua ecologia comportamental, padrões de distribuição, bem como para o desenvolvimento de estratégias eficazes para a conservação destes animais. Desta forma, a presente tese foi elaborada com o intuito de preencher parte das lacunas de conhecimento acerca da biofluorescência, utilizando o cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi*, como modelo de estudo. No primeiro capítulo utilizamos dados disponíveis na literatura científica especializada para avaliar a relação entre a distribuição das espécies de peixes ósseos e a biofluorescência. Nosso objetivo foi investigar a relação entre a distribuição de espécies de peixes e suas cores de biofluorescência, com ênfase na ordem Syngnathiformes, esperando uma maior variedade de padrões biofluorescentes nas espécies encontradas no Oceano Pacífico e na Zona Tropical. No segundo capítulo, buscamos comparar métodos utilizados para analisar a biofluorescência a fim de investigar os melhores usos para cada método e sugerir um novo *script* para avaliar a área de cobertura da biofluorescência em animais vivos e aquáticos, com potencial de aplicação para outros grupos de animais. Por último, no terceiro capítulo investigamos experimentalmente a biofluorescência como

um fator de resposta para dois diferentes contextos apresentados ao cavalo-marinho-do-focinho-longo *H. reidi*. Com base nessas informações, esperamos contribuir para o conhecimento da biofluorescência de maneira geral, sugerindo métodos efetivos para sua avaliação, assim como contribuir para o melhor entendimento de uma função possivelmente explorada não somente pelo cavalo-marinho, mas por diversos outros táxons, ampliando também o conhecimento sobre a biologia e ecologia do cavalo-marinho *H. reidi*.

1. VARIÇÃO GEOGRÁFICA NOS PADRÕES DE BIOFLUORESCÊNCIA ENTRE PEIXES ÓSSEOS MARINHOS DA ORDEM SYNGNATHIFORMES: UMA REVISÃO

1.1 Introdução

Compreender como e por que as espécies estão distribuídas em uma região é um dos temas mais intrigantes na ecologia e biogeografia, sendo frequentemente investigado por pesquisas ecológicas. Além disso, a distribuição das espécies está diretamente ligada às suas características físicas e biológicas. Em escalas geográficas mais amplas, a distribuição dos organismos resulta de efeitos sinérgicos da adaptação das espécies ao ambiente (NEKOLA; WHITE, 1999; TUOMISTO et al., 2003), e de sua diversificação, dependendo de sua capacidade de dispersão (HUBBELL, 2011; WARREN et al., 2014). Reconhece-se que comportamentos adaptativos e a evolução de características podem influenciar diretamente a dinâmica demográfica da diversificação (BOLKER et al., 2003; FLETCHER, 2006; PRICE, 2008).

No ambiente marinho, espera-se que persista um alto nível de homogeneidade genética em grandes áreas, dado que o fluxo gênico é facilitado pela ausência de barreiras à dispersão, em comparação com ambientes terrestres, e pelo enorme potencial de muitas espécies se dispersarem como larvas pelágicas à deriva (PALUMBI, 1992; 1994). Apesar dessas expectativas, uma estruturação genética marcada foi descrita em populações de vários organismos marinhos, mesmo em pequenas distâncias geográficas, e em espécies com larvas pelágicas (COWEN et al., 2006), incluindo espécies de peixes recifais (JONES et al., 1999; TAYLOR; HELLBERG, 2003).

Os peixes recifais constituem um grupo geologicamente recente, cujas principais funções ecológicas foram estabelecidas aproximadamente há 65 milhões de anos, durante o período Cretáceo (RABOSK et al., 2018). As linhagens de peixes recifais têm se diversificado continuamente desde então (FIUZA, 2020), e o consenso atual é de que os peixes recifais marinhos tropicais se originaram no Oceano Pacífico, antes de se espalharem pelo mundo (BARBER; BELLWOOD,

2005; COWMAN; BELLWOOD, 2012; BELLWOOD et al., 2017). Essa radiação adaptativa foi impulsionada e influenciada por uma série de processos e barreiras geográficas, como o evento Terminal Thetiano (BOWEN et al., 2006), que reduziu a dispersão entre os oceanos Pacífico e Atlântico, o fechamento do Istmo do Panamá, que separou o Pacífico Oriental do Atlântico (LESSIOS, 2008), e a Barreira do Pacífico Oriental, que separou o Pacífico Oriental do Indo-Pacífico. Esses processos resultaram em diferenças marcantes na riqueza e na diversidade de espécies de peixes que podem ser observadas entre esses oceanos. O gradiente latitudinal é um padrão que também influencia padrões de diversidade em muitos grupos, incluindo peixes recifais. A diminuição da riqueza de espécies encontrada do equador aos polos, conhecida como gradiente de diversidade latitudinal, é um dos padrões espaciais mais conhecidos da biodiversidade, exibido pelos principais clados de organismos (BUCKLEY et al., 2010; ECONOMO et al., 2018; RABOSKY et al., 2018). As hipóteses "fora dos trópicos" e "velocidade evolutiva" (SIQUEIRA et al., 2016) parecem ser consistentes com os padrões de evolução dos peixes, destacando os trópicos como bons preditores para a diversificação dos peixes.

A grande diversidade de peixes recifais encontrada nos trópicos também se reflete em uma enorme variedade de adaptações, formas e padrões de coloração. Além do espectro de cores visíveis, Michiels et al. (2008) descobriram que alguns peixes marinhos possuem um componente tonal que é visível apenas para outros peixes, um fenômeno conhecido como biofluorescência. Três diferentes cores biofluorescentes, categorizadas de acordo com as cores visíveis aos humanos - vermelho, verde e laranja - foram identificadas até o momento, sendo encontradas individualmente ou em diferentes combinações para diversas espécies. A biofluorescência parece ser um fenômeno difundido tanto em peixes cartilagosos quanto ósseos (SPARKS et al., 2014), sendo mais comum e variável fenotipicamente em espécies marinhas crípticas. Algumas características específicas do espectro de luz visível em ambientes marinhos podem explicar o uso da biofluorescência por certas espécies de peixes. Como os comprimentos de onda mais longos têm menos energia, eles tendem a ser absorvidos nos primeiros metros da coluna d'água, onde a biofluorescência pode ajudar a produzir contrastes visuais por um organismo (SPARKS et al., 2014). A biofluorescência é visível para muitas espécies de peixes que possuem um filtro intraocular amarelo (HEINERMANN,

1984), que potencialmente atua como um filtro de passagem longa, permitindo a visualização de diferentes comprimentos de onda (GRUBER; SPARKS, 2021).

A fluorescência vermelha irregular em todo o corpo é comum em peixes predatórios crípticos que habitam o fundo marinho e permanecem imóveis para emboscar suas presas (ANTHES et al., 2016). A ordem Syngnathiformes engloba uma variedade de peixes que se diversificaram durante o período Cenozoico (STILLER et al., 2022), possuem distribuição circunglobal, com exceção das regiões polares (BRAY, 2018), e características de coloração bem descritas, incluindo biofluorescência em várias espécies (ANTHES et al., 2016; DE BRAUWER et al., 2018; VACCANI et al., 2019). A ordem Syngnathiformes é composta por peixes altamente modificados, distribuídos em dez famílias - Pegasidae, Callionymidae, Dactylopteridae, Draconettidae, Mullidae, Centriscidae, Fistulariidae, Aulostomidae, Solenostomidae e Syngnathidae (STILLER et al., 2022). Neste contexto, o presente estudo avaliou a relação entre a distribuição de espécies de peixes ósseos e suas cores de biofluorescência, com ênfase na ordem Syngnathiformes, esperando uma maior variedade de padrões biofluorescentes nas espécies encontradas no Oceano Pacífico e dentro da Zona Tropical.

1.2 Material e Métodos

O presente estudo baseou-se em uma pesquisa bibliográfica sistemática da literatura nas bases de dados Google Scholar, Web of Science e Scopus, que foram utilizadas para identificar todas as publicações sobre biofluorescência em peixes ósseos marinhos publicadas até 2022, sem restrição de ano de início. As referências encontradas nesses artigos também foram analisadas, na tentativa de identificar publicações adicionais que possam não ter sido incluídas na busca primária.

A busca na literatura foi realizada em dezembro de 2022, utilizando as palavras-chave em inglês "fluorescence" e "fish", com todos os artigos identificados durante a busca sendo avaliados detalhadamente. A pesquisa concentrou-se em todos os artigos que mencionavam a ocorrência de biofluorescência em espécies de peixes ósseos marinhos. Foram excluídos os artigos que não se referiam a espécies de peixes ósseos, ou quando não era sobre biofluorescência. As espécies foram

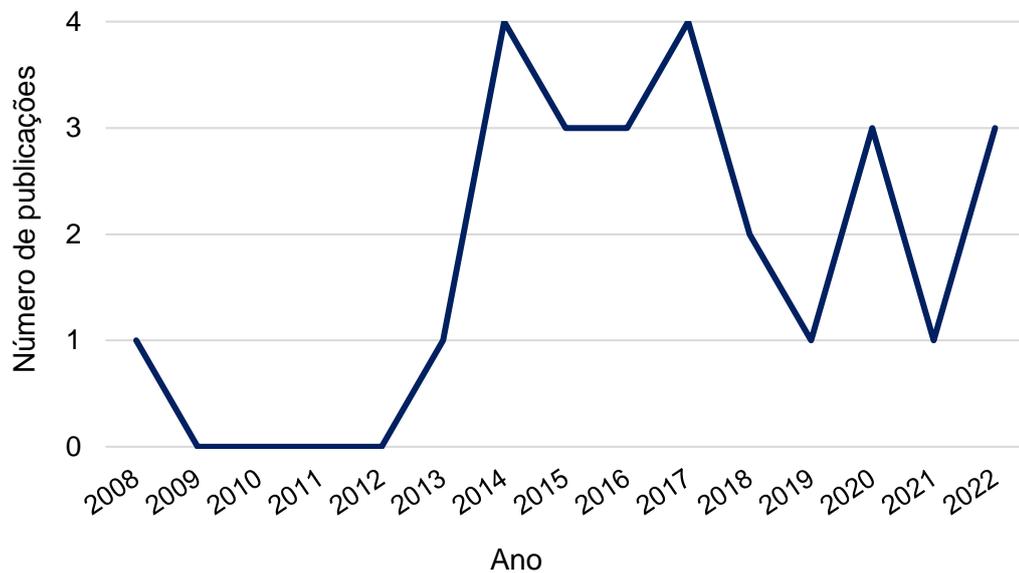
classificadas de acordo com o tipo de coloração de biofluorescência relatada em cada artigo, e quando diferentes estudos relataram padrões de coloração distintos na mesma espécie, mais de um espectro biofluorescente foi considerado. Uma vez que o banco de dados foi completo, as espécies foram classificadas por sua ordem taxonômica, distribuição por oceano e pelo gradiente latitudinal de sua distribuição, e zona de ocorrência de acordo com a plataforma Fishbase.

Como a biofluorescência só é perceptível aos humanos sob condições específicas com o auxílio de ferramentas apropriadas, os diferentes tons são classificados aqui no espectro visível, ou seja, de 400 a 700 nm. Neste caso, comprimentos de onda curtos foram classificados como verde (495-570 nm), a emissão de comprimentos de onda intermediários como laranja (590-620 nm), e comprimentos de onda longos como vermelho (620-750 nm).

1.3 Resultados

Na pesquisa bibliográfica foram identificados 331 artigos, porém apenas 26 dessas publicações continham informações necessárias para os objetivos do presente estudo. O primeiro relato de biofluorescência em peixes ósseos foi publicado em 2008, e nenhum artigo adicional foi publicado até 2013. A partir deste ano, novos artigos têm sido publicados regularmente, com pelo menos um, e até quatro artigos sendo publicados por ano até 2022 (Figura 1.1).

Figura 1 – Número de artigos publicados por ano sobre biofluorescência em peixes ósseos marinhos.



Legenda: Número de artigos sobre biofluorescência em peixes ósseos marinhos publicados por ano entre 2008 e 2022, com base nos resultados da busca na literatura realizada no presente estudo.

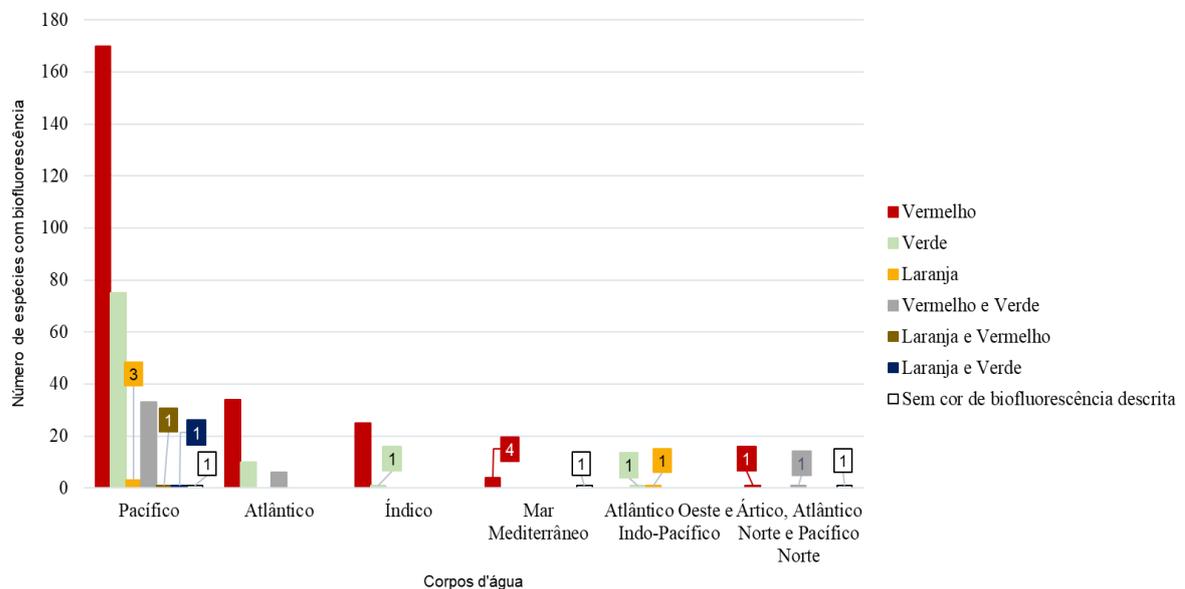
Os 26 artigos aqui analisados detalhadamente relataram biofluorescência, incluindo tons verde, vermelho e laranja, em um total de 370 espécies diferentes de peixes. No total, 142 dessas espécies foram mencionadas em mais de um artigo. Quatro artigos analisaram a biofluorescência em espécimes mortos e vinte e dois artigos a observaram em espécimes vivos.

O vermelho foi a cor de biofluorescência relatada com mais frequência, em 63,24% das espécies ($n = 234$), seguida pelo verde (23,51%, $n = 87$), combinação de vermelho-verde (10,81%, $n = 40$), laranja (1,08%, $n = 4$), e combinações laranja-verde e laranja-vermelho, cada uma relatada em uma única espécie (0,27%). A cor de biofluorescência não foi identificada em três espécies (0,81%).

1.3.1 Distribuição da biofluorescência nos oceanos

A maioria (76,76%) das espécies de peixes biofluorescentes registradas até o momento está localizada no Oceano Pacífico (Figura 1.2), seguido pelos oceanos Atlântico (13,51%) e Índico (7,03%), e o Mar Mediterrâneo (1,35%). Três espécies (0,81%) estão distribuídas nos oceanos Atlântico Ocidental, Indo-Pacífico e Ártico, e duas (0,54%) no Atlântico Norte e Pacífico Norte. A biofluorescência vermelha e verde foram as mais frequentes nos três principais oceanos, representando 60,07% (vermelho) e 26,50% (verde) no Oceano Pacífico, 68% e 20% no Oceano Atlântico, e 98,15% e 3,85% no Oceano Índico, respectivamente, enquanto apenas a biofluorescência vermelha foi registrada no Mar Mediterrâneo (Figura 1.2).

Figura 2 – Relação entre as cores de biofluorescência e o número de espécies de peixes ósseos nos diferentes mares do mundo.

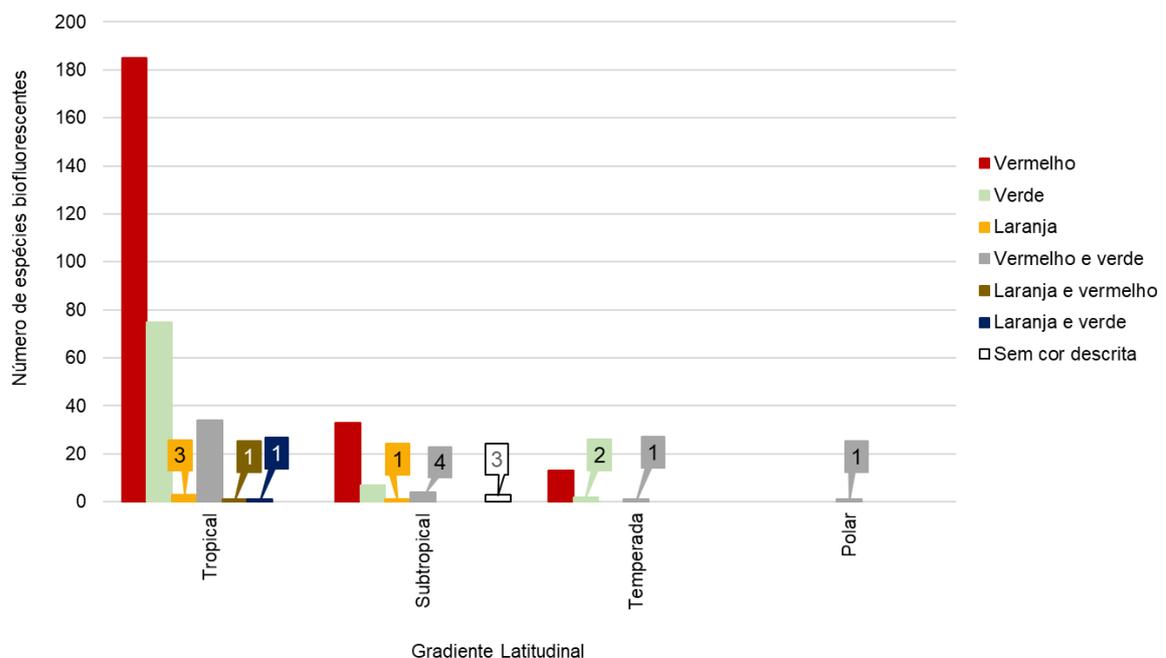


Legenda: Número de espécies de peixes ósseos com as diferentes cores de biofluorescência por distribuição nos diferentes mares.

1.3.2 Biofluorescência e o gradiente latitudinal

Ao longo do gradiente latitudinal (Figura 1.3), a maioria (80,81%) das espécies de peixes biofluorescentes registradas nos artigos identificados no presente estudo é encontrada na região tropical, seguida pelas regiões subtropical (12,97%), temperada (4,32%) e polar (0,27%). A coloração de biofluorescência não foi descrita nos respectivos artigos para seis espécies (1,62%). Mais uma vez, os tons de vermelho e verde predominaram nas diferentes regiões, com a biofluorescência vermelha variando de 61,88% das espécies de peixes na região tropical, a 68,75% na região subtropical e 81,25% na zona temperada (Figura 1.3). A cor verde, por outro lado, foi mais frequente na região tropical (25,08% das espécies), declinando para 4,17% na região subtropical e 12,5% na zona temperada.

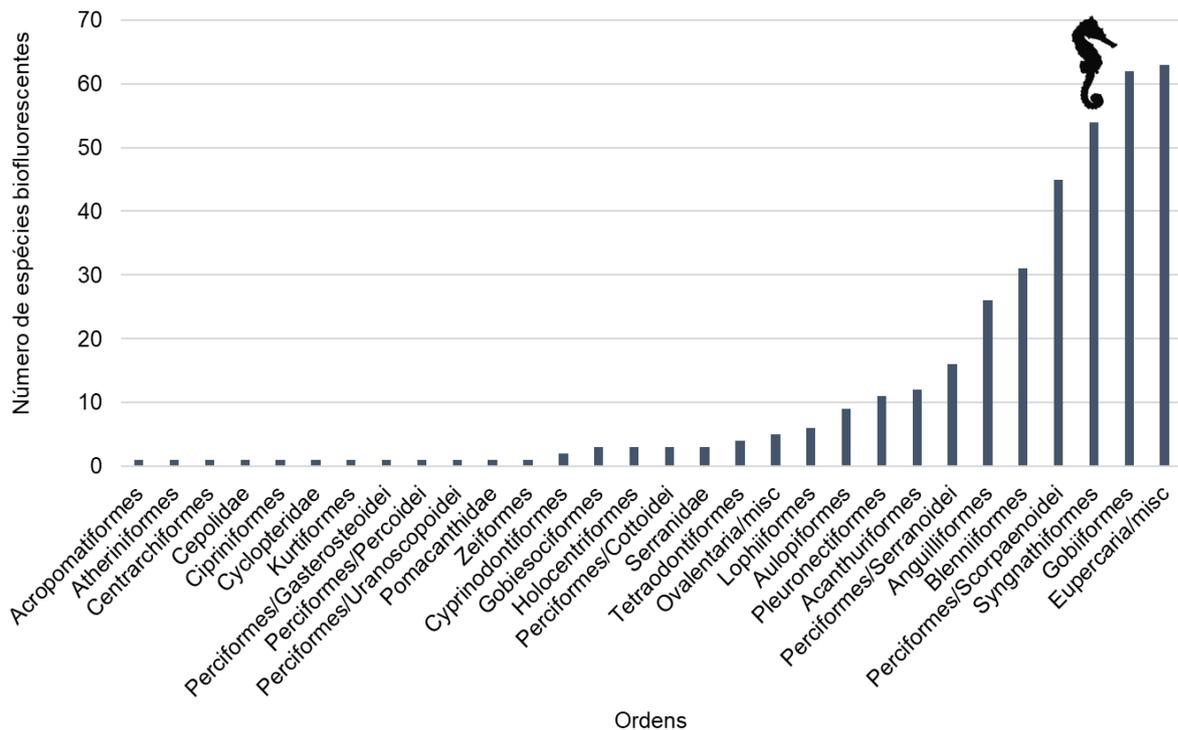
Figura 3 – Distribuição das cores de biofluorescência em diferentes espécies de peixes ao longo do gradiente latitudinal.



Legenda: Relação entre as cores de biofluorescência e o número de espécies de peixes ósseos ao longo dos gradientes latitudinais

A biofluorescência foi registrada em 30 ordens diferentes de peixes ósseos (Figura 1.4), embora mais de 60% das espécies aqui identificadas pertençam a quatro ordens principais: Eupercaria ($n = 63$ espécies), Gobiformes ($n = 62$), Syngnathiformes ($n = 54$) e Perciformes/Scorpaenoidei ($n = 45$).

Figura 4 - Distribuição das espécies com biofluorescência por ordem.

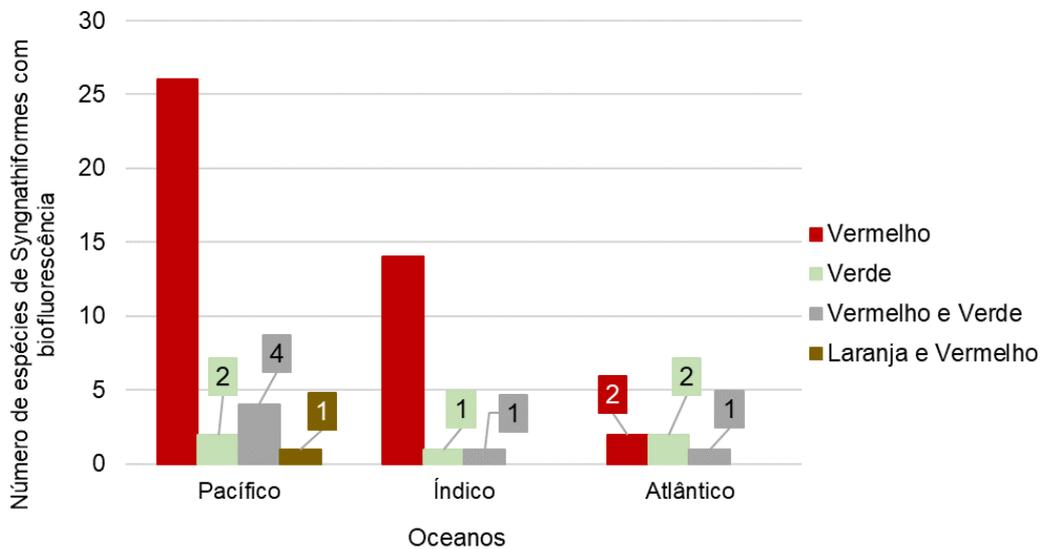


Legenda: Número de espécies biofluorescentes identificadas no presente estudo por ordem de peixes ósseos.

1.3.3 Biofluorescência em Syngnathiformes

A ordem Syngnathiformes é uma das ordens mais ricas em espécies biofluorescentes registradas até o momento. A maioria (61,11%) dessas espécies é encontrada no Oceano Pacífico, seguida pelos oceanos Índico (29,63%) e Atlântico (9,26%) (Figura 1.5).

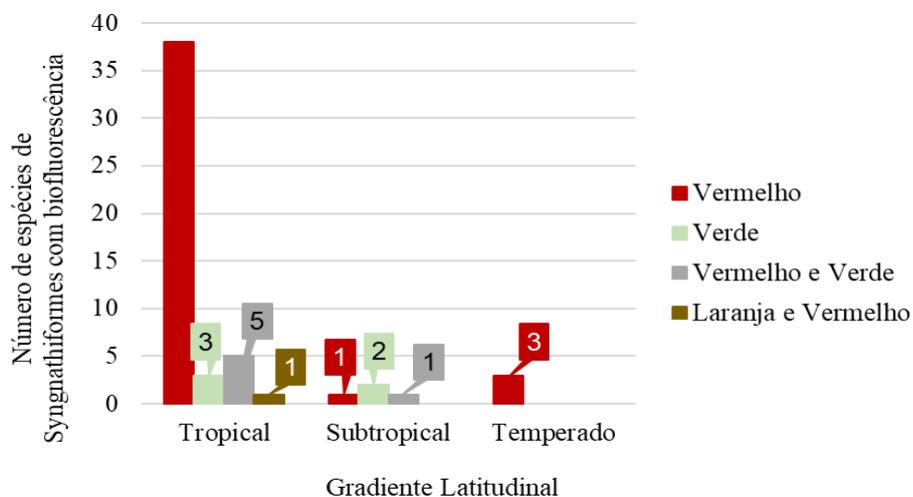
Figura 5 – Distribuição das espécies de Syngnathiformes com biofluorescência por oceano e cor de biofluorescência descrita.



Legenda: Distribuição das espécies de Syngnathiformes biofluorescentes entre os três principais oceanos.

As espécies de peixes biofluorescentes da ordem Syngnathiformes ($n = 54$) foram registradas principalmente (87,04%) na zona tropical (Figura 1.6), com apenas algumas espécies encontradas nas zonas subtropical (7,41%) e temperada (5,56%).

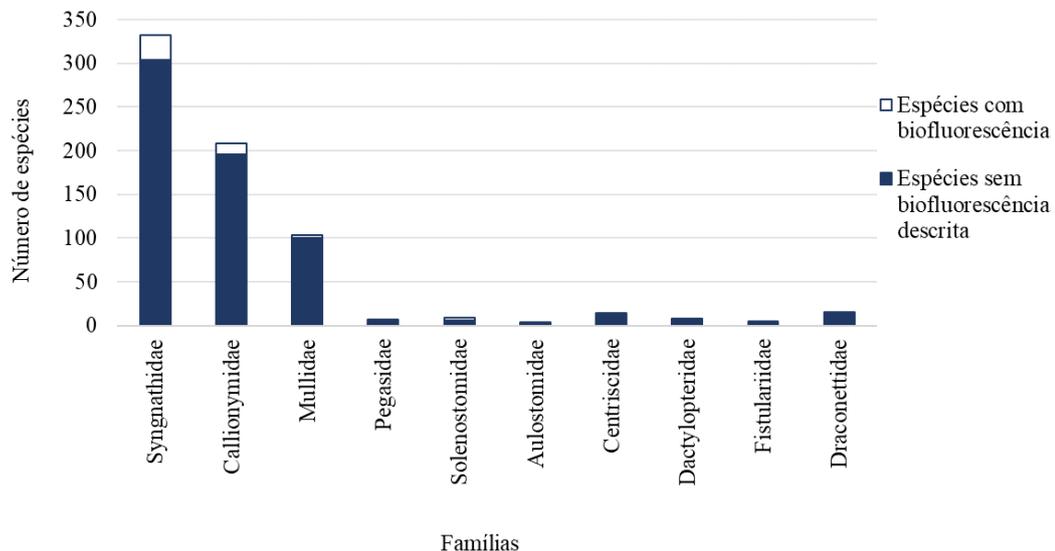
Figura 6 - Distribuição das espécies com biofluorescência da ordem Syngnathiformes no gradiente latitudinal e suas colorações.



Legenda: Distribuição das espécies biofluorescentes da ordem Syngnathiformes ao longo do gradiente latitudinal.

A maioria (51,85%; n=28) das espécies biofluorescentes de Syngnathiformes identificadas até o momento pertence à família Syngnathidae (Figura 1.7), seguida pela Callionymidae (24,07%; n= 13), Mullidae (7,41%; n= 4), Solenostomidae (5,56%; n= 3) e Centriscidae (3,70%; n= 2), enquanto as famílias Aulostomidae, Dactylopteridae, Fistulariidae e Pegasidae foram representadas por uma única espécie cada (1,85%; n=1 para cada família). A Draconettidae é a única família de Syngnathiformes sem espécies com biofluorescência conhecidas até o momento.

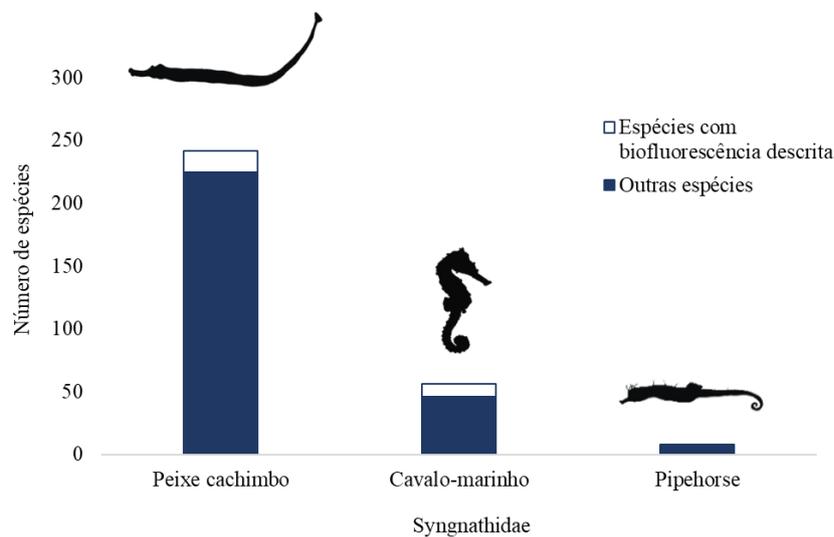
Figura 7 – Relação entre o total de espécies descritas e espécies com e sem registros de biofluorescência para as famílias da ordem Syngnathiformes.



Legenda: Número de espécies com e sem biofluorescência descrita por família da ordem Syngnathiformes.

A maioria (60,71%; n=17) das espécies biofluorescentes da família Syngnathidae é representada pelos peixes-cachimbo (Figura 1.8), enquanto pouco mais de um terço (35,71%; n=10) corresponde aos cavalos-marinhos, e 3,57% (n=1) aos *pipehorses*.

Figura 8 – Relação entre as espécies descritas e espécies com biofluorescência para o grupo de Syngnathideos



Legenda: Número de espécies biofluorescentes nos diferentes grupos da família Syngnathidae.

1.4 Discussão

A biofluorescência foi descrita pela primeira vez para peixes ósseos em 2008, e desde então muito poucos estudos foram publicados sobre este tema. Claramente, a temática ainda é muito recente e requer mais pesquisas e investigações sistematizadas. Como a percepção de cor é um fenômeno subjetivo, o comprimento de onda da fluorescência foi considerado em termos do espectro visível aos humanos no presente estudo, sendo que comprimentos de onda longos representam a cor vermelha, comprimentos de onda intermediários representam cores alaranjadas e comprimentos de onda curtos representam a cor verde. Até agora, essas três cores - vermelha, verde e laranja - foram descritas em peixes ósseos, as quais são encontradas individualmente ou em combinações de pares em diferentes espécies (SPARKS et al., 2014).

Os resultados do presente estudo indicam que o vermelho é a cor de biofluorescência mais comum em peixes ósseos, embora em configurações

variadas. Pistas importantes sobre a função ecológica da cor vermelha podem ser encontradas na anatomia e fisiologia dos peixes que apresentam essa característica. Por exemplo, alguns estudos identificaram que espécies de peixes possuem uma retina com sensibilidade espectral à cor vermelha, incluindo algumas espécies da ordem Syngnathiformes (MOSK et al., 2007). Wucherer e Michiels (2012) também descobriram que algumas das células que emitem biofluorescência vermelha são controladas pelo sistema nervoso, e Kalb et al. (2015) mostraram que o peixe ósseo *Tripterygion delaisi* pode perceber sua própria fluorescência, o que permite o reconhecimento intraespecífico. No entanto, o espectro de luz visível equivalente ao vermelho é de baixa energia e possui um comprimento de onda longo, o que restringe sua penetração em ambientes marinhos abaixo de profundidades de 10 a 15 metros (MICHIELS et al., 2008). Essa característica pode tornar as espécies com tonalidades vermelhas mais facilmente identificáveis pelos pesquisadores, o que pode ser a razão para o número relativamente grande de registros de biofluorescência nesses peixes.

O verde é a segunda cor de biofluorescência mais comum em peixes ósseos, conforme relatado na literatura. Esta coloração possui um comprimento de onda mais curto e se propaga melhor em maiores profundidades. O verde foi identificado em áreas específicas do corpo, como as nadadeiras e listras de alguns peixes, embora em algumas espécies esteja restrito aos olhos. Sabe-se que a fluorescência verde é usada por alguns peixes para atrair presas (HADDOCK et al., 2015), como descrito no peixe-sapo estriado, *Atennarius striatus*, por De Brauwer e Hobbs (2016). No entanto, a escassez de dados sobre biofluorescência limita o potencial para uma análise mais conclusiva da função da biofluorescência em diferentes grupos de peixes. Neste caso, embora algumas funções tenham sido descritas e discutidas, a presença de biofluorescência em uma determinada espécie não necessariamente implica em uma função específica, mas a confirmação dessas funções ecológicas sugere que podem favorecer a evolução da coloração biofluorescente em muitas espécies.

Os padrões de biofluorescência observados no presente estudo foram amplamente semelhantes nos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico, sendo que apenas a combinação laranja-vermelha é exclusiva do oceano Pacífico para todos os peixes ósseos. Era esperada uma maior diversificação de padrões de biofluorescência no oceano Pacífico, devido à história evolutiva dos peixes recifais

(COWMAN; BELLWOOD, 2013), embora a evolução de uma característica dependa de uma interação complexa de mecanismos que inclui fisiologia, anatomia e comportamento, os quais podem se tornar mais ou menos vantajosos, dependendo do contexto ecológico. O fato de que a combinação de cores laranja-vermelha tenha sido relatada exclusivamente no Pacífico pode fornecer uma visão importante sobre a evolução da biofluorescência, especialmente considerando que os resultados do presente estudo apontam para um contexto evolutivo, com uma maior diversificação de cores e combinações encontrada na região do Pacífico.

Até o momento, o maior número de espécies de peixes ósseos biofluorescentes foi encontrado na região tropical. Isso inclui combinações de cores como laranja-verde e laranja-vermelho, o que indica que essa diversidade pode estar relacionada com a maior diversificação de espécies encontradas na zona tropical. A hipótese da "velocidade evolutiva" apoia essa conclusão, dado a relação positiva observada entre a diversidade genética e a temperatura do mar, baseado no pressuposto de que temperaturas mais elevadas promovem taxas metabólicas e de mutação mais altas, o que por sua vez promove a diversificação genética e eventualmente, a especiação (FINE, 2015). A hipótese "fora dos trópicos" também sustenta que as linhagens tendem a se originar nos trópicos, onde se diversificam em massa, e depois se dispersam para regiões temperadas, o que explicaria a presença das cores vermelho e verde mais comuns em latitudes mais altas (ROLLAND et al., 2014). Tittensor et al. (2010) e Chaudhary et al. (2016) relataram que a temperatura do mar é um preditor significativo da biodiversidade marinha, incluindo a diversidade de peixes. Os resultados do presente estudo apoiam a hipótese de que os peixes ósseos das regiões tropicais passaram por uma maior diversificação de estratégias de biofluorescência, o que é sustentado pelas duas hipóteses mencionadas anteriormente.

As comunidades de peixes marinhos tropicais abrangem múltiplas interações ecológicas, que são consideradas importantes impulsionadoras da diversificação de espécies (STUART-SMITH et al., 2013; LOBATO et al., 2014). Algumas dessas interações já foram vinculadas à biofluorescência, como no caso das interações entre machos da espécie *Cirrhilabrus solorensis* (WARRANT; LOCKET, 2004), ou no caso de tubarões que exibem padrões corporais fluorescentes sexualmente dimórficos (GRUBER et al., 2016). Esses achados destacam como a biofluorescência pode desempenhar um papel importante na ecologia marinha, e

como sua evolução pode estar ligada à diversificação e especialização das espécies em seus habitats. Vale ressaltar que a escassez de estudos nas regiões polares provavelmente está relacionada aos desafios de amostragem nesses ambientes, especialmente por mergulho em temperaturas extremamente baixas.

A biofluorescência é um fenômeno generalizado tanto em peixes ósseos quanto em peixes cartilagosos (SPARKS et al., 2014). Os estudos identificados na presente busca na literatura relatam a existência de espécies biofluorescentes em 30 ordens de peixes ósseos. A fluorescência é mais fácil de detectar em peixes pequenos e criptobênticos, o que pode ter influenciado nos números de espécies registradas em algumas ordens. Os Syngnathiformes foram a ordem com o terceiro maior número de espécies biofluorescentes. Syngnathiformes são encontrados em todas as regiões, exceto na zona polar (DAWSON, 1985). Esta ordem teve sua origem no Mar Tétis (STILLER et al., 2022), antes da separação dos continentes (HOU; LI, 2018), e se dispersou inicialmente para o Oceano Índico-Pacífico Central (RENEMA et al., 2008).

O presente estudo registrou espécies biofluorescentes de Syngnathiformes em todos os oceanos onde essa ordem é encontrada, indicando uma ampla distribuição de biofluorescência neste grupo. Mais uma vez, a maior diversidade de cores e a predominância de registros no Oceano Pacífico são consistentes com a origem da ordem e sua maior diversidade atual. Embora os Syngnathiformes sejam encontrados em águas tanto tropicais quanto temperadas, mais espécies biofluorescentes foram relatadas em ambientes tropicais, onde a diversidade de espécies é maior, o que também apoia as hipóteses da “velocidade evolutiva” e “fora dos trópicos”.

A ordem Syngnathiformes é composta por dez famílias, e espécies biofluorescentes foram registradas em nove dessas famílias. A família Syngnathidae é a que possui o maior número de espécies biofluorescentes. Os dragões-do-mar (Draconettidae) são o único grupo de Syngnathiformes em que a biofluorescência ainda não foi registrada, possivelmente porque esses peixes são encontrados apenas na Austrália, onde os estudos com biofluorescência ainda são escassos. Os cavalos-marinhos (Syngnathidae) têm o maior número de espécies biofluorescentes, embora o grupo dos peixes-cachimbo seja o mais diversificado em termos de espécies.

Os achados do presente estudo reforçam a hipótese de que a evolução da biofluorescência em peixes ósseos reflete processos adaptativos. A distribuição dos padrões biofluorescentes, especialmente a predominância no Oceano Pacífico e o gradiente latitudinal, com a concentração de espécies biofluorescentes na zona tropical, apoia as hipóteses "fora dos trópicos" e "velocidade evolutiva". No entanto, é necessário reconhecer as limitações do presente estudo, uma vez que a busca na literatura não distinguia entre estudos nos quais a fluorescência era visível sem excitação artificial e aqueles nos quais a excitação por meio de filtros e lanternas era necessária. Isso pode ter uma influência significativa na capacidade de distinguir tons de cor em determinadas profundidades. Já que a cor tem uma função ecológica importante nos peixes (MARSHALL et al., 2015), a biofluorescência pode também desempenhar papéis ecológicos ou comportamentais fundamentais em diferentes grupos de peixes, porém futuros estudos são necessários para avaliar se a biofluorescência desempenha um papel vantajoso para os organismos, ou se é um sinal filogenético que foi mantido ao longo da evolução. O presente estudo também mostrou que a ordem Syngnathiformes é um bom modelo para futuras pesquisas, uma vez que compreende um grupo de pequenos peixes criptobênticos capazes de detectar comprimentos de onda biofluorescentes, com um grande número de táxons biofluorescentes conhecidos distribuídos em muitas regiões costeiras.

REFERÊNCIAS

- ANTHES, Nils et al. Diversity and ecological correlates of red fluorescence in marine fishes. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 126, 2016.
- BARBER, Paul H.; BELLWOOD, David R. Biodiversity hotspots: evolutionary origins of biodiversity in wrasses (*Halichoeres*: Labridae) in the Indo-Pacific and new world tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 1, p. 235-253, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.004>.
- BELLWOOD, David R.; GOATLEY, Christopher HR; BELLWOOD, Orpha. The evolution of fishes and corals on reefs: form, function and interdependence. **Biological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 878-901, 2017. <https://doi.org/10.1111/brv.12259>.

- BOLKER, Benjamin et al. Connecting theoretical and empirical studies of trait-mediated interactions. **Ecology**, v. 84, n. 5, p. 1101-1114, 2003.
- BRAY, D. J. Seahorses, pipefishes, Syngnathiformes in Fishes of Australia. Accessed on 28 Dec 2022. Available at: <<https://fishesofaustralia.net.au/home/order/18>>.
- BUCKLEY, Lauren B., T. Jonathan Davies, David D. Ackerly, Nathan JB Kraft, Susan P. Harrison, Brian L. Anacker, Howard V. Cornell et al. Phylogeny, niche conservatism and the latitudinal diversity gradient in mammals. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 277, no. 1691 (2010): 2131-2138.
- CHAUDHARY, Chhaya; SAEEDI, Hanieh; COSTELLO, Mark J. Bimodality of latitudinal gradients in marine species richness. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 9, p. 670-676, 2016.
- COWMAN, Peter F.; BELLWOOD, David R. The historical biogeography of coral reef fishes: global patterns of origination and dispersal. **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 2, p. 209-224, 2013. <https://doi.org/10.1111/jbi.12003>.
- COWEN, R. K.; PARIS, C. B.; SRINIVASAN, A. Scaling of connectivity in marine populations. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 522-527, 2006.
- DE BRAUWER, Maarten; HOBBS, Jean-Paul A. Stars and stripes: biofluorescent lures in the striated frogfish indicate role in aggressive mimicry. **Coral Reefs**, v. 35, n. 4, p. 1171-1171, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1493-1>.
- DE BRAUWER, Maarten et al. Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. **Conservation Biology**, v. 32, n. 3, p. 706-715, 2018. <https://doi.org/10.1111/cobi.13033>.
- DAWSON, Charles E. Indo-pacific pipefishes (Red Sea to the Americas). 1985.
- ECONOMO, Evan P. et al. Macroecology and macroevolution of the latitudinal diversity gradient in ants. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1778, 2018.
- FINE, Paul VA. Ecological and evolutionary drivers of geographic variation in species diversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, n. 1, p. 369-392, 2015.
- FIUZA, T. M. J. Distribuição geográfica promovendo a divergência de padrões de cores em peixes recifais. Brasil, 2020.
- FLETCHER JR, Robert J. Emergent properties of conspecific attraction in fragmented landscapes. **The American Naturalist**, v. 168, n. 2, p. 207-219, 2006.
- GRUBER, David F. et al. Biofluorescence in catsharks (Scyliorhinidae): fundamental description and relevance for elasmobranch visual ecology. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24751, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24751>.

- GRUBER, David F.; SPARKS, John S. First report of biofluorescence in Arctic snailfishes and rare occurrence of multiple fluorescent colors in a single species. **American Museum Novitates**, v. 2020, n. 3967, p. 1-12, 2021.
- HADDOCK, Steven HD; DUNN, Casey W. Fluorescent proteins function as a prey attractant: experimental evidence from the hydromedusa *Olindias formosus* and other marine organisms. **Biology open**, v. 4, n. 9, p. 1094-1104, 2015. <https://doi.org/10.1242/bio.012138>.
- HEINERMANN, P. H. Yellow intraocular filters in fishes. **Experimental Biology**, v. 43, n. 2, p. 127-147, 1984.
- HUBBELL, Stephen P. **The unified neutral theory of biodiversity and biogeography (MPB-32)**. Princeton University Press, 2011.
- HOU, Zhonghe; LI, Shuqiang. Tethyan changes shaped aquatic diversification. **Biological Reviews**, v. 93, n. 2, p. 874-896, 2018. <https://doi.org/10.1111/brv.12376>.
- JONES, Geoffrey P. et al. Self-recruitment in a coral reef fish population. **Nature**, v. 402, n. 6763, p. 802-804, 1999. <https://doi.org/10.1038/45538>.
- KALB, Nadine et al. The red-fluorescing marine fish *Tripterygion delaisi* can perceive its own red fluorescent colour. **Ethology**, v. 121, n. 6, p. 566-576, 2015. <https://doi.org/10.1111/eth.12367>.
- LESSIOS, Harilaos A. The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, n. 1, p. 63-91, 2008.
- LOBATO, Fabio L. et al. Diet and diversification in the evolution of coral reef fishes. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102094, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102094>.
- MARSHALL, Justin; CARLETON, Karen L.; CRONIN, Thomas. Colour vision in marine organisms. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 34, p. 86-94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.02.002>.
- MICHIELS, Nico K. et al. Red fluorescence in reef fish: a novel signalling mechanism? **BMC Ecology**, v. 8, p. 1-14, 2008. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-8-16>.
- MOSK, Virginia et al. Spectral sensitivities of the seahorses *Hippocampus subelongatus* and *Hippocampus barbouri* and the pipefish *Stigmatopora argus*. **Visual Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 345-354, 2007. <https://doi.org/10.1017/s0952523807070320>.
- NEKOLA, Jeffrey C.; WHITE, Peter S. The distance decay of similarity in biogeography and ecology. **Journal of Biogeography**, v. 26, n. 4, p. 867-878, 1999.

- PALUMBI, Stephen R. Marine speciation on a small planet. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 7, n. 4, p. 114-118, 1992.
- PALUMBI, Stephen R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 547-572, 1994.
- PRICE, Trevor et al. **Speciation in birds**. Greenwood Village, CO: Roberts and Company, 2008.
- RABOSKY, Daniel L. et al. An inverse latitudinal gradient in speciation rate for marine fishes. **Nature**, v. 559, n. 7714, p. 392-395, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0273-1>.
- RENEMA, Willem et al. Hopping hotspots: global shifts in marine biodiversity. **Science**, v. 321, n. 5889, p. 654-657, 2008. <https://doi.org/10.1126/science.1155674>.
- ROLLAND, Jonathan et al. Faster speciation and reduced extinction in the tropics contribute to the mammalian latitudinal diversity gradient. **PLoS Biology**, v. 12, n. 1, p. e1001775, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001775>.
- SIQUEIRA, Alexandre C. et al. Evolutionary processes underlying latitudinal differences in reef fish biodiversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 25, n. 12, p. 1466-1476, 2016.
- SPARKS, John S. et al. The covert world of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83259, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083259>.
- STILLER, Josefin et al. Phylogenomic analysis of Syngnathidae reveals novel relationships, origins of endemic diversity and variable diversification rates. **BMC Biology**, v. 20, n. 1, p. 75, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01271-w>.
- STUART-SMITH, Rick D. et al. Integrating abundance and functional traits reveals new global hotspots of fish diversity. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. 539-542, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12529>.
- TAYLOR, Michael S.; HELLBERG, Michael E. Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. **Science**, v. 299, n. 5603, p. 107-109, 2003. <https://doi.org/10.1126/science.1079365>. Erratum in: *Science*. 2003 Jun 27;300(5628):2033-4.
- TITTENSOR, Derek P. et al. Global patterns and predictors of marine biodiversity across taxa. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1098-1101, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09329>.
- TUOMISTO, Hanna; RUOKOLAINEN, Kalle; YLI-HALLA, Markku. Dispersal, environment, and floristic variation of western Amazonian forests. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 241-244, 2003.

VACCANI, Amanda C. et al. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. e0220561, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220561>.

WARRANT, Eric J.; LOCKET, N. Adam. Vision in the deep sea. **Biological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 671-712, 2004. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006420>.

WARREN, Dan L. et al. Mistaking geography for biology: inferring processes from species distributions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 10, p. 572-580, 2014.

WUCHERER, Matthias F.; MICHIELS, Nico K. A fluorescent chromatophore changes the level of fluorescence in a reef fish. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37913, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037913>.

2. O USO DE DIFERENTES FERRAMENTAS PARA ANÁLISE DE BIOFLUORESCÊNCIA: CALIBRANDO OS MÉTODOS DE ANÁLISE

2.1 Introdução

A coloração desempenha um papel importante na ecologia animal, e a forma como os padrões de cores são percebidos variam de acordo com cada sistema visual, e com o ambiente onde é transmitido (ENDLER, 1978). O espectro visível para humanos está restrito a uma faixa de 380 a 700 nm, porém outros animais são capazes de perceber cores em outras faixas espectrais, se tornando muitas vezes um desafio para a ciência analisar e compreender essas colorações.

O uso da espectrometria para analisar a biofluorescência é comum, identificando as tonalidades exibidas pelas diferentes espécies (JUHASZ-DORA et al., 2024). Porém, como já discutido em trabalhos anteriores (STEVENS et al., 2007; STEVENS; STODDARD; HIGHAM, 2009), esse método apresenta desvantagens pois é capaz de analisar pontos amostrais pequenos, dificultando a detecção de padrões e apresentando limitações para sua utilização em campo. Com isso, novas técnicas fotográficas estão surgindo para quantificar como os animais vêem o mundo (TROSCIANKO; STEVENS, 2015; TEDORE; NILSSON, 2019, 2021; GLENSZCZYK et al., 2022).

Evidências fotográficas são ferramentas muito importantes para descrever a biofluorescência, sendo a principal fonte de evidência e uma das formas mais importantes de documentação, pois apresentam padrões e tendências complexas de forma clara. Além da qualidade e boa iluminação das imagens, Gray e Karlsson (2022) destacam a importância de uma estimativa percentual da cobertura fluorescente nos indivíduos observados para estudos futuros, e muitas vezes quantificar com precisão a variação de cores e tonalidades de biofluorescência se torna um desafio.

Capturar imagens de organismos biofluorescentes é outro desafio, já que as imagens são realizadas em ambiente escuro, iluminado apenas pelas fontes de luz com o espectro de excitação, onde normalmente são utilizadas lanternas como pontos de iluminação (SPARKS et al., 2014; VACCANI et al., 2019). Além disso, a

complexidade do organismo a ser estudado também pode ser um fator que dificulta a realização das imagens. Animais vivos e com grande mobilidade se tornam modelos mais complexos para análise, e como solução alguns estudos utilizam placas acrílicas para limitar a mobilidade do animal (GRUBER; SPARKS, 2021), e outros utilizam animais mortos e fixados (LUDT; CLARDY, 2022). Essas duas alternativas são funcionais para pesquisas que descrevam a biofluorescência em determinadas espécies, mas perdem sua eficiência em estudos comportamentais, pois podem mascarar as respostas exibidas pelos animais. Experimentos comportamentais exigem a utilização de métodos que minimizem a influência do observador, e uma padronização nos métodos de análise se fazem necessários para agregar robustez aos resultados encontrados.

A biofluorescência foi descrita pela primeira vez para duas espécies de cavalos-marinhos em 2014 (SPARKS *et al.*, 2014), e depois mais nove espécies foram registradas (ANTHES *et al.*, 2016; DE BRAUWER *et al.*, 2018). Contudo, os registros eram apenas listas de espécies e descrições de cores exibidas. Posteriormente, Vaccani *et al.* (2019) descreveu pela primeira vez padrões de biofluorescência para a espécie *Hippocampus reidi* Ginsburg 1933 em ambiente natural e laboratório. Além das cores de biofluorescência exibidas pelos animais, são observadas também variações de tonalidades, relacionadas principalmente à cor vermelha para esta espécie de cavalo-marinho (VACCANI *et al.*, 2019).

Em meio ao crescente número de estudos relacionados à biofluorescência, surge a necessidade de padronização de métodos de análise de imagens. A padronização é importante para garantir a confiabilidade, consistência, replicabilidade, além de possibilitar a comparação de estudos. Até o momento dois softwares foram utilizados para quantificar a biofluorescência por meio de imagens: o software *PhotoQuad* (VACCANI *et al.*, 2019), e um *script* utilizado no *Python* (HAKANSON *et al.*, 2022). Porém, de acordo com Gray e Karlsson (2022) ainda não existem métodos padronizados adotados pela comunidade científica para quantificar a biofluorescência.

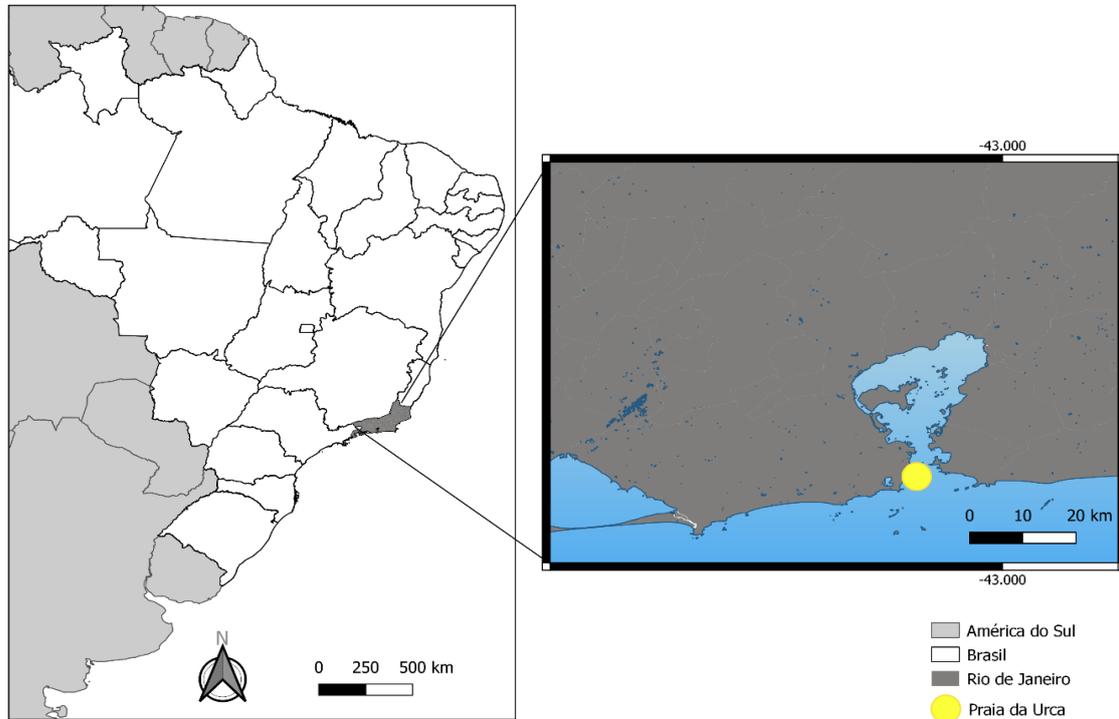
No presente trabalho avaliamos três ferramentas de análise de imagens de biofluorescência, utilizando o cavalo-marinho *Hippocampus reidi* como modelo, e visando a sugestão de um método para padronização das análises de imagens de biofluorescência de animais vivos.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Área de Estudo

Os animais utilizados para os experimentos foram coletados manualmente através de mergulho livre em profundidade de até 4m, durante os anos de 2021, 2022 e 2023. Os mergulhos foram todos realizados na praia da Urca (22°56' 33" S - 43°09' 27" O), localizada na boca da Baía de Guanabara (Figura 2.1). A Baía de Guanabara é uma das maiores baías costeiras do Brasil, cobrindo cerca de 381 km² de superfície (Mayr et al., 1989), e apresenta sérios problemas de poluição e eutrofização, nos quais o primeiro sinal de deterioração é a baixa transparência das águas (SEA/UEPSAM, 2012). A praia da Urca possui aproximadamente 150 m de extensão, possui baixa declividade, e devido à sua localização geográfica é um lugar protegido da ação direta das ondas (SOLA, 2003). Após a coleta, os animais foram acondicionados em sacos plásticos com a própria água do local e levados para o Laboratório de Comportamento Animal e Conservação da Universidade Santa Úrsula (Licença SISBio 25663-6). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Santa Úrsula (CEUAUSU00004) e seguiu todos os procedimentos padrões adotados pelos Princípios Éticos em Pesquisa Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação (CONCEA).

Figura 9 – Mapa da área de estudo onde foram amostrados indivíduos de cavalos-marinhos *Hippocampus reidi*



Legenda: Localização do ponto de coleta e devolução dos animais utilizados no experimento.

2.2.2 Aquisição das Imagens:

Os animais foram aclimatados e mantidos em aquários de vidro de 51 x 41 x 25,5 cm por quatro dias dentro de uma condição de água estável (salinidade = 30-32, pH: 8.0-8,2, amônia e nitrito = 0,0, temperatura: 22 – 24°C, fotoperíodo 12h), e foram alimentados duas vezes por dia com misidáceos coletados semanalmente em ambiente natural. Foram utilizados vinte e quatro indivíduos de cavalos-marinhos, sendo 12 machos e 12 fêmeas. Todos os indivíduos foram limpos manualmente 48 h antes das imagens serem realizadas. Para a limpeza, um pesquisador passou levemente o dedo por todo o corpo do animal para remover algas que ocasionalmente se fixam no corpo dos animais e podem camuflar o resultado da biofluorescência.

Foram inseridas placas acrílicas pretas presas ao fundo e nas laterais do aquário, de mesma dimensão do aquário, para reduzir a área útil de deslocamento dos animais e tornar possível a realização das imagens com maior qualidade. Após a aclimatação ao aquário, os cavalos-marinhos foram iluminados por dois períodos de 15 minutos nas 24 h que antecederam a realização das imagens para habituá-los à luz direcional e reduzir comportamento de estresse durante as observações. Após realização das imagens, todos os animais foram devolvidos ao mesmo local onde foram capturados, conforme licença SisBio (25663-6).

Para detecção e registro da biofluorescência, as imagens foram realizadas em câmara escura, fotografados com câmera Nikon D300 e Canon EF 100mm *f*/2.8LIS USM Macro lens, e utilizadas duas lanternas de 1600 lúmens acopladas com os respectivos filtros de excitação e barreira *NigthSea* para permitir a observação da biofluorescência.

2.2.3 Análises das imagens:

Para análise, o fundo das imagens foi removido utilizando o software Adobe Photoshop, mantendo na imagem apenas o cavalo-marinho para ser analisado e um fundo utilizando a coloração de preto absoluto, com valor de Red, Green, Blue (0,0,0) (*RGB*). O mesmo software foi utilizado para converter todas as imagens para o formato de arquivo PNG. A seleção de valores de RGB foi realizada através da seleção de pixels no Microsoft Paint 3D.

Todas as imagens foram analisadas em três softwares (Software *PhotoQuad*, *R Studio* com o pacote *Patternize* e *Python*), utilizando o percentual de cobertura da biofluorescência verde e vermelha em *H. reidi*, através de métodos diferentes de análise, para comparação dos resultados e discussão de métodos já utilizados na literatura. Foram utilizadas as cores verde e vermelha, pois são as cores de biofluorescência descritas anteriormente por Vaccani et al. (2019) para a espécie *H. reidi*. A região da cauda foi excluída das análises por ser uma parte do corpo utilizada para fixação ao substrato e os dados poderiam ser imprecisos.

No software *PhotoQuad*, os dados das imagens foram amostrados utilizando a distribuição de 50, 100, 150 e 200 pontos aleatórios em duas regiões do corpo de

cada animal (cabeça e tronco) de acordo com as cores apresentadas. Os pontos aleatórios foram classificados individual e manualmente de acordo com a cor de biofluorescência exibida, representando o percentual da área de cada cor no corpo do animal.

O segundo software utilizado foi o R Studio, com o pacote *Patternize* (VAN BELLEGHEM *et al.*, 2018). Foram gerados 24 pontos de referência no software *Image J* para alinhamento de cada imagem. Durante a análise foram utilizados o RGB 171,77,20 representando a cor vermelha e RGB 110,172,3 representando a cor verde. Após análise obteve-se a média representada por cada cor de biofluorescência equivalente a cada RGB utilizado recobrando o corpo do animal. Além disso, foi gerada uma imagem para cada indivíduo de cavalo-marinho representando a área ocupada pela biofluorescência no corpo do animal (Apêndice B).

O terceiro software utilizado para análise foi o *Python* através do desenvolvimento de um *script*, visando a análise de biofluorescência de animais vivos e aquáticos. Após a remoção do fundo, foi realizada uma pesquisa de valores de RGB que representasse a variação da tonalidade de cada cor de biofluorescência utilizando os pixels da imagem e selecionando um valor de RGB da tonalidade mais escura e mais clara para o vermelho e verde. Utilizou-se o cálculo dos pixels pretos (0,0,0) para realizar o cálculo do percentual de cada cor no corpo do cavalo-marinho excluindo o restante da imagem, representado pelo preto absoluto através do seguinte cálculo (Apêndice C):

$$\% \text{ verde} = \frac{\text{Pixels verdes}}{\text{Pixels totais} - \text{Pixels Pretos}}$$

$$\% \text{ vermelho} = \frac{\text{Pixels vermelhos}}{\text{Pixels totais} - \text{Pixels Pretos}}$$

2.2.4 Análise dos dados

Após a classificação nos softwares, foi realizada uma análise descritiva para cada uma das duas cores de biofluorescência exibidas pelos animais, descrevendo

a média e o desvio padrão representados por $X \pm DP$. Todos os dados foram transformados para o arco-seno da raiz quadrada. Posteriormente, foi realizada Análise de Variância Multivariada com teste pós-hoc de *Tukey* utilizando o software *Instat* para identificar se havia diferença significativa na biofluorescência expressa, considerando 50, 100, 150 e 200 pontos aleatórios em cada imagem no software *PhotoQuad*.

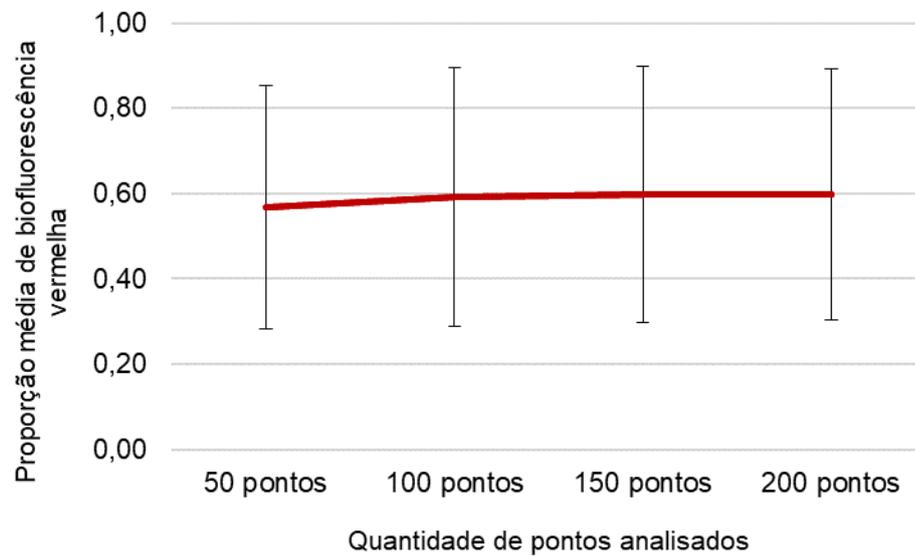
Para comparar as áreas de biofluorescência no cavalo-marinho entre os softwares sugeridos, utilizamos a metodologia de 100 pontos aleatórios em valores de proporção no *PhotoQuad* e a proporção da área da biofluorescência identificada pelo *Patternize* e *Python* para cada cor. Foi realizado uma ANOVA com pós teste de *Tukey* comparando as proporções do número de pontos representando a área de cada cor encontrados pelos dois softwares para avaliar a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos com os diferentes métodos de análise.

2.3 Resultados

Um total de 24 cavalos-marinhos foram analisados, representados por 24 imagens. Os indivíduos apresentaram as duas cores de biofluorescência já descritas para a *H. reidi*: vermelha e verde. Os resultados dos softwares utilizados indicaram a proporção de cobertura de cada cor no tronco e cabeça dos cavalos-marinhos observados.

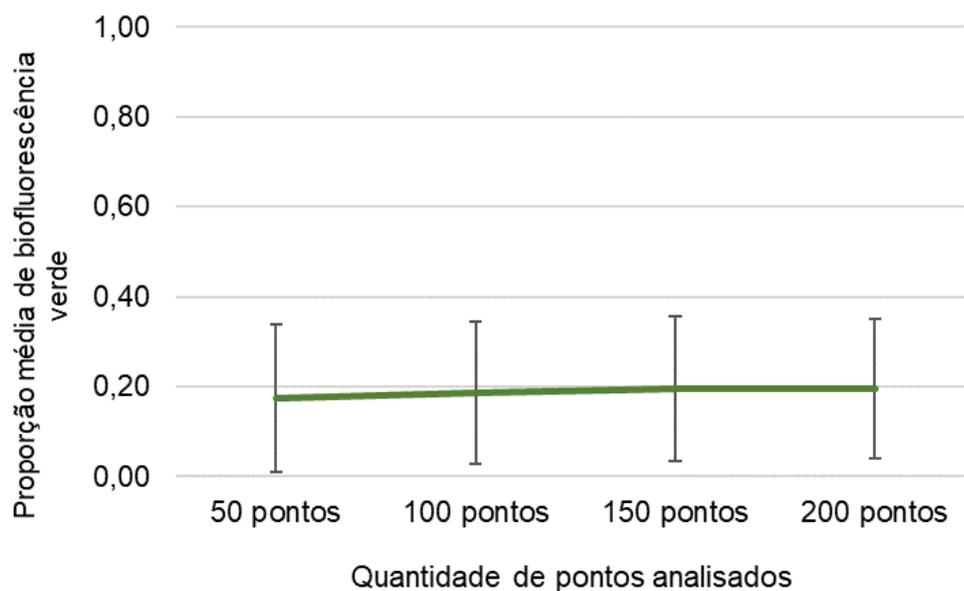
No software *PhotoQuad*, a cor vermelha apresentou maior proporção média com 150 pontos, e menor com 50 pontos (Figura 2.2), enquanto a cor verde apresentou maior proporção média com 150 e 200 pontos e menor com 50 pontos (Figura 2.3). A análise de variância da proporção de cores de biofluorescência mostrou que não existe diferença significativa entre as proporções de 50, 100, 150 e 200 pontos aleatórios para ambas as cores ($F_{\text{vermelho}} = 0.05306$, $df_{\text{vermelho}} = 95$, $p_{\text{vermelho}} = 0.9838$; $F_{\text{verde}} = 0.09141$, $df_{\text{verde}} = 95$, $p_{\text{verde}} = 0.9646$) analisadas no software *PhotoQuad* (Figura 2.4).

Figura 10 – Proporção média da cor vermelha de biofluorescência para os diferentes números de pontos analisados no cavalo-marinho *Hippocampus reidi*.



Legenda: Proporção média da biofluorescência vermelha para 50, 100, 150 e 200 pontos analisados no software PhotoQuad.

Figura 11 – Proporção média da cor verde de biofluorescência para os diferentes números de pontos analisados no cavalo-marinho *Hippocampus reidi*.



Legenda: Proporção média da biofluorescência verde para 50, 100, 150 e 200 pontos analisados no software PhotoQuad.

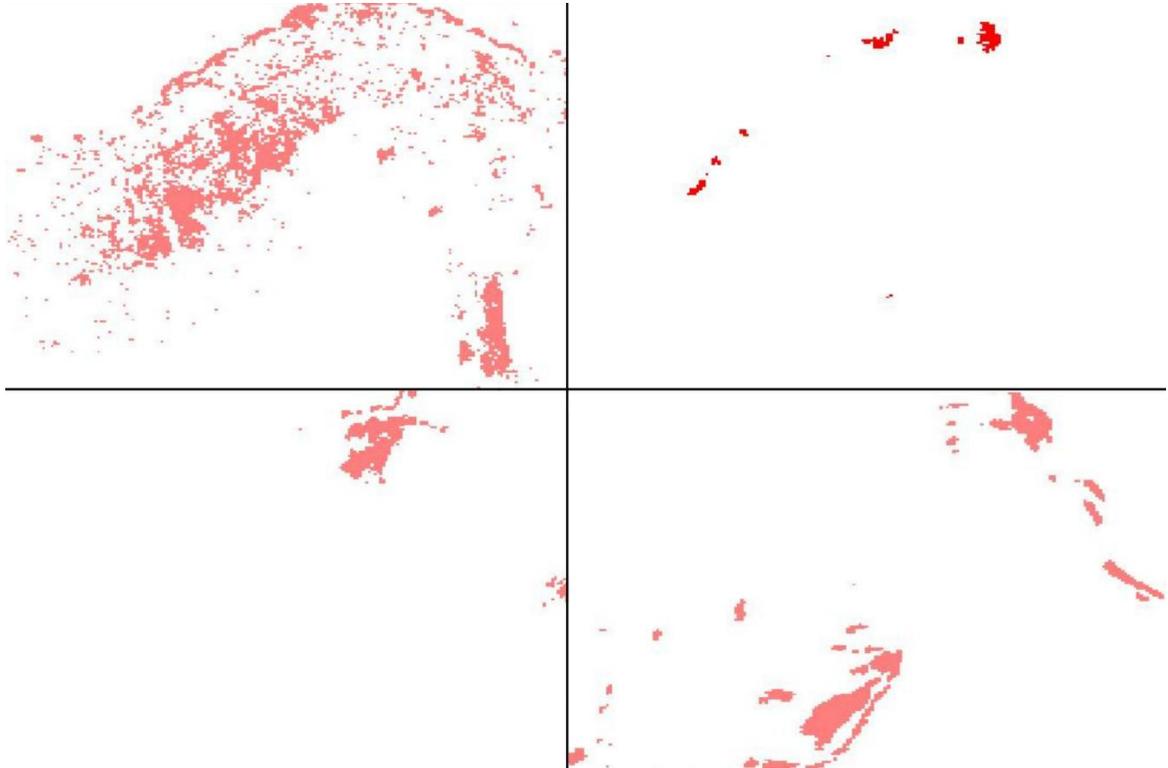
Figura 12 – Análise no software *PhotoQuad* para quantificar a biofluorescência no cavalo-marinho *Hippocampus reidi*.



Legenda: Distribuição de 100 pontos aleatórios no corpo do cavalo-marinho para análise no software *PhotoQuad*. Linha vermelha circulando área do corpo onde os pontos (amarelos) são lançados aleatoriamente para detecção do percentual de cobertura da biofluorescência.

A proporção média resultante das análises do software *Patternize* foi de $0,131 \pm 0,101$ para o vermelho e $0,285 \pm 0,273$ para o verde. Após a análise, foi gerada uma imagem representando a área com o RGB investigado para cada indivíduo de cavalo-marinho (Figura 2.5).

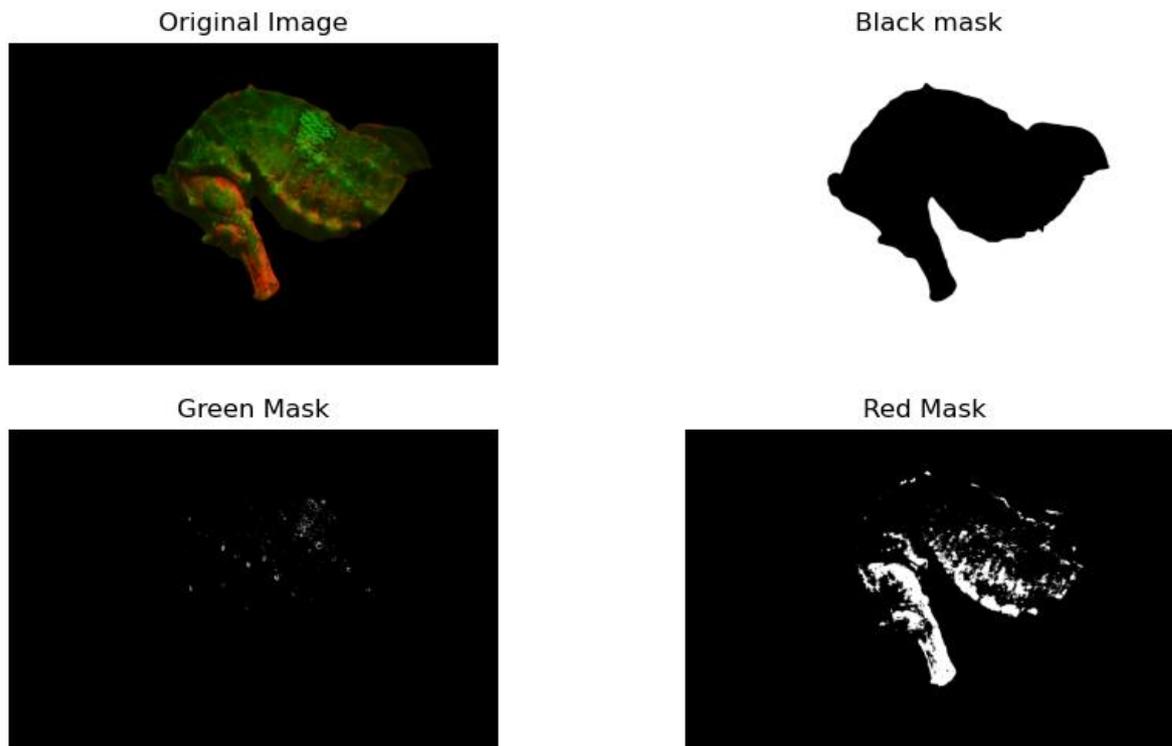
Figura 13 – Imagem com RGB da cor vermelha para quatro indivíduos de cavalos-marinhos analisados quanto à biofluorescência através do software RStudio com o pacote patternize



Legenda: imagens resultantes do RGB correspondente à biofluorescência no corpo de quatro indivíduos diferentes.

Na análise utilizando o Python, o intervalo que melhor representou a variação da tonalidade vermelha foi o RGB 68,22,0 – 255,141,78, já para a tonalidade verde foi o RGB 25,118,1 – 110,173,3. Obteve-se como resultado uma proporção média de $0,290 \pm 0,197$ para a cor vermelha e $0,201 \pm 0,142$ para a cor verde. Além do percentual da área equivalente à cobertura de cada cor de biofluorescência, o software exibiu como resultado, uma imagem mostrando a área representada por cada cor (Figura 2.6)

Figura 14 – Imagem final com máscaras de identificação geradas pelo software *Python*, para visualização da biofluorescência no cavalo-marinho *Hippocampus reidi*



Legenda: Imagem gerada pelo software *Python* exibindo a imagem analisada; a área de cobertura analisada; área representada pela cor de biofluorescência verde; e área representada pela cor de biofluorescência vermelha.

A média das cores no *PhotoQuad* foi padronizada em 100 pontos percentuais para a comparação entre os três softwares (Tabela 2.1), pois houve uma estabilização dos valores.

Tabela 1 – Área de cobertura de cada cor de biofluorescência do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, comparando as três ferramentas de análise.

	<i>PhotoQuad</i>	<i>Patternize</i>	<i>Python</i>
Média _{vermelho}	0,592	0,131	0,290
Desvio Padrão _{vermelho}	0,392	0,101	0,197
Média _{verde}	0,187	0,285	0,201
Desvio Padrão _{verde}	0,158	0,273	0,142

A ANOVA mostrou que existe diferença extremamente significativa para a cor vermelha entre os três programas ($df = 71$, $p < 0.0001$) (Tabela 2.2). Já a cor verde não apresentou diferença significativa ($df = 71$, $p = 0,1952$).

Tabela 2 – Resultados da ANOVA para a cor vermelha de biofluorescência do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, entre os softwares amostrados.

	Diferença média	q	p
PhotoQuad X Patternize	0.4612	10.460	$p < 0.001$
PhotoQuad X Python	0.3021	6.852	$p < 0.001$
Patternize X Python	-0.1591	3.608	$p < 0.05$

2.4 Discussão

O uso da fotografia como estratégia para coleta de dados para pesquisas tem sido amplamente evidenciado, uma vez que seu uso aumenta a qualidade dos dados adicionando validade (ALVES et al., 2021), e capturando amostras pontuais de forma rápida e não invasiva. Porém, a forma como essas imagens são analisadas é crucial para agregar robustez aos resultados obtidos. O registro adequado da biofluorescência representa um desafio nos estudos sobre o tema, pois são necessárias condições específicas de iluminação e equipamentos capazes de filtrar seu espectro, tornando difícil a realização das imagens. Existem técnicas detalhadas para quantificar a biofluorescência utilizando a espectroscopia, através da medição de energia ou cálculo da luz que incide e depois é emitida (IRIEL; LAGORIO, 2010; MAZEL, 2017), porém é necessária uma padronização dos métodos existentes quando imagens são utilizadas como conjunto de dados, onde é possível obter a relação entre a visualização da expressão da fluorescência e o organismo estudado, sendo fundamental para estudos adicionais de inferências sobre possíveis funções ecológicas relacionadas.

Os resultados do presente estudo indicaram diferenças no cálculo da representação da cor no tronco e cabeça dos cavalos-marinhos, sugerindo diferentes eficiências na detecção dos tons. O software *PhotoQuad* é uma

ferramenta de processamento de imagens criada para atender análises rápidas e precisas de fotografias digitais, com foco especial em amostras de *quadrat* (TRYGONIS; SINI, 2012). Esse método é utilizado para avaliar a composição, abundância e diversidade de espécies (BUSSOTTI et al., 2006), padrões espaciais (TEIXIDÓ et al., 2002), monitoramento de mudanças ambientais (ROGHI et al., 2010), e foi utilizada recentemente para analisar a biofluorescência adquirindo o percentual de cobertura das cores exibidas através de pontos aleatórios no corpo do animal (VACCANI et al., 2019).

Em sua essência, o *PhotoQuad* apresenta uma interface intuitiva, facilitando o uso pelo pesquisador, porém como a categorização dos pontos é feita de forma manual, demanda de um tempo maior para a análise de imagens. Além disso, existe uma subjetividade na categorização: como a cor da biofluorescência é classificada manualmente, no caso da iluminação não ser ampla e harmônica em todo o corpo do animal, é possível que o pesquisador indique uma cor não representada pela imagem. Nossos dados não detectaram diferença entre 50, 100, 150 e 200 pontos aleatórios para análise do percentual de cobertura da biofluorescência no cavalo-marinho *H. reidi*, identificando que a classificação com 50 pontos aleatórios representa a biofluorescência total do corpo do animal assim como 200 aleatórios, tornando possível o uso de menos pontos e conseqüentemente diminuindo o tempo de análise das imagens. O estudo de caso relatou um percentual de pouco mais da metade do corpo do animal com fluorescência vermelha e com 16% do recoberto por fluorescência verde.

Já o pacote *Patternize* é uma abordagem utilizada para quantificar a variação de padrões de cores em imagens 2D fornecendo utilidades para extrair, transformar e sobrepor padrões de cores (VAN BELLEGHEM et al., 2018). Possui uma interface menos intuitiva, porém uma avaliação automatizada e rápida das imagens analisadas. Para a sobreposição das imagens, é necessária a inserção manual de pontos de referências para cada imagem, e no caso dos cavalos-marinheiros foi necessário um maior número de pontos quando comparado ao utilizado pelos autores na descrição do método. Isso ocorreu devido ao fato de que os animais apresentaram diversas posturas diferentes nas imagens obtidas. Não foi possível aplicar no *script* a variação entre as tonalidades para cada cor de biofluorescência, sendo necessário um valor de RGB para cada cor de biofluorescência por imagem, impossibilitando a geração de um mapa único de calor representando a área comum

de biofluorescência no corpo de todos os indivíduos analisados. Essa limitação do uso de um conjunto único de tonalidades no *script* pode ter subestimado o percentual de cobertura dos tons de fluorescência identificados que possuem maior amplitude de variação, como o vermelho. Esse fator pode ter refletido na cobertura subestimada de 17% de vermelho e, por outro lado, pode ter representado mais precisamente o verde, que pouco teve variação em seus tons, tendo 28% de área corporal.

O *Python* foi o terceiro software utilizado para comparar os métodos. O software também apresenta uma interface pouco intuitiva, mas permite a automatização das análises e a possibilidade de inserir uma variação de RGB entre as diferentes intensidades. Essa característica é de fundamental importância já que a biofluorescência é expressa com intensidades diferentes no corpo do animal (WUCHERER; MICHIELS 2012). Ao final da análise, assim como o *Patternize*, o *script* do *Python* gera uma imagem com a localização da biofluorescência no corpo do animal equivalente a cada cor, sendo possível avaliar se a faixa de variação de RGB utilizada representa de forma mais aproximada as variações da biofluorescência nas imagens analisadas, indicando um percentual de cobertura de 29% de vermelho e de 20% de verde. O software *Python* foi sugerido anteriormente como ferramenta para análise de biofluorescência (HAKANSON et al., 2022). Os referidos autores analisaram uma espécie de esquilo voador (*Glaucomys Volans*), sendo todos os indivíduos encontravam-se mortos e fixados. Para o ajuste das colorações da imagem, os autores utilizaram um cartão de correção de cor, e aplicaram uma transformação do espaço de cor RGB para o espaço CIELAB, que visa tornar a diferença perceptível pelo olho humano. Conforme os autores mesmo citam, esse espaço de cores ainda não é uniforme para tons de verde, o que seria uma dificuldade para analisar a biofluorescência do cavalo-marinho. A utilização do cartão de correção de cores é uma outra limitação para ser utilizado com animais marinhos onde as imagens são realizadas dentro da água e com animal vivo. De acordo com essas diferenças, recomendamos no presente trabalho um *script* baseado nessas novas condições.

Todos os três softwares aqui analisados possuem vantagens e desvantagens, e o objetivo da análise, o objeto de estudo, e o ambiente onde as imagens são realizadas devem ser levados em consideração para a escolha do método mais adequado. O *PhotoQuad* possui uma visão mais subjetiva, já que o pesquisador

indica a cor da biofluorescência expressa; além de ser manual e demandar maior tempo de análise dos dados. Ele tem a vantagem de ter uma interface mais simples, não sendo necessário nenhum conhecimento prévio de programação, quando comparado aos outros dois programas. O pacote *Patternize* utilizado no software R, apesar de possuir uma interface mais complexa, apresenta a vantagem da geração de um mapa de calor sendo uma boa aplicação no caso de investigar a relação da biofluorescência e as partes do corpo do animal, detectando uma possível resposta à diferentes contextos, ou padrões naturais. Porém, no *script* que utilizamos a geração do mapa só é possível se as imagens possuírem um RGB único para cada cor de biofluorescência. Para capturar as variações de RGB é necessária uma alteração no *script* que se torne capaz de representar as variações de tonalidades para cada cor de biofluorescência. Sendo assim, o *Patternize* pode não ser o melhor método para analisar indivíduos com muitas variações de tonalidades como o caso do vermelho no cavalo-marinho, mas um bom modelo para o verde, que não apresenta tanta variação e é mais localizado em pequenas regiões do corpo. Já o *Python* não apresenta uma interface tão simples quando o *PhotoQuad*, porém possui comandos mais simples do que o *Patternize*, além de representar bem as tonalidades de biofluorescência por meio da variação de RGB. A única desvantagem é a necessidade de encontrar previamente as faixas de RGB limites que representem bem cada tonalidade. Esse método se mostrou eficiente no caso do cavalo-marinho, e acreditamos ser eficiente para ser aplicado a outros organismos marinhos vivos, tanto em ambiente controlado como em ambiente natural.

Quando as imagens são utilizadas como conjunto de dados, é necessário que as condições sejam iguais para todas as imagens, e no caso da biofluorescência, a iluminação é um fator chave. O cavalo-marinho é um animal que possui o corpo com muitas angulações, dificultando uma iluminação uniforme com pouca fonte de luz. A baixa iluminação gera pontos escuros no corpo do animal onde a biofluorescência seria mais bem visualizada com melhor iluminação, o que pode fazer com que o software escolhido para análise não represente uma relação correta com a área do corpo. Minimizamos esse efeito com o uso de duas lanternas e deixando o feixe de luz mais amplo possível, porém cada caso deve ser analisado individualmente. Trabalhar com o animal vivo ainda dificulta a homogeneização da iluminação, pois a movimentação do organismo também poderá influenciar na incidência de luz, podendo refletir nos resultados das imagens captadas.

De acordo com Hakanson et al. (2022) ainda não existem protocolos padronizados para documentar e quantificar a biofluorescência, ainda mais para documentar organismos vivos. No caso do cavalo-marinho, alvo do presente estudo, o método com o *script* desenvolvido no software *Python* se mostrou mais apropriada, produzindo resultados eficientes podendo ser uma alternativa importante para a análise de biofluorescência. Portanto esperamos contribuir com as características de cada método avaliado, tornando possível melhorar a aplicabilidade e sugerindo uma possível técnica para ser adotada por pesquisadores para padronizar esse tipo de análise e contribuir para futuras análises.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Kisna Yasmin Andrade, Cláudia Cristiane Figueira Martins RODRIGUES, Pétala Tuani Candido de Oliveira SALVADOR, and Sheila Duarte de Mendonça FERNANDES. Uso da fotografia nas pesquisas qualitativas da área da saúde: revisão de escopo. **Ciência & Saúde Coletiva** 26 (2021): 521-529.
- ANTHES, Nils et al. Diversity and ecological correlates of red fluorescence in marine fishes. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 126, 2016.
- BUSSOTTI, Simona et al. Spatial and temporal variability of sessile benthos in shallow Mediterranean marine caves. **Marine Ecology Progress Series**, v. 325, p. 109-119, 2006.
- DE BRAUWER, Maarten et al. Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. **Conservation Biology**, v. 32, n. 3, p. 706-715, 2018. <https://doi.org/10.1111/cobi.13033>
- ENDLER, John A. A predator's view of animal color patterns. In: **Evolutionary Biology**. Boston, MA: Springer US, 1978. p. 319-364.
- GLENSZCZYK, Mateusz et al. The jumping spider *Saitis barbipes* lacks a red photoreceptor to see its own sexually dimorphic red coloration. **The Science of Nature**, v. 109, n. 1, p. 6, 2022.
- GRAY, Russell; KARLSSON, Catharina. 101 years of biofluorescent animal studies: trends in literature, novel hypotheses, and best practices moving forward. 2022. <https://doi.org/10.32942/osf.io/ub6yn>.

- GRUBER, David F.; SPARKS, John S. First report of biofluorescence in Arctic snailfishes and rare occurrence of multiple fluorescent colors in a single species. **American Museum Novitates**, v. 2020, n. 3967, p. 1-12, 2021.
- HAKANSON, Emma C. et al. Techniques for documenting and quantifying biofluorescence through digital photography and color quantization. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 12, p. 100149, 2022.
- IRIEL, Analía; LAGORIO, María Gabriela. Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? **Naturwissenschaften**, v. 97, p. 915-924, 2010.
- JUHASZ-DORA, Thomas et al. Hidden in plain sight: hyperspectral documentation of complex biofluorescence produced by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 12, n. 2, p. 025002, 2024.
- LUDT, W. B.; CLARDY, T. R. First detection of biofluorescence in a deep-sea anglerfish. *Journal of Fish Biology*, v. 100, n. 3, p. 843–846, 2022. doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.14988>.
- MAZEL, Charles. Method for determining the contribution of fluorescence to an optical signature, with implications for postulating a visual function. **Frontiers in Marine Science** 4 (2017): 266.
- RAYOL SOLA, Maria Claudia. Variação temporal da macrofauna bentônica sublitoral da praia da Urca (RJ) após a ocorrência de ressacas, com ênfase na fauna de anelídeos poliquetas. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
- ROGHI, F. et al. Decadal evolution of a coralligenous ecosystem under the influence of human impacts and climate change. **Biologia Marina Mediterranea**, v. 17, n. 1, p. 59-62, 2010.
- SPARKS, John S. et al. The covert world of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83259, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083259>
- STEVENS, Martin et al. Using digital photography to study animal coloration. **Biological Journal of the Linnean society**, v. 90, n. 2, p. 211-237, 2007.
- STEVENS, Martin; STODDARD, Mary Caswell; HIGHAM, James P. Studying primate color: towards visual system-dependent methods. **International Journal of Primatology**, v. 30, p. 893-917, 2009.
- TEDORE, Cynthia; NILSSON, Dan-Eric. Avian UV vision enhances leaf surface contrasts in forest environments. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 238, 2019.

- TEDORE, Cynthia; NILSSON, Dan-Eric. Ultraviolet vision aids the detection of nutrient-dense non-signaling plant foods. **Vision Research**, v. 183, p. 16-29, 2021.
- TEIXIDÓ, N.; GARRABOU, J.; ARNTZ, W. E. Spatial pattern quantification of Antarctic benthic communities using landscape indices. **Marine Ecology Progress Series**, v. 242, p. 1-14, 2002.
- TRYGONIS, Vasilis, and Maria SINI. PhotoQuad: a dedicated seabed image processing software, and a comparative error analysis of four photoquadrat methods. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 424 (2012): 99-108.
- TROSCIANKO, Jolyon; STEVENS, Martin. Image calibration and analysis toolbox—a free software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 11, p. 1320-1331, 2015.
- VACCANI, Amanda C. et al. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. e0220561, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220561>
- VAN BELLEGHEM, Steven M. et al. Patternize: an R package for quantifying colour pattern variation. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 390-398, 2018.
- WUCHERER, Matthias F.; MICHIELS, Nico K. A fluorescent chromatophore changes the level of fluorescence in a reef fish. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37913, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037913>

3. BIOFLUORESCÊNCIA COMO RESPOSTA COMPORTAMENTAL EM CAVALOS-MARINHOS: RELAÇÃO ENTRE PERSONALIDADE E DIFERENTES CONTEXTOS

3.1 Introdução

A comunicação se baseia na transferência intencional de informação entre um emissor e um receptor (BRADBURY; VEHRENCAMP, 1998), e possui grande importância, pois desempenha um papel crucial na adaptação e sobrevivência das espécies em seus ecossistemas. A principal ferramenta básica da comunicação são *displays*, que em diferentes sequências e combinações, são usados em muitas interações intra e interespecíficas (HEBETS; PAPAJ, 2005). Existe uma variedade de *displays* envolvendo sistemas sensoriais e comportamentos de sinalização (ENDLER, 1992), que evoluíram para que os animais possam tomar decisões baseadas na sinalização de comportamento (ENDLER, 1993), podendo ajudar a explicar a sobrevivência de determinadas espécies a condições adversas.

Os indivíduos de uma população apresentam ao longo do seu desenvolvimento diferenças no comportamento conforme as diferentes experiências que vivenciaram ao longo da vida. A variação individual em resposta a diversos contextos pode ser explicada muitas vezes pela síndrome comportamental, também conhecida como personalidade animal (SIH et al., 2004). Definimos aqui personalidade animal como as diferenças individuais de comportamento que são consistentes ao longo do tempo e em diferentes contextos (STAMPS; GROOTHUIS, 2010). Esse comportamento individual molda o comportamento populacional e conseqüentemente o comportamento da espécie, já que a variedade de personalidades, assim como a plasticidade dos indivíduos pode afetar o sucesso das populações (RESENDE, 2020). Um exemplo é a existência de uma tendência à especialização de tarefas dentro de uma população baseada na personalidade individual, como no caso das aranhas da espécie *Anelosimus studiosus*, onde as fêmeas agressivas realizam a função de reparo da teia, captura de presas e defesa da colônia, enquanto fêmeas 'tímidas' se especializaram no cuidado parental (GRINSTED et al., 2013; WRIGHT et al., 2014). Várias respostas comportamentais são importantes para a classificação

da personalidade; assim, a personalidade 'tímida' é geralmente representada por animais mais cautelosos, são menos agressivos, tendem a ser neofóbicos (KOOLHAAS et al., 2007) e tendem a não sair dos grupos em busca de novos recursos (PIKE et al., 2008; MICHELENA et al., 2009). Em contraste, animais 'ousados' possuem comportamentos mais ativos e exploratórios, tendem a ser neófilos e agressivos com membros da mesma espécie (DOUGHERTY; GUILLETE, 2018), e essas características podem resultar em maior sucesso reprodutivo e menor sobrevivência (RÉALE et al., 2010).

O sucesso reprodutivo também está relacionado a colorações exibidas pelos animais, que também são uma característica importante nas relações intra e interespecíficas, incluindo a comunicação entre vários grupos de animais (HOUDE; ENDLER, 1990; CUTHILL et al., 2017). A cor do animal pode ter função social e estar associada a diversas estratégias comportamentais (CALSBEEK et al., 2010). Uma grande variedade de vertebrados utiliza padrão de cores para se comunicar e, dentre eles, os peixes apresentam uma grande diversidade de comportamentos e complexidades (KING et al., 2022). Muitas espécies de peixes utilizam a coloração como importante ferramenta de comunicação, incluindo mimetismo, camuflagem, identificação intraespecífica e corte (HAYASHY et al., 2022).

Entre as espécies de peixes recifais, os cavalos-marinhos são conhecidos pela sua notável capacidade de mudar de coloração em contextos de comunicação, como durante o processo de corte e para camuflagem. O cavalo-marinho-do-focinho-longo *Hippocampus reidi* Ginsburg 1933 é uma das três espécies de cavalos-marinhos encontradas ao longo da costa brasileira (LOURIE et al., 1999; ROSA et al., 2007; FRERET-MEURER et al., 2018). Esses animais habitam águas costeiras rasas (ROSA et al., 2007), que constituem um ambiente complexo com variação significativa na intensidade da luz e na penetração do comprimento de onda (KIRK, 1985).

O ambiente aquático difere significativamente do ambiente terrestre no que diz respeito a transferências de informações para comunicação (PITCHER, 2012). Regiões rasas e claras fornecem condições para pistas visuais como fonte de informações rápidas e confiáveis, enquanto regiões de águas turvas falham nesse tipo de comunicação. Além disso, o aumento da profundidade influencia diretamente na luminosidade, onde comprimentos de onda mais longos do espectro de luz são rapidamente absorvidos e espalhados nas primeiras camadas de água, enquanto

comprimentos mais curtos conseguem penetrar até maiores profundidades, podendo passar de 60 metros (FROMMMEN, 2019).

Essas características do ambiente marinho favorecem o uso da biofluorescência por diversos animais. Este fenômeno ocorre quando organismos são capazes de absorver comprimentos de onda de luz, transformar e reemitir em um comprimento de onda maior ou menor, resultando visualmente em diferentes cores (SPARKS et al., 2014). Diversas cores já foram descritas em vertebrados biofluorescentes: verde, vermelha, laranja (SPARKS et al., 2014), amarelo (MCGRAW et al., 2007), rosa (KOHLENER et al., 2019) e azul (TABOADA et al., 2017).

Os peixes são modelos eficientes para compreender melhor o uso da biofluorescência pois são animais visuais e capazes de detectar a fluorescência (HEINERMANN, 1984). Pouco se sabe sobre as funções da biofluorescência para espécies marinhas, mas até o momento algumas funções já foram descobertas em diversos grupos de vertebrados, sugerindo que a biofluorescência pode ter funções ecológicas importantes como na escolha do parceiro reprodutivo em papagaios (ARNOLD et al., 2002), estratégia de defesa contra predadores em borboletas (OLOFSSON et al., 2010), dimorfismo sexual em peixes (COHEN; SUMMERS, 2022) e salamandras (ANTHONY et al., 2023) e reconhecimento intraespecífico em peixes (KALB et al., 2015).

O objetivo do presente estudo foi investigar se a biofluorescência exibida pelo cavalo-marinho *H. reidi* funciona como um fator de resposta para dois contextos experimentais: a inserção de um objeto novo e a predação.

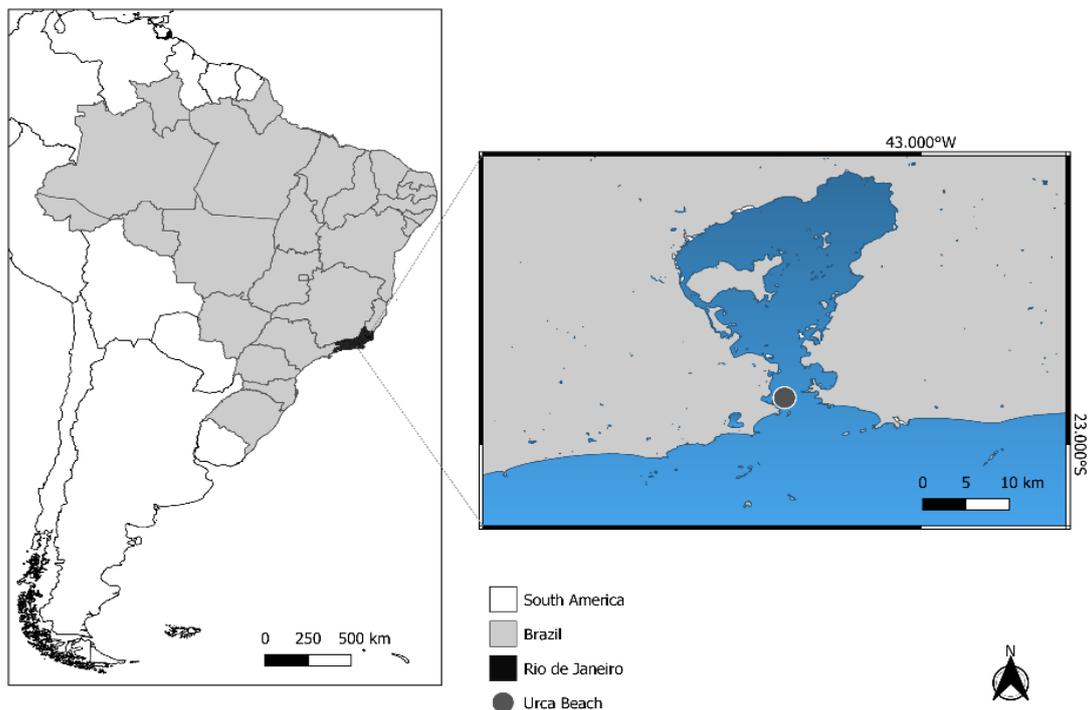
3.2 Material e Métodos

3.2.1 Área de estudo

A Baía de Guanabara é um estuário tropical (VALENTIN et al., 1999) localizado na cidade do Rio de Janeiro o qual abriga uma série de ambientes como praias arenosas, manguezais e costões rochosos ao longo do seu gradiente marinho-estuarino. Este estuário apresenta sérios problemas de poluição e eutrofização

(SEA/UEPSAM, 2012). A praia da Urca ($22^{\circ}56'33,71''$ S - $43^{\circ}09'27,77''$ W) (Figura 3.1) é uma praia arenosa situada no lado oeste, próximo à entrada da Baía de Guanabara, onde prevalecem as condições marinhas (KJERFVE et al., 1997).

Figura 15 – Mapa da área de estudo onde foram amostrados indivíduos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*.



Legenda: Localização do ponto de coleta e devolução dos animais utilizados no experimento.

3.2.2 Captura dos Animais

Espécimes de cavalos-marinhos da espécie *H. reidi* foram capturados por meio de mergulho livre na Praia da Urca durante os anos de 2021, 2022 e 2023 (Licença SISBio 56695-1). Após a captura, os animais foram transportados em saco plástico contendo água do local até o Laboratório de Comportamento e Conservação Animal da Universidade Santa Úrsula, RJ. Eles foram então isolados por 72 horas antes do

início dos experimentos para evitar respostas comportamentais ao estresse. Foram realizadas coletas de modo a se obter o mesmo número de indivíduos de cavalos-marinhos de personalidade tímida e ousada. Após os experimentos, todos os animais foram devolvidos ao local de captura original, de acordo com a licença do SisBio. Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Santa Úrsula (CEUAUSU00004) e seguiu todos os procedimentos padrão definidos pelos Princípios Éticos em Pesquisa Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação (CONCEA).

Todos os indivíduos capturados foram aclimatados e isolados em aquários de vidro de 51 x 41 x 25,5 cm. Testes semanais foram realizados previamente para avaliar as condições de temperatura, pH, salinidade, nitrito e amônia, sendo mantidas em condições ideais (pH entre 8,0 e 8,2, nitrito e amônia de 0 a 0,25 ppm, salinidade variando entre 30 e 34, temperatura entre 24 e 27°C). Os aquários foram mantidos com aeração constante e substrato artificial. Os cavalos-marinhos foram alimentados diariamente com *mysidaceos* e mantidos isolados por mais 48 horas antes dos procedimentos experimentais.

3.2.3 Experimento para identificação da personalidade

Inicialmente foram realizados experimentos para caracterizar a personalidade dos cavalos-marinhos através de três testes comportamentais. Esses testes foram realizados individualmente e seguiram o protocolo proposto por Freret-Meurer e Alves (2018). O protocolo envolveu submeter os indivíduos a três contextos: avaliação de comportamento exploratório, onde o indivíduo de cavalo-marinho era inserido em um aquário com novos substratos, e avaliado o comportamento de exploração (quando o indivíduo nadava pela aquário explorando o novo ambiente) ou proteção (quando o animal se manteve em um único ponto do aquário); avaliação de neofilia/neofobia onde foi inserido um objeto novo (tubo vermelho) e analisado se o animal se aproximava do objeto como forma de inspeção, ou se se mantinha afastado; e a avaliação de comportamento antipredatório, onde foi avaliado se durante a captura e imobilização o animal permanecia imóvel ou apresentava o comportamento de tentar retaliação (Figura 3.2 a 3.4). A personalidade foi

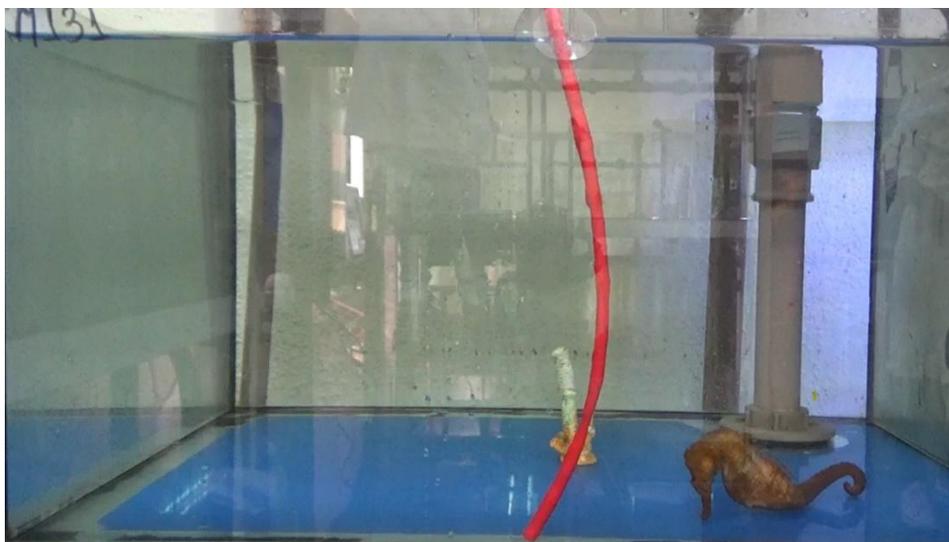
classificada conforme matriz formada pelos resultados binários dos três contextos aplicados. Após a identificação da personalidade, os cavalos-marinhos foram novamente isolados por 72 horas antes de prosseguirem com os experimentos de biofluorescência

Figura 16 – Experimento de identificação da personalidade dos cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* em contexto exploratório



Legenda: Primeiro experimento de personalidade para identificar o comportamento de exploração ou proteção do cavalo-marinho.

Figura 17 – Identificação da personalidade dos cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* no contexto de neofilia/neofobia.



Legenda: Segundo experimento para identificação de personalidade, através da avaliação de neofilia/neofobia com o tubo vermelho

Figura 18 – Identificação da personalidade dos cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* para avaliação de comportamento antipredatório.



Legenda: Terceiro experimento para avaliação da personalidade, com o contexto de avaliar o comportamento de retaliação ou não retaliação após o animal ser imobilizado pela mão do pesquisador.

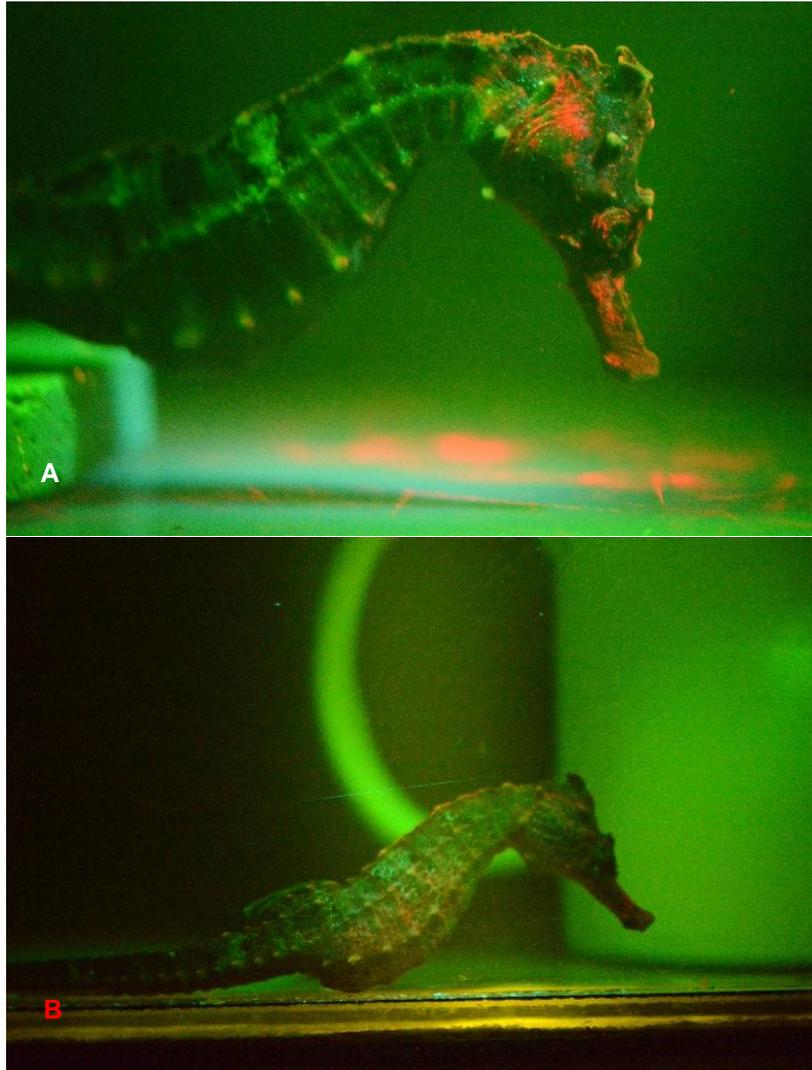
3.2.4 Experimentos de Biofluorescência

Após isolamento de 72 horas e ausência de comportamentos relacionados ao estresse, como movimentos estereotipados de natação ou frequência respiratória elevada (>40 batimentos operculares por minuto) (FRERET-MEURER et al., 2020), foram realizados os experimentos de biofluorescência. Durante as 24 horas iniciais anteriores aos experimentos, os cavalos-marinhos foram expostos às condições experimentais de luz para visualização de biofluorescência durante duas sessões de 15 minutos.

Para realizar os experimentos de biofluorescência, cada cavalo-marinho foi colocado em aquários individuais e as imagens foram capturadas em uma câmara escura. A fotografia foi realizada usando uma câmera Nikon D300 emparelhada com uma lente Macro Canon EF 100mm $f/2.8$ LIS USM. Duas lanternas de 1600 lúmens foram usadas com respectivos filtros de barreira (exposição azul royal: ~450 nm) e um filtro de barreira amarelo que bloqueia completamente a excitação refletida dos comprimentos de onda de 440-460 nm.

Antes de qualquer intervenção, foi tirada uma fotografia para registrar a biofluorescência do animal sem nenhuma interferência, que foi utilizada como controle em ambos os experimentos. Posteriormente, um novo objeto, representado por uma caneca, foi inserido no local oposto do aquário ao cavalo-marinho (Figura 3.5). Durante a avaliação do comportamento de neofilia ou neofobia, foi tirada outra fotografia da resposta de biofluorescência do cavalo marinho ao estímulo. A neofobia foi considerada quando o cavalo-marinho permaneceu imóvel e/ou se distanciou do objeto introduzido, enquanto a neofilia foi reconhecida quando o indivíduo se aproximou do novo objeto.

Figura 19 – Experimento de Biofluorescência *versus* Personalidade em cavalos-marinhos *Hippocampus reidi*



Legenda: (A) Indivíduo de cavalo-marinho *H. reidi* durante o controle; (B) indivíduo durante o experimento com o objeto novo.

Logo após o primeiro experimento com o objeto novo, o segundo experimento foi conduzido e a fotografia foi tirada quando um pesquisador inseriu a mão no aquário e segurou o cavalo-marinho, simulando uma predação por aproximadamente 30 segundos (Figura 3.6).

Figura 20 – Tratamento do experimento agonístico com cavalos-marinhos *Hippocampus reidi*



Legenda: Biofluorescência exibida por um indivíduo de cavalo-marinho sendo imobilizado pela mão do pesquisador durante o tratamento do experimento agonístico.

3.2.5 Análise dos dados

Os resultados dos experimentos para identificação da personalidade foram planilhados em uma matriz de dados e os animais foram classificados em tímidos e ousados.

As imagens foram tratadas com software Adobe Photoshop a partir da remoção do fundo de todas as imagens, mantendo apenas o cavalo-marinho e o resto da imagem com fundo preto RGB (0,0,0). As partes do corpo incluídas na análise foram cabeça e tronco, já que a cauda muitas vezes está presa ao substrato impossibilitando a realização das imagens. Todas as imagens foram analisadas no software *Python* utilizando *script* para analisar biofluorescência sugerido no capítulo 2, considerando a variação para tonalidade vermelha o RGB (68,22,0 – 255,141,78), e a variação da tonalidade verde o RGB (25,118,1 – 110,173,3).

Inicialmente foi realizada uma estatística descritiva representada por média \pm desvio padrão do percentual de cobertura para cada cor de biofluorescência. Para analisar se indivíduos 'tímidos' e 'ousados' modificam o padrão de biofluorescência na presença do objeto novo utilizou-se o teste *t* de Student com amostras pareadas para ambas as cores de biofluorescência. A diferença entre as personalidades e cores de biofluorescência exibidas pelos cavalos-marinhos na resposta ao

tratamento foram testadas através do teste t de Student para amostras independentes, considerando que todos dados passaram no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

A relação entre a resposta ao experimento com o objeto novo para ambas as personalidades, assim como o comportamento de neofilia ou neofobia e os sexos, foram testados com cores de biofluorescência exibidas pelos animais. Subtraímos o valor da biofluorescência durante o tratamento pelo valor da biofluorescência exibida durante o controle com as duas cores, e para verificar se houve diferença entre as personalidades e comportamentos foi utilizado o teste t de Student não pareado com correlação Welch.

Para verificar se existiu diferença entre o tratamento e o controle durante o experimento agonístico foi realizado um teste t de Student pareado para ambas as cores de biofluorescência.

Verificou-se se houve diferença significativa entre o controle e os dois tratamentos, representados por t1 (objeto novo) e t2 (agonístico) através de uma ANOVA de medida repetida, seguida de teste pós-hoc de Tukey.

Para avaliar se os dados amostrais forneceram evidências robustas, foi realizado uma análise de poder estatístico com uso do G-Power, e o nível de significância utilizado nas análises foi de 95%.

3.3 Resultados

Após os experimentos de identificação de personalidade, foram selecionados e utilizados doze indivíduos de cavalos-marinhos de cada personalidade, que foram analisados de acordo com a expressão das cores de biofluorescência em relação ao objeto novo para verificar se houve diferença no padrão das cores de biofluorescência exibidos na presença do objeto. Animais com personalidade 'tímida', apresentaram uma média de $14,45 \pm 15,57\%$ do corpo com a cor vermelha no controle, e $29,06 \pm 22,23\%$ no tratamento. Já a cor verde média representou $6,37 \pm 7,47\%$ no controle e $9,05 \pm 10,52\%$ no tratamento. Indivíduos de personalidade 'ousada' apresentaram média de $7,50 \pm 7,62\%$ do corpo na cor vermelha no controle, e no tratamento $14,63 \pm 15,72\%$. A cor verde representou um total de $5,11 \pm$

4,65% do corpo do animal no controle, enquanto o tratamento apresentou $2,87 \pm 2,87\%$. Foi encontrada uma diferença significativa no padrão de biofluorescência dos cavalos-marinhos 'tímidos' em relação ao objeto novo e a biofluorescência na cor vermelha ($t = 2,700$, $df = 11$, $p = 0,02$: Power test: 45,4%), porém a cor verde não apresentou diferença significativa ($t = 1,039$, $df = 11$, $p = 0,3213$: Power test: 96,4%), indicando que indivíduos de personalidade 'tímida' não modificaram o padrão de biofluorescência na presença do objeto novo. Os indivíduos de personalidade 'ousada' não apresentaram diferença significativa para a cor vermelha ($t = -1,469$, $df = 11$, $p = 0,1698$: Power test: 7,6%), nem para a cor verde ($t = 1,575$, $df = 11$, $p = 0,1436$: Power test: 90%).

Analisando a resposta dos indivíduos ao experimento, observamos que indivíduos de personalidade 'tímida' exibiram uma diferença média entre o tratamento e o controle de $14,61 \pm 23,20\%$ para a cor vermelha, havendo um aumento no percentual da área com biofluorescência vermelha na presença do objeto novo. Uma diferença média $2,68 \pm 7,92\%$ foi observada para a cor verde, indicando um aumento no percentual da área com biofluorescência na presença do objeto novo. Já os indivíduos de personalidade 'ousada' exibiram uma diferença média de $7,13 \pm 13,59\%$ para a cor vermelha, indicando um aumento no percentual da área com biofluorescência vermelha na presença do objeto novo e $2,24 \pm 4,34\%$ para a cor verde, indicando uma redução no percentual da área com biofluorescência na presença do objeto novo. Os cavalos-marinhos com ambas as personalidades não diferiram significativamente na resposta ao tratamento com o objeto novo para a cor vermelha de biofluorescência ($0,9628$, $df = 17$, $p = 0,3491$: Power test: 13%) nem para cor verde ($t = 1,888$, $df = 17$, $p = 0,0762$: Power test: 10,7%).

Os animais que apresentaram o comportamento de neofilia apresentaram no controle a média de $10,67 \pm 10,34\%$ e no tratamento $25,13 \pm 21,07\%$ de área do corpo com biofluorescência vermelha. A diferença média de $14,45 \pm 17,57\%$ indicou que houve um aumento no percentual da área para animais que se aproximavam do objeto novo. Os mesmos animais que apresentaram comportamento de neofilia, apresentaram durante o controle a média de $3,01 \pm 3,31\%$ e durante o tratamento, $3,78 \pm 5,75\%$ de área do corpo com biofluorescência verde. A diferença média de $0,77 \pm 5,22\%$ indicou que também houve um aumento no percentual da área com biofluorescência verde para animais que se aproximaram do objeto novo. Já os

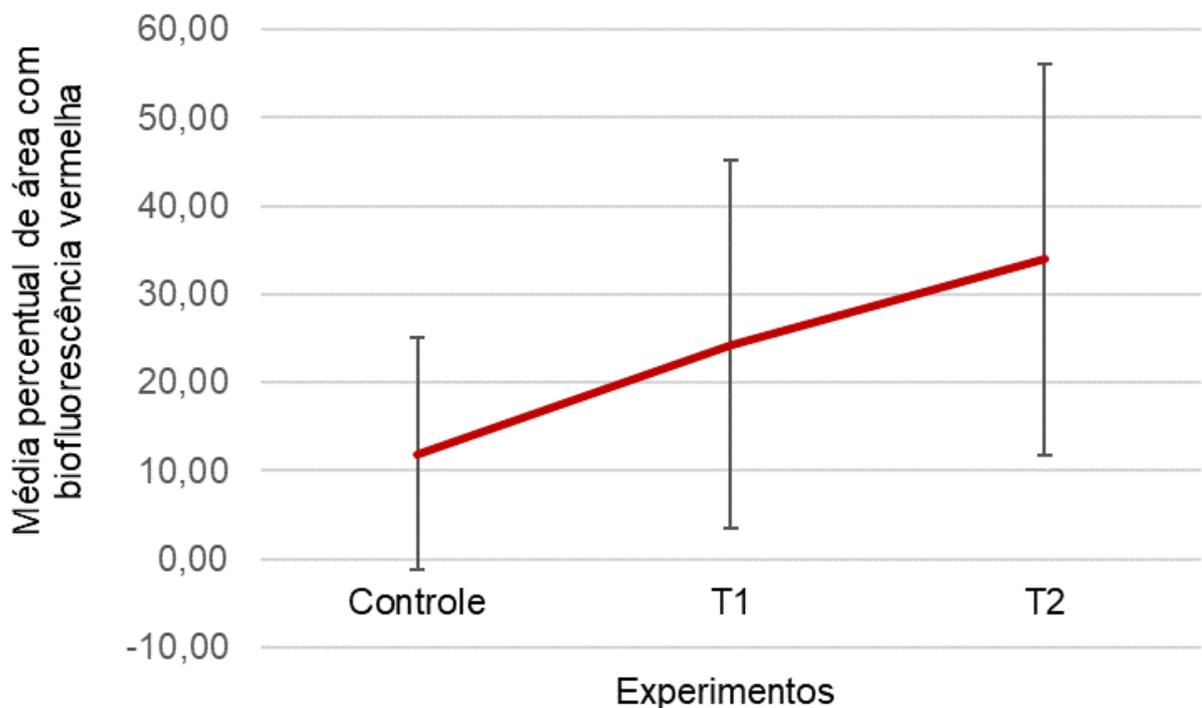
animais que apresentaram o comportamento de neofobia em relação ao objeto novo exibiram uma média de $11,40 \pm 15,64\%$ de área de cobertura vermelha durante o controle e $17,25 \pm 19,06\%$ durante o tratamento. A diferença média de $5,85 \pm 20,67\%$ indicou o aumento no percentual da área com biofluorescência vermelha nos animais que não se aproximaram do objeto novo. Os mesmos animais com comportamento neofóbico apresentaram, durante o controle, $9,55 \pm 7,21\%$ de área do corpo com biofluorescência verde e durante o tratamento, $9,00 \pm 10,27$. A diferença média de $-0,55 \pm 8,68\%$ indicou uma redução no percentual da área com biofluorescência verde. Os comportamentos de neofilia e neofobia também não tiveram relação significativa com as cores vermelha ($t = 1,069$, $df = 17$, $p = 0,3000$: Power test: 24,7%) e verde ($t = 0,4298$, $df = 13$, $p = 0,6744$: Power test: 18,37%).

Os cavalos-marinhos machos apresentaram uma média de biofluorescência vermelha de $14,20 \pm 15,33\%$ no controle e $24,83 \pm 18\%$ no tratamento, exibindo um aumento médio de sua área corporal com biofluorescência vermelha, de $10,64 \pm 19,43\%$. A biofluorescência verde nos machos teve uma média $3,39 \pm 3,98\%$ durante o controle e $5,21 \pm 8,40\%$ após o tratamento, exibindo uma resposta média de $1,82 \pm 6,69\%$ a mais na sua área corporal com a cor verde. As fêmeas de cavalo-marinho exibiram uma média de $7,75 \pm 8,31\%$ para a biofluorescência vermelha durante o controle e $18,85 \pm 22,62\%$ durante o tratamento, com uma diferença média de $11,10 \pm 19,38\%$ a mais na sua área de cobertura após o tratamento. Para a biofluorescência verde, apresentaram uma média de $8,08 \pm 7,10\%$ no controle e $6,71 \pm 8,25\%$ no tratamento, com uma resposta média de redução de $1,37 \pm 6,67\%$ na biofluorescência verde após o tratamento. Não houve diferença entre os sexos em relação à cor vermelha ($t = 0,05827$, $df = 21$, $p = 0,9541$: Power test: 8%), nem para a cor verde ($t = 1,169$, $df = 21$, $p = 0,2554$: Power test: 6,7%).

Os vinte e quatro indivíduos de cavalo-marinho analisados durante o experimento agonístico apresentaram uma média do percentual de área do corpo de $12,56 \pm 13,1\%$ com a cor vermelha durante o controle e $30,63 \pm 21,95\%$ durante o tratamento. Já a cor verde representou a média de $4,56 \pm 4,86\%$ do corpo dos animais durante o controle e $1,04 \pm 2,68\%$ durante o tratamento. A biofluorescência vermelha exibida pelos cavalos-marinhos durante o experimento agonístico apresentou diferença significativa entre o controle e tratamento ($t = 4,891$, $df = 23$, $p < 0,0001$: Power test: 97%), assim como para a biofluorescência verde ($t = 4,849$, $df = 23$, $p < 0,0001$: Power test: 98,5%).

Considerando que os experimentos com o objeto novo e de predação foram sequenciais, realizamos uma ANOVA de medidas repetidas para verificar variações significativas entre todos os tratamentos. Os resultados mostraram uma diferença significativa para a cor vermelha ($p < 0,0001$) (Figura 3.7) (Tabela 3.1) e para a cor verde ($p = 0,0002$) (Figura 3.8) (Tabela 3.2).

Figura 21 – Média de biofluorescência vermelha exibida pelos cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* durante os experimentos controle, objeto novo (T1) e de predação (T2).

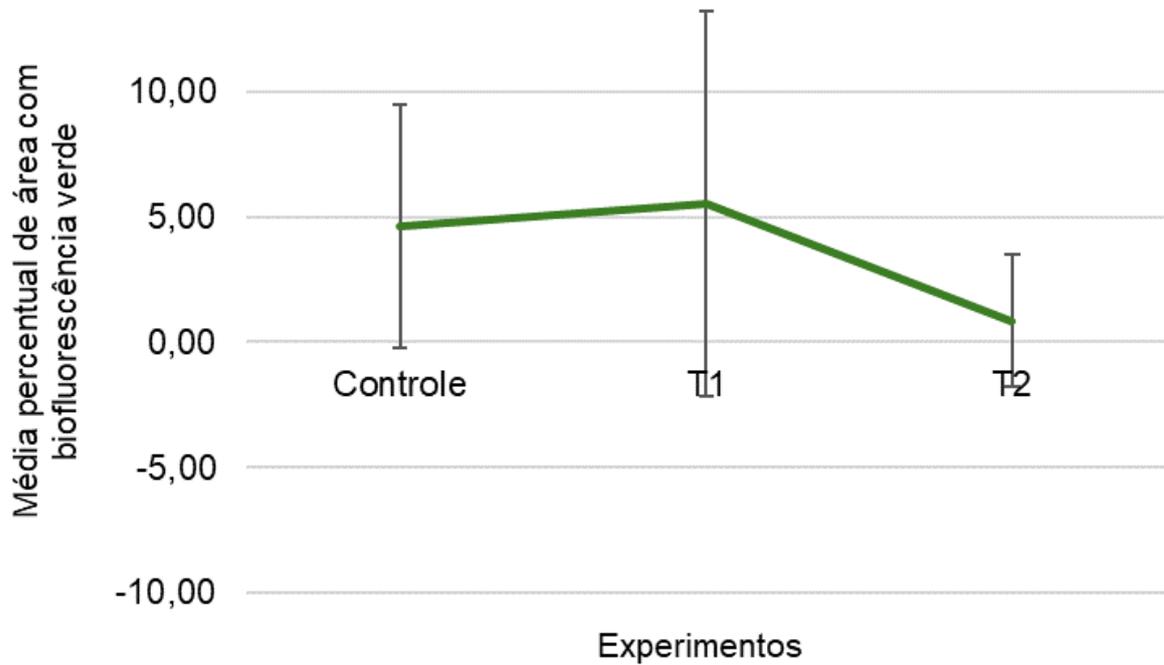


Legenda: Média de área corporal com biofluorescência vermelha durante o controle e os dois tratamentos realizados. T1 – tratamento objeto novo e T2 – tratamento agonístico.

Tabela 3 – Resultados da ANOVA de medida repetida para a cor vermelha entre o experimento controle e os dois tratamentos. T0: controle, T1: tratamento objeto novo, T2: tratamento agonístico.

	Diferença média	q	p
T0 X T1	-0,1744	4,508	$p < 0,01$
T0 X T2	-0,2959	7,649	$p < 0,001$
T1 X T2	-0,1215	3,141	$p > 0,05$

Figura 22 – Média de biofluorescência verde exibida pelos cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* durante os experimentos controle, objeto novo (T1) e de predação (T2).



Legenda: Média de área corporal com biofluorescência verde durante o controle e os dois tratamentos realizados. T1 – tratamento objeto novo e T2 – tratamento agonístico.

Tabela 4 – Resultados da ANOVA de medida repetida para a cor verde entre o experimento controle e os dois tratamentos. T0: controle, T1: tratamento objeto novo, T2: tratamento agonístico.

	Diferença média	q	p
T0 X T1	-0,01600	0,6617	$p > 0,05$
T0 X T2	0,1282	5,302	$p < 0,01$
T1 X T2	0,1442	5,964	$p < 0,001$

3.4 Discussão

O presente trabalho analisou a biofluorescência expressa pelo cavalo-marinho da espécie *H. reidi*, avaliando experimentalmente a relação entre a personalidade dos animais e a biofluorescência expressa em um ambiente com um objeto

desconhecido. Além disso verificamos a relação entre a biofluorescência expressa pelos animais em dois contextos diferentes: a presença de um objeto novo ao ambiente onde o animal encontrava-se, representando uma possível ameaça e uma predação, através da captura pela mão do pesquisador representando uma ameaça de nível maior.

Nossos dados mostraram a biofluorescência verde e vermelha expressa pelo cavalo-marinho *H. reidi* conforme já descrito na literatura para a espécie (VACCANI et al., 2019), sendo a cor vermelha representando maior área de cobertura corporal do que o verde.

Animais de personalidade 'tímida' exibiram um aumento significativo no percentual de área do corpo com a biofluorescência vermelha na presença do objeto novo. Já os animais com personalidade 'ousada' aumentaram a área do corpo quando apresentados ao mesmo cenário. Animais com personalidade 'tímida' tendem a ser mais reativos (SNEDDON, 2003) e, portanto, uma maior intensidade de resposta era esperada no caso da biofluorescência ser uma resposta comportamental ao contexto apresentado, conforme exibido pelos animais durante o experimento.

Quando analisamos os dados descartando a personalidade e levando em consideração as respostas comportamentais de neofilia ou neofobia, os animais que tiveram um comportamento neofóbico em relação ao objeto novo tiveram uma discreta redução na área de cobertura da biofluorescência verde, enquanto a vermelha teve um pequeno aumento. O comportamento de neofilia também não apresentou nenhuma relação com as cores da biofluorescência. Esses dados sugerem que o *display* comportamental em si não parece ter tido forte influência sobre a biofluorescência, mas sim os processos fisiológicos, possivelmente atrelados à personalidade do animal, possam ter contribuído, ou ser apenas um artefato da fisiologia. As diferentes personalidades de uma população podem ser avaliadas por diferentes contextos como a reação diante de novidades, interações sociais, oportunidades de reprodução e exploração de habitat, e as respostas à essas situações são classificadas dentro do *continuum* 'tímido-ousado' (CORR et al., 2013; FRERET-MEURER; ALVES, 2018). Nossos dados não indicaram que a biofluorescência funciona como resposta a novidades para diferentes personalidades do cavalo-marinho *H. reidi*.

Cavalos-marinhos machos ampliaram significativamente a sua área de cobertura com biofluorescência vermelha, enquanto para a cor verde houve um discreto aumento. Já as fêmeas também ampliaram a área corporal com biofluorescência vermelha, enquanto houve uma discreta redução da área de cobertura da biofluorescência verde. Não encontramos diferença entre os padrões apresentados por machos e fêmeas em resposta ao experimento com o objeto novo. A biofluorescência também não variou entre os sexos para a espécie de caranguejo *Paralithodes camtschaticus* diante de uma situação de estresse (JUHASZ-DORA et al., 2024b). Padrões biofluorescentes sexualmente dimórficos são conhecidos no ambiente marinho para tubarões (GRUBER et al., 2016), e em uma espécie de peixe (JUHASZ-DORA et al., 2024a), porém não existem estudos que relacionem a biofluorescência como resposta para os ambos os sexos.

Quando os animais foram imobilizados durante o experimento agonístico, pode-se observar uma diferença significativa entre a biofluorescência exibida entre o controle e tratamento para ambas as cores. A biofluorescência na cor vermelha aumentou durante a imobilização do animal, enquanto a cor verde diminuiu significativamente. Esses dados mostram que a biofluorescência responde ao estresse a nível de imobilização para o cavalo-marinho da espécie *H. reidi*. Uma resposta semelhante a um comportamento de estresse foi encontrada por Juhasz-Dora et al. (2024a) observando que a biofluorescência respondeu a um estressor terapêutico em um experimento controlado com uma espécie de peixe (*lumpfish*) utilizando banhos de água doce, porém, os autores não mediram as modificações de coloração através de imagens, e sim de medições com espectrofotômetro. Esta espécie também possui biofluorescência nas cores vermelha e verde, porém foi encontrado aumento para a cor verde, enquanto no presente estudo o cavalo-marinho apresentou aumento na cor vermelha e redução da área verde. A biofluorescência também foi considerada respondendo ao estímulo estressor de transporte para os caranguejos de cativeiro da espécie *Paralithodes camtschaticus*, incluindo a mudança de cores, onde indivíduos de caranguejo com biofluorescência verde passaram a exibir fluorescência vermelha (JUHASZ-DORA et al. 2024b). Esses dados sugerem que a biofluorescência pode estar intimamente relacionada a processos fisiológicos do estresse.

Quando comparamos os dois níveis de estresse ao qual o cavalo-marinho foi submetido, encontramos em nossos dados uma diferença significativa para a cor

vermelha quando comparado o controle com o tratamento com o objeto novo e o controle com a predação pela mão do pesquisador. Já a cor verde apresentou diferença entre o controle e o experimento com a predação, assim como a diferença entre o tratamento com o objeto novo e a predação. Esses dados mostram que o experimento de predação apresentou uma maior tendência à modificação na resposta de biofluorescência. Esses dados sugerem que a biofluorescência vermelha respondeu significativamente aos dois níveis de estresse, enquanto o verde foi significativo apenas em relação a predação. Wucherer e Michiels (2012) observaram que os cromatóforos, células responsáveis pela distribuição dos pigmentos fluorescentes em peixes podem ser controlados por meio do sistema nervoso e hormonal, corroborando a hipótese de que a biofluorescência pode ser modificada de acordo com o nível de estresse desses animais.

Ao comparar os dois tratamentos, houve uma maior diferença durante a predação para as duas cores de biofluorescência quando comparado ao objeto novo. O nível de energia de um animal é um fator importante, apresentando influência significativa na capacidade de sobrevivência dos animais (ZHANG et al., 2019), e o risco de predação pode comprometer o gerenciamento de energia (PÉREZ-TRIS et al., 2004). Acreditamos que nos experimentos realizados com os cavalos-marinhos, a biofluorescência não foi tão significativa na presença do objeto novo pois o animal possuía outras alternativas frente à situação nova, como utilizar o gasto energético para fugir, ou se camuflar, enquanto no experimento de predação, como o risco era maior, por já estar imobilizado pela mão do pesquisador, houve um maior gasto energético no aumento da biofluorescência corporal vermelha.

Os resultados obtidos no presente estudo sustentaram a hipótese de diferença no padrão da biofluorescência para indivíduos de cavalos-marinhos com personalidade 'tímida', porém, sem relação com o comportamento em relação ao objeto novo. Encontramos também diferença na resposta ao estresse de captura do animal. Nossas descobertas indicam que indivíduos de cavalo-marinho da espécie *H. reidi* utilizam a biofluorescência como resposta ao estresse, representado principalmente pela biofluorescência vermelha. Esses dados sugerem que os processos fisiológicos de estresse, incluindo a personalidade tímida podem ter relação com a biofluorescência expressa pelos animais. Como nossos experimentos não foram realizados de forma aleatória e não houve intervalo de execução entre eles, não podemos afirmar que o experimento agonístico apresentou uma maior

resposta por ser um maior grau de ameaça, porém os dados indicam uma possível relação, que pode ser confirmada expondo os indivíduos de forma independente aos dois tipos de estresse.

Nossas descobertas contribuem para a descoberta de uma função da biofluorescência para os cavalos-marinhos, sugerindo uma possível ligação direta com o nível de estresse e visando assim ampliar e contribuir com estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ANTHONY, Carl D. et al. Sexually dimorphic biofluorescence of the postcloacal gland in the terrestrial salamander, *Plethodon cinereus*. **Journal of Herpetology**, v. 57, n. 3, p. 262-269, 2023.
- ARNOLD, Kathryn E.; OWENS, Ian PF; MARSHALL, N. Justin. Fluorescent signaling in parrots. **Science**, v. 295, n. 5552, p. 92-92, 2002.
- BRADBURY, Jack W., and Sandra Lee VEHCAMP. **Principles of animal communication**. Vol. 132. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998.
- CALSBEEK, Brittny; HASSELQUIST, Dennis; CLOBERT, J. Multivariate phenotypes and the potential for alternative phenotypic optima in wall lizard (*Podarcis muralis*) ventral colour morphs. **Journal of evolutionary biology**, v. 23, n. 6, p. 1138-1147, 2010.
- CORR, Philip J.; DEYOUNG, Colin G.; MCNAUGHTON, Neil. Motivation and personality: A neuropsychological perspective. **Social and Personality Psychology Compass**, v. 7, n. 3, p. 158-175, 2013.
- CUTHILL, Innes C. et al. The biology of color. **Science**, v. 357, n. 6350, p. eaan0221, 2017.
- DOUGHERTY, Liam R.; GUILLETTE, Lauren M. Linking personality and cognition: a meta-analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1756, p. 20170282, 2018.
- ENDLER, John A. Signals, signal conditions, and the direction of evolution. **The American Naturalist**, v. 139, p. S125-S153, 1992.

- ENDLER, John A. The color of light in forests and its implications. **Ecological monographs**, v. 63, n. 1, p. 1-27, 1993.
- FRERET-MEURER, Natalie V.; ALVES, Maria Alice S. Personality in the longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933: Are males shyer than females? **Behavioural processes**, v. 157, p. 106-110, 2018.
- FRERET-MEURER, N. et al. Population dynamics of the endangered seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 in a tropical rocky reef habitat. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 41, n. 2, p. 345-356, 2018.
- FRERET-MEURER, Natalie Villar et al. A snapshot of a high density seahorse population in a tropical rocky reef. **Journal of Natural History**, v. 52, n. 23-24, p. 1571-1580, 2018.
- FROMMEN, Joachim G. Aggressive communication in aquatic environments. **Functional Ecology**, v. 34, n. 2, p. 364-380, 2020.
- GRINSTED, L. et al. Individual personalities shape task differentiation in a social spider (Expression of Concern of Vol 280, art no 20131407, 2013). **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 287, n. 1926, 2020.
- GRUBER, David F. et al. Biofluorescence in catsharks (Scyliorhinidae): fundamental description and relevance for elasmobranch visual ecology. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24751, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24751>.
- HAYASHI, Kina et al. Colour patterns influence symbiosis and competition in the anemonefish–host anemone symbiosis system. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 289, n. 1984, p. 20221576, 2022.
- HEBETS, Eileen A.; PAPA, Daniel R. Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 57, p. 197-214, 2005.
- HEINERMANN, P. H. Yellow intraocular filters in fishes. **Experimental Biology**, v. 43, n. 2, p. 127-147, 1984.
- HOUDE, Anne E.; ENDLER, John A. Correlated evolution of female mating preferences and male color patterns in the guppy *Poecilia reticulata*. **Science**, v. 248, n. 4961, p. 1405-1408, 1990.
- JUHASZ-DORA, Thomas et al. Biofluorescent response in lumpfish *Cyclopterus lumpus* to a therapeutic stressor as assessed by hyperspectral imaging. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 2982, 2024a.
- JUHASZ-DORA, Thomas et al. Investigation of biofluorescence produced by the red king crab *Paralithodes camtschaticus*. **Aquaculture, Fish and Fisheries**, v. 4, n. 2, p. e159, 2024b.

- JUHASZ-DORA, Thomas et al. Assessing the potential of fluorescence as a monitoring tool for reproductive tissue in selected macroalgae species. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-7, 2024c.
- KALB, Nadine et al. The red-fluorescing marine fish *Tripterygion delaisi* can perceive its own red fluorescent colour. **Ethology**, v. 121, n. 6, p. 566-576, 2015.
- KING, Teisha et al. Behavior and neural activation patterns of non-redundant visual and acoustic signaling during courtship in an African cichlid fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 225, n. 18, p. jeb244548, 2022.
- KIRK, John TO. Effects of suspensoids (turbidity) on penetration of solar radiation in aquatic ecosystems. **Hydrobiologia**, v. 125, p. 195-208, 1985.
- KJERFVE, Björn et al. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. **Continental Shelf Research**, v. 17, n. 13, p. 1609-1643, 1997.
- KOOLHAAS, Jaap M. et al. Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. **Brain Behavior and Evolution**, v. 70, n. 4, p. 218-226, 2007.
- LOURIE, Sara A.; VINCENT, Amanda CJ; HALL, Heather J. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. **(No Title)**, 1999.
- MCGRAW, Kevin J. et al. A description of unique fluorescent yellow pigments in penguin feathers. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 4, p. 301-304, 2007.
- MICHELENA, Pablo et al. Effects of group size and personality on social foraging: the distribution of sheep across patches. **Behavioral Ecology**, v. 20, n. 1, p. 145-152, 2009.
- OLOFSSON, Martin et al. Marginal eyespots on butterfly wings deflect bird attacks under low light intensities with UV wavelengths. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10798, 2010.
- PIKE, Thomas W. et al. Behavioural phenotype affects social interactions in an animal network. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1650, p. 2515-2520, 2008.
- PITCHER, Tony J. **The behaviour of teleost fishes**. Springer Science & Business Media, 2012.
- PÉREZ-TRIS, Javier; DÍAZ, José A.; TELLERÍA, José Luis. Loss of body mass under predation risk: cost of antipredatory behaviour or adaptive fit-for-escape? **Animal Behaviour**, v. 67, n. 3, p. 511-521, 2004.
- RESENDE, Paloma Silva et al. A global review of animal translocation programs. 2020.

- ROSA, Irecê Lucena et al. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 405-414, 2007.
- SIH, Andrew; BELL, Alison; JOHNSON, J. Chadwick. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 7, p. 372-378, 2004.
- SNEDDON, L. U. The bold and the shy: individual differences in rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 4, p. 971-975, 2003.
- STAMPS, Judy; GROOTHUIS, Ton GG. The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives. **Biological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 301-325, 2010.
- TABOADA, Carlos et al. Naturally occurring fluorescence in frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. 3672-3677, 2017.
- VACCANI, Amanda C. et al. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. e0220561, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220561>
- VALENTIN, J. L. et al. Caractéristiques hydrobiologiques de la baie de Guanabara (Rio de Janeiro, Brésil). **Journal de Recherche Océanographique**, v. 24, n. 1, p. 33-41, 1999.
- RÉALE, Denis et al. Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1560, p. 3937-3946, 2010.
- SPARKS, John S. et al. The covert world of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83259, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083259>
- WRIGHT, Colin M.; HOLBROOK, C. Tate; PRUITT, Jonathan N. RETRACTED: Animal personality aligns task specialization and task proficiency in a spider society. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, p. 9533-9537, 2014.
- WUCHERER, Matthias F.; MICHIELS, Nico K. A fluorescent chromatophore changes the level of fluorescence in a reef fish. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37913, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037913>
- ZHANG, Shuai et al. Stay-eat or run-away: Two alternative escape behaviors. **Physics letters A**, v. 383, n. 7, p. 593-599, 2019.

DISCUSSÃO

Os resultados gerais da tese demonstram que a evolução da biofluorescência reflete processos adaptativos, onde a predominância do número de espécies biofluorescentes e de diferentes padrões de cores suportam as hipóteses “fora dos trópicos” (Capítulo 1), que sugere que os clados se originaram nos trópicos e tendem a uma expansão da sua distribuição (JABLONSKI et al., 2006) e “velocidade evolutiva” que propõe que diferentes taxas de processos biológicos resultam em diferentes taxas de especiação (ALLEN et al., 2007). A coloração possui uma função ecológica importante nos peixes (MARSHALL et al., 2015), e o crescente conhecimento acerca da biofluorescência sugere que esse fenômeno pode desempenhar papéis ecológicos e comportamentais. A ordem Syngnathiformes apresenta distribuição circunglobal, com ampla diversidade de formas corporais, cores e hábitos (STILLER et al., 2022) e se mostrou um bom modelo para estudos com biofluorescência devido ao elevado número de espécies já descritas na literatura.

Apesar do crescente número de artigos publicados na literatura abordando o tema, nossa revisão bibliográfica encontrou um número reduzido de artigos publicados, indicando que a biofluorescência ainda é pouco discutida, e existem muitas lacunas. Vale ressaltar a importância da realização de imagens não só para ilustrar a pesquisa, mas também para validar os dados, e facilitar a compreensão de outros pesquisadores.

As imagens são ferramentas importantes pois também podem funcionar como fonte de dados. A produção do conhecimento científico possui pluralidade quanto às técnicas graças ao avanço tecnológico, e a fotografia é um recorte do real (Rios et al., 2016), porém as imagens costumam ser passíveis de múltiplas interpretações. A fotografia pode ser utilizada na pesquisa científica de várias formas, servindo como objeto de pesquisa, resultado (DOS SANTOS, 2000), ou uma combinação dessas categorias (WARREN, 2009). Porém, para ser utilizada com fins científicos a forma de analisar as imagens é tão importante quanto a fotografia, e deve ser realizada seguindo protocolos e planejamentos.

A fotografia de biofluorescência possui condições especiais para serem realizadas e a iluminação é peça fundamental para uma imagem fiel e eficiente para uma boa análise. Alguns métodos científicos foram utilizados para analisar a biofluorescência, e a comparação desses métodos visando a padronização de metodologias (Capítulo 2) se faz necessário para que o método seja reconhecido pela comunidade científica e utilizado de forma a ser comparado. Nossos resultados compararam três softwares como metodologias utilizadas para a análise de imagens, assim evidenciamos os pontos positivos e negativos de cada software elencando suas possíveis aplicações. Um novo *script* do software *Python* foi sugerido para as análises e esperamos contribuir para a padronização de um software aceito pela comunidade científica facilitando a análise de imagens e contribuindo para possíveis descobertas de padrões de biofluorescência e possíveis funções para diversos grupos taxonômicos.

Algumas funções da biofluorescência estão documentadas na literatura para vários grupos taxonômicos, podendo funcionar para comunicação, atração de presas, reconhecimento intraespecífico, diferenciação sexual, entre outros (SPARKS et al., 2014; KALB et al., 2015; GRUBER; SPARKS, 2021; COX; FITZPATRICK, 2023). Essas descobertas são fundamentais para o conhecimento da biologia das espécies. Entre as espécies de peixes de recife, os cavalos-marinhos são conhecidos pela sua capacidade de mudar de coloração para comunicação e camuflagem. Realizamos testes experimentais em cativeiro para verificar se a biofluorescência pode ser uma resposta à diferentes níveis de estresse ao cavalo-marinho da espécie *Hippocampus reidi* (Capítulo 3). Foi possível observar que os animais exibiram duas cores de biofluorescência já descritas na literatura para a espécie (VACCANI et al., 2019) e que os diferentes níveis de estresse produziram diferentes respostas significativas na expressão da biofluorescência dos animais.

Os dados reunidos através do desenvolvimento desta tese nos permitiram compilar dados existentes na literatura sobre biofluorescência até o momento, identificando lacunas e sugerindo que a evolução da biofluorescência pode estar diretamente ligada à evolução das espécies. Enfatizamos a ordem dos Syngnathiformes como bons modelos para estudos relacionados à biofluorescência e através da necessidade de padronizar métodos de análises para futuros estudos, sugerimos metodologias para serem utilizadas em futuras observações. Além disso, dados experimentais revelaram que a biofluorescência pode funcionar como

resposta à níveis de estresse de cavalos-marinhos, e nossos dados podem servir como material de referência para novos estudos experimentais não só com cavalos-marinhos, mas com outros grupos taxonômicos. Embora ainda existam muitas lacunas no conhecimento da biofluorescência, nossos dados representam um material de referência para novos estudos. Os artigos científicos derivados desta tese contribuem, portanto para uma padronização de análise de biofluorescência, levantamento de lacunas ainda existentes e a descoberta de uma nova possível relação funcional da biofluorescência para cavalos-marinhos, podendo direcionar futuros estudos e contribuir com o conhecimento da ecologia da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, Andrew P. et al. Recasting the species-energy hypothesis: the different roles of kinetic and potential energy in regulating biodiversity. **Scaling Biodiversity**, v. 1, 2007.
- BRADBURY, Jack W., and Sandra Lee VEHCAMP. **Principles of Animal Communication**. Vol. 132. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998.
- BRECKO, Jonathan; PAUWELS, Olivier SG. Biofluorescence of the Crocodile Skinks, genus *Tribolonotus*: first report in Scincidae. **Herpetology Notes**, v. 17, p. 411-418, 2024.
- BUCHANAN-SMITH, Hannah M. Recent advances in color vision research. **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 67, n. 4, p. 393-398, 2005.
- CHIAO, Chuan-Chin; CRONIN, Thomas W.; OSORIO, Daniel. Color signals in natural scenes: characteristics of reflectance spectra and effects of natural illuminants. **Journal of the Optical Society of America A**, v. 17, n. 2, p. 218-224, 2000.
- COCKAYNE, E. A. I. The distribution of fluorescent pigments in Lepidoptera. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, v. 72, n. 1-2, p. 1-19, 1924.
- COX, Jonathan L.; FITZPATRICK, Benjamin M. Biofluorescent sexual dimorphism revealed in a southern Appalachian endemic salamander, *Plethodon metcalfi*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3588, 2023.
- DAWKINS, Richard; KREBS, John R. Animal signals: information or manipulation? 1978.
- DAWKINS, Marian Stamp. Are there general principles of signal design? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 340, n. 1292, p. 251-255, 1993.
- DOS SANTOS, Patrícia Lessa. A imagem enquanto fonte de pesquisa: a fotografia publicitária. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 2, n. 2, p. 63-68, 2000.
- DUSENBERY, David B. **Sensory ecology: how organisms acquire and respond to information**. New York: WH Freeman, 1992.
- ENDLER, John A.; MAPPES, Johanna. The current and future state of animal coloration research. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1724, p. 20160352, 2017.

- GRUBER, David F.; SPARKS, John S. First report of biofluorescence in Arctic snailfishes and rare occurrence of multiple fluorescent colors in a single species. **American Museum Novitates**, v. 2020, n. 3967, p. 1-12, 2021.
- GUILFORD, Tim; DAWKINS, Marian Stamp. What are conventional signals? **Animal Behaviour**, v. 49, n. 6, p. 1689-1695, 1995.
- GRAY, Russell; KARLSSON, Catharina. 101 years of biofluorescent animal studies: trends in literature, novel hypotheses, and best practices moving forward. 2022.
- HAKANSON, Emma C. et al. Techniques for documenting and quantifying biofluorescence through digital photography and color quantization. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 12, p. 100149, 2022.
- HASSON, Oren. Cheating signals. **Journal of Theoretical Biology**, v. 167, n. 3, p. 223-238, 1994
- HAUSER, Marc D. **The evolution of communication**. MIT press, 1996.
- HURD, Peter L. Communication in discrete action-response games. **Journal of Theoretical Biology**, v. 174, n. 2, p. 217-222, 1995.
- ICMBio. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**, v. 6, Peixes. Brasília: ICMBio, 2018.
- IRIEL, Analía; LAGORIO, María Gabriela. Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? **Naturwissenschaften**, v. 97, p. 915-924, 2010.
- JABLONSKI, Nina G. **Skin: A natural history**. Univ of California Press, 2006.
- JOHNSTONE, Rufus A. The evolution of animal signals. **Behavioural Ecology: an evolutionary approach**, v. 155178, 1997.
- KALB, Nadine et al. The red-fluorescing marine fish *Tripterygion delaisi* can perceive its own red fluorescent colour. **Ethology**, v. 121, n. 6, p. 566-576, 2015.
- LAMB, Jennifer Y.; DAVIS, Matthew P. Salamanders and other amphibians are aglow with biofluorescence. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2821, 2020.
- LEVINE, Joseph S.; LOBEL, Phillip S.; MACNICHOL, Edward F. Visual communication in fishes. **Environmental Physiology of fishes**, p. 447-475, 1980.
- LOURIE, Sara A.; VINCENT, Amanda CJ; HALL, Heather J. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. **(No Title)**, 1999.
- MARSHALL, Justin; CARLETON, Karen L.; CRONIN, Thomas. Colour vision in marine organisms. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 34, p. 86-94, 2015.

- MARSHALL, Justin; JOHNSEN, Sonke. Fluorescence as a means of colour signal enhancement. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1724, p. 20160335, 2017.
- MOTTRAM, J. C.; COCKAYNE, E. A. Fluorescence in Lepidoptera. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, v. 1920, p. 36-39, 1920.
- OLIVEIRA, T.; POLLOM, R. *Hippocampus reidi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e. T10082A17025021. 2017.
- OWINGS, Donald H.; MORTON, Eugene S. **Animal vocal communication: a new approach**. Cambridge University Press, 1998.
- PINTO, Daniel Zaroni. Aplicação de LEDs de luminescência branca para iluminação. 2013.
- RIOS, Sadraque Oliveira; COSTA, Jean Mario Araujo; MENDES, Vera Lucia Peixoto Santos. A fotografia como técnica e objeto de estudo na pesquisa qualitativa. **Discursos fotográficos**, v. 12, n. 20, p. 98-120, 2016.
- SALIH, Anya et al. Fluorescent pigments in corals are photoprotective. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 850-853, 2000.
- SALIS, Pauline et al. Magic traits in magic fish: understanding color pattern evolution using reef fish. **Trends in Genetics**, v. 35, n. 4, p. 265-278, 2019.
- SIEBECK, Ulrike E.; Marshall, Justin N. Transmission of ocular media in labrid fishes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 355.1401: 1257-1261, 2000.
- SPARKS, John S. et al. The covert world of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83259, 2014.
- STILLER, Josefin et al. Phylogenomic analysis of Syngnathidae reveals novel relationships, origins of endemic diversity and variable diversification rates. **BMC Biology**, v. 20, n. 1, p. 75, 2022.
- VACCANI, Amanda C. et al. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. e0220561, 2019.
- VUKUSIC, Pete; HOOPER, Ian. Directionally controlled fluorescence emission in butterflies. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1151-1151, 2005.
- WARREN, Samantha. Visual methods in organizational research. In: Bryman, Alan and Buchanan, David (eds.). **Handbook of Organizational Research Methods**, London: SAGE Publications Ltd, pp. 566-582. 2009.
- WILEY, R. H. Errors, exaggeration, and deception in animal communication. In: Real, LA (ed.), **Behavioral mechanisms in evolutionary ecology**. 1994.

APÊNDICE A – Lista de referências obtidas por meio da pesquisa eletrônica sobre a biofluorescência em peixes ósseos. Material suplementar do Capítulo 1 “Variação geográfica nos padrões de biofluorescência entre peixes ósseos marinhos da ordem Syngnathiformes: uma revisão”.

ANTHES, Nils et al. Diversity and ecological correlates of red fluorescence in marine fishes. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 126, 2016. doi:10.3389/fevo.2016.00126

BITTON, Pierre-Paul et al. Red fluorescence of the triplefin *Tripterygion delaisi* is increasingly visible against background light with increasing depth. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 3, p. 161009, 2017. doi:10.1098/rsos.161009

BRAUN, Christoph et al. Signalling function of long wavelength colours during agonistic male-male interactions in the wrasse *Coris julis*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 504, p. 277-286, 2014. <https://doi.org/10.3354/meps10760>

COHEN, Karly E.; SUMMERS, Adam P. Dimorphic fluorescence in the pacific spiny lumpsucker. **Ichthyology & Herpetology**, v. 110, n. 2, p. 350-353, 2022. <https://doi.org/10.1643/i2021019>

DE BRAUWER, Maarten; HOBBS, Jean-Paul A. Stars and stripes: biofluorescent lures in the striated frogfish indicate role in aggressive mimicry. **Coral Reefs**, v. 35, n. 4, p. 1171-1171, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1493-1>

DE BRAUWER, Maarten et al. Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. **Conservation Biology**, v. 32, n. 3, p. 706-715, 2018. doi:10.1111/cobi.13033

DE BRAUWER, Maarten; HOBBS, Jean-Paul A.; JOMPA, Jamaluddin. Widespread low abundance despite habitat availability elevates extinction risk in pygmy seahorses. **Coral Reefs**, v. 39, n. 4, p. 847-852, 2020. doi:10.1007/s00338-020-01913-x

GERLACH, Tobias; SPRENGER, Dennis; MICHIELS, Nico K. Fairy wrasses perceive and respond to their deep red fluorescent coloration. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1787, p. 20140787, 2014. <http://doi.org/10.1098/rspb.2014.0787>

GERLACH, Tobias et al. Fluorescence characterisation and visual ecology of *Pseudocheiliniid* wrasses. **Frontiers in Zoology**, v. 13, p. 1-8, 2016. doi:10.1186/s12983-016-0145-1

- GRUBER, David F. et al. Adaptive evolution of eel fluorescent proteins from fatty acid binding proteins produces bright fluorescence in the marine environment. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0140972, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0140972
- GRUBER, David F.; SPARKS, John S. First report of biofluorescence in Arctic snailfishes and rare occurrence of multiple fluorescent colors in a single species. **American Museum Novitates**, v. 2020, n. 3967, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1206/3967.1>
- HADDOCK, Steven HD; DUNN, Casey W. Fluorescent proteins function as a prey attractant: experimental evidence from the hydromedusa *Olindias formosus* and other marine organisms. **Biology open**, v. 4, n. 9, p. 1094-1104, 2015. doi: 10.1242/bio.012138.
- HAMIED, Atyaf et al. Identification and characterization of highly fluorescent pigment cells in embryos of the Arabian killifish (*Aphanius Dispar*). **Iscience**, v. 23, n. 11, 2020. doi:10.1016/j.isci.2020.101674
- HARANT, Ulrike Katharina; MICHIELS, Nicolaas Karel. Fish with red fluorescent eyes forage more efficiently under dim, blue-green light conditions. **BMC ecology**, v. 17, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12898-017-0127-y>
- HARANT, Ulrike K. et al. Do the fluorescent red eyes of the marine fish *Tripterygion delaisi* stand out? In situ and in vivo measurements at two depths. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 9, p. 4685-4694, 2018. doi:10.1002/ece3.4025
- HARANT, Ulrike Katharina et al. Does red eye fluorescence in marine fish stand out? In situ and in vivo measurements at two depths. **bioRxiv**, p. 174045, 2017. doi: <https://doi.org/10.1101/174045>
- JUHASZ-DORA, Thomas et al. First record of biofluorescence in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*), a commercially farmed cleaner fish. **Journal of Fish Biology**, v. 101, n. 4, p. 1058-1062, 2022. <https://doi.org/10.1111/jfb.15154>
- KALB, Nadine et al. The red-fluorescing marine fish *Tripterygion delaisi* can perceive its own red fluorescent colour. **Ethology**, v. 121, n. 6, p. 566-576, 2015. doi:10.1111/eth.12367
- KOHLER, Allison M. et al. Ultraviolet fluorescence discovered in New World flying squirrels (*Glaucomys*). **Journal of Mammalogy**, v. 100, n. 1, p. 21-30, 2019.
- KUMAGAI, Akiko et al. A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. **Cell**, v. 153, n. 7, p. 1602-1611, 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.05.038.
- LUDT, William B.; CLARDY, Todd R. First detection of biofluorescence in a deep-sea anglerfish. **Journal of Fish Biology**, v. 100, n. 3, p. 843-846, 2022. doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.14988>.

- MEADOWS, Melissa G. et al. Red fluorescence increases with depth in reef fishes, supporting a visual function, not UV protection. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1790, p. 20141211, 2014. doi:10.1098/rspb.2014.1211.
- MICHIELS, Nico K. et al. Red fluorescence in reef fish: a novel signalling mechanism?. **BMC ecology**, v. 8, p. 1-14, 2008. doi:10.1186/1472-6785-8-16.
- MICHIELS, Nico K. et al. Controlled iris radiance in a diurnal fish looking at prey. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 2, p. 170838, 2018. doi 10.1098/rsos.170838.
- MIYAMOTO, Kei; MCMAHAN, Caleb D.; KANEKO, Atsushi. *Parascolopsis akatamae*, a new species of dwarf monocle bream (Perciformes: Nemipteridae) from the Indo-West Pacific, with redescription of closely related species *P. eriomma*. **Zootaxa**, v. 4881, n. 1, p. 91–103-91–103, 2020.. doi:10.11646/zootaxa.4881.1.6.
- SPARKS, John S. et al. The covert world of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83259, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0083259.
- VACCANI, Amanda C. et al. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. **Plos one**, v. 14, n. 8, p. e0220561, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220561>.

APÊNDICE B – Script R. Material suplementar do Capítulo 2 “O uso de diferentes ferramentas para análise de biofluorescência: calibrando a confiança de métodos de análise”.

```
# patternize registration/RGB analysis of Hippocampus
# load patternize library
library(patternize)
# make sure these dependencies are installed:
#install.packages("rgdal","abind","raster","sp","RniftyReg")
library(devtools)
#install_github("zarquon42b/Morpho", local=FALSE)
library(Morpho)
library(rgdal)
# av <- available.packages(filters=list())
# av[av[, "Package"] == 'RNiftyReg', ]
# View(av)
library(abind)
library(raster)
library(sp)
# library(RniftyReg) # RNiftyReg?
library(RNiftyReg)
# The viridis package provides colour blind friendly colour schemes
# install.packages("viridis")
library(viridis)
# Lists with samples
IDList <- c('DSC_0011_CF132',
            'DSC_0020. CM110',
            'DSC_0039.CM111',
            'DSC_0103.CF130',
            'DSC_0231_CF137',
            'DSC_0263.CM118',
            'DSC_0312.CM119',
```

```

'DSC_0382.CM103',
'DSC_0417.CM105',
'DSC_0452.CF128',
'DSC_0572.CM115',
'DSC_0592.CM113',
'DSC_0613.CM114',
'DSC_0626.CM112',
'DSC_0644.CF133',
'DSC_0660_CF147',
'DSC_0688_CF134',
'DSC_0715.CM126',
'DSC_0845_CF151',
'DSC_0887_CF152',
'DSC_1016.CM135',
'DSC_03342_CF138',
'DSC_03912_CF139',
'DSC_09892_FC156')
# make list with landmarks
prepath <- 'landmarks/CapMetodo'
extension <- '.txt'
landmarkList <- makeList(IDList, 'landmark', prepath, extension)
# make list with images
prepath <- 'images/CapMetodo'
extension <- '.jpg'
imageList <- makeList(IDList, 'image', prepath, extension)
# transformref
target <- landmarkList[['DSC_0382.CM103']]
# run alignment of color patterns
RGB <- c(171,77,20) # red
# RGB <- c(110,172,3) # verde
rasterList_lanRGB <- patLanRGB(imageList, landmarkList, RGB, transformRef =
target, resampleFactor = 3, colOffset = 0.15, crop = TRUE, res = 200, adjustCoords =
TRUE, plot = 'stack')
# sum the colorpatterns

```

```
summedRaster_lanRGB <- sumRaster(rasterList_lanRGB, IDList, type = 'RGB')
# plot heatmap
outline_DSC_0124_CF131 <-
read.table('cartoon/DSC_0124_CF131_bold_outline.txt', h= F)
colfunc <- inferno(100)
plotHeat(summedRaster_lanRGB, IDList, plotCartoon = TRUE, refShape = 'target',
outline = outline_DSC_0124_CF131, landList = landmarkList, adjustCoords = TRUE,
imageList = imageList, cartoonID = 'DSC_0124_CF131_bold', cartoonFill = 'black',
cartoonOrder = 'under', colpalette = colfunc)
# Calculate colored areas
Area <- patArea(rasterList_lanRGB, IDList, refShape = 'target', type = 'RGB', outline
= outline_DSC_0124_CF131, landList = landmarkList, crop = c(0,5000,0,4000),
adjustCoords = TRUE, imageList = imageList, cartoonID = 'DSC_0124_CF131_bold',
flipRaster = 'xy')
Area
```

APÊNDICE C – Script Python. Material suplementar do Capítulo 2 “O uso de diferentes ferramentas para análise de biofluorescência: calibrando a confiança de métodos de análise”.

```
def calculate_color_percentage(image_path):
    image = cv2.cvtColor(cv2.imread(image_path), cv2.COLOR_BGR2RGB)
    # image = cv2.cvtColor(remove(cv2.imread(image_path)),
cv2.COLOR_BGR2RGB)

    if image is None:
        raise ValueError("Unable to read the image file. Please check the file path.")

    lower_green = np.array([25,118,1])
    upper_green = np.array([110,173,3])

    lower_red = np.array([68,22,0])
    upper_red = np.array([255,141,78])

    mask_black = cv2.inRange(image, np.array([0, 0, 0]), np.array([0, 0, 0]))
    mask_green = cv2.inRange(image, lower_green, upper_green)
    mask_red = cv2.inRange(image, lower_red, upper_red)

    total_pixels = image.shape[0] * image.shape[1]
    black_pixels = cv2.countNonZero(mask_black)
    green_pixels = cv2.countNonZero(mask_green)
    red_pixels = cv2.countNonZero(mask_red)
    black_percentage = (black_pixels / total_pixels) * 100
    green_percentage = (green_pixels / (total_pixels - black_pixels)) * 100
    red_percentage = (red_pixels / (total_pixels - black_pixels)) * 100
    plt.figure(figsize=(10, 5));
    plt.subplot(2, 3, 1);
    plt.imshow(cv2.cvtColor(cv2.imread(image_path), cv2.COLOR_BGR2RGB));
    plt.title('Original Image');
```

```
plt.axis('off');
plt.subplot(2, 3, 2);
plt.imshow(image);
plt.title('Treated Image');
plt.axis('off');
plt.subplot(2, 3, 3);
plt.imshow(mask_black, cmap='gray');
plt.title('Black mask');
plt.axis('off');
plt.subplot(2, 3, 4);
plt.imshow(mask_green, cmap='gray');
plt.title('Green Mask');
plt.axis('off');
plt.subplot(2, 3, 5);
plt.imshow(mask_red, cmap='gray');
plt.title('Red Mask');
plt.axis('off');
print(f"O percentual de pixels pretos na imagem é de {round(black_percentage,
2)}%")
print(f"O percentual de pixels verdes na imagem é de {round(green_percentage,
2)}%")
print(f"O percentual de pixels vermelhos na imagem é de {round(red_percentage,
2)}%")
print("")
# return green_percentage, red_percentage, red_percentage_excel
```