

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Controlo da amónia no transporte de peixe:
utilização de AmQuel[®] em ensaios laboratoriais

Maria João Abreu e Silva

Mestrado em Biologia Marinha



Faro 2010

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Controlo da amónia no transporte de peixe:
utilização de AmQuel[®] em ensaios laboratoriais

Maria João Abreu e Silva

Mestrado em Biologia Marinha

Orientadores: Professora Doutora Teresa Modesto
Doutor Pedro Miguel Guerreiro

Faro 2010

O trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor.

Maria João Abreu e Silva

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais, sem quais esta tese e experiência de vida não seriam possíveis. Assim sendo, um grande obrigado, por tudo, ao Chefe Mendes e à Dona São ;)

À Professora Doutora Teresa Modesto, por ter aceitado o leme de uma tese completamente desprovida de “receita” metodológica ou algo que se possa assemelhar a um protocolo. Por nunca ter desconsiderado as minhas opiniões “verdinhas”, pelas lições de português científico e não romanceado e por todo o trabalho e tempo disponibilizado, um muito obrigada.

Ao Doutor Pedro Guerreiro, pela ajuda significativa (vá lá, ao menos aqui é tranquilo usar ;)) no desenho das experiências efectuadas, em toda a parte científica, nos “alertas vermelhos” para possíveis situações de “enterranço” e numa nova perspectiva do significado de significativo, um sincero obrigado!

À Flying Sharks, por ter originado esta tese e por todo o apoio e disponibilidade, e à Tunipex, por me terem sempre tratado como pessoa da casa, um muito obrigada. Ao João, ao Zé e ao Paulo, pelas 20h de pura ciência, “arte” e intelectualismo no famoso transporte até Tarragona, por tudo aquilo que me ensinaram, dando-me bagagem para fazer esta tese, sempre com boa-disposição e optimismo, obrigadíssima!

À Ana Amaral, por toda a paciência, tempo e disponibilidade, na procura de um método “bom, bonito e barato” para a bela da amónia e por me ensinar a fazer curvas padrão com R^2 de 0.99, um grande obrigada.

Ao pessoal do laboratório (antigo e novo) por toda a ajuda e orientação prestada. À Rute, Eduarda, Mar e, claaaaro, à Elsa [deviam atribuir comissão, por cada tese que menciona a Elsa nos agradecimentos ;)], pela Educação Infantil em Laboratório e pelo serviço “Enciclopédia” para todas perguntas, obrigada.

Ao João Sendão [também deverias considerar a tal comissão...], pela ajuda no PRODEP e no “plano-menos-passível-de-provocar-lesões-na-coluna-vertebral-e-afins” no transporte, diário, de 50L de água para o 2º andar, obrigada!

À prima Rebekka, pela correcção do Abstract, e pela disponibilidade e encorajamento que sempre me deu, um thank you very, very much!

A todos os “Josés” e “Josefas” que tornaram a minha experiência académica algo de fenomenal...um super mega hiper (etc., etc.,etc.) OBRIGADA!!!!!! Dava para escrever outra tese em agradecimentos e episódios caricatos (vamos chamar-lhes assim, que isto é um sitio sério e não está aqui a Ti Angelina para pôr ordem na casa!) assim sendo, contentem-se com umas referências e afins mais ou menos à maneira e ‘tá safo, ok? AH! Quase que me ia esquecendo...O QUE É PRECISO É AUTOCONTROL!!!!

Começando pelo início, à Lambis Lambis pelos 5 anos de partilha de casa (fogo, há casamentos que duram menos tempo!), à Bá Rosa Santola e a sua onda dos sonhos, o melhor filme para meditar, à Carol e a todo o pessoal com quem partilhei casa.

À Rita, Débora, Xaninha e Inha (já tinhas saudades!!!!), pelo primeiro ano de insanidade, intelectual claro!!! E pela experiência de ser expulsa de casa, que faz sempre parte...e por outras, que mal me fizeram mexer os olhinhos, no dia a seguir, a uma noite de intenso estudo, claro!

À Pip, Glico e Moka, a casa da malta! A minha companhia da bola (miss pipa), dos concertos (altamente Mónica) e, numa fase final, dos cafezinhos para manter a sanidade mental e palavras de tranquilização (sabes que é contigo, Dii, e já agora, a minha versão do “grande no Japão” é de longe!, bem melhor que a tua...).

Aos moçoilos da malta: ao meu big brother King e ao Samurai (a melhor e pior claque do Centro de Alte!), ao Pgem (sim!, eu empresto-te o Ulisses!), ao Ratão (peço desculpa, King e Samurai, mas este homem rulez na cozinha!!!!), ao compadre Esbro (estou à espera da minha festa, dia 15...), ao Âo-Âo (sem dúvida o melhor acompanhante em filmes de terror), ao Davide (Respect para quem faz 60Km para vir jantar, quer dizer, estudar!, com a malta), ao Hugo e ao Ricardo (troglo) (por todo o

optimismo e relax) e espero não me ter esquecido de mais ninguém...(caso isso se verifique, peço o direito a desconto, visto que este belo documento está a ser escrito em condições que põe em causa o meu *welfare*, que nem um José-peixe durante um transporte)

Às moçoilas da malta do Barlavento: um grande obrigada, por me manterem de cabeça limpa, pelos momentos passados e pela paciência durante esta fase de *ligeiro* mau feitio. À Marta, pelas fotos tiradas e respectiva montagem da capa desta tese e pela ajuda durante estes meses. À Lil_Lian (madrinha e Rock'&'Roll Yoda), à Andreia (é incrível como o Universo arranja sempre maneira de te colocar em situações hilariantes, para toda a gente se rir, claaaaro), à Vânia (pela concordância de “eu já passei por isso”) e à Pat (continuo à espera duma tal churrascada e tal).

À Ti Angelina (por estares sempre no sitio certo à hora certa, para testemunhar contra as vozes da reacção!), à Jackie (pelo “Manual dos Orientadores”) e a todo o pessoal que sempre apoiou e ajudou, em especial durante estes meses. Mais uma vez, se deixei alguém de fora, lamento imenso e neste documento não existe livro de reclamações!

Ao pessoal da bola, porque sem dúvida, poucas são as coisas que melhor aliviam o stress, que uma futebolada, a todas vocês, obrigada pelo alívio do mau feitio e afins adjacentes.

E porque o melhor vem sempre no fim...MTY.LTT e bem, bem, mas mesmo bem mais!

RESUMO

O controlo da amónia durante o transporte de peixe vivo, é uma das problemáticas mais exigentes ao nível de controladores químicos.

Até então, o AmQuel[®] apresenta-se como uma alternativa e possível solução para esta problemática. Este produto foi testado em diversas situações, manipulando-se concentrações iniciais e taxas de excreção de amónia. Na primeira parte (I), através do acompanhamento de um transporte efectivo de corvinas (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) e duas simulações de transporte, de corvinas e de cavalas (*Argyrosomus regius* e *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782). Na parte laboratorial (II), foram testadas diversas simulações de taxas de excreção de amónia e o efeito quelante do AmQuel[®] sobre estas.

Pelos resultados obtidos verificou-se uma relação linear entre AmQuel[®] e amónia e uma possível inferência na concentração de cortisol libertada para a água. Os resultados obtidos laboratorialmente demonstraram que pequenas diferenças nas concentrações de cada *cocktail* escolhido poderão ter resultados distintos no controlo de amónia. O *Cocktail* B (15/15/7.5 ppm) demonstrou ser eficaz no controlo de amónia, para taxas de excreção inferiores a 5mg/h, mesmo com concentração inicial (0.25mg/L) de amónia no tanque. *Cocktails* inferiores a 15/15/7.5 ppm revelaram-se ineficazes no controlo de amónia, para taxas de excreção superiores a 1mg/h. Estes resultados irão facilitar a escolha do *cocktail* de AmQuel[®] mais adequado, consoante o tempo e características de cada transporte.

Palavras Chave: Amónia, AmQuel[®], transporte, cortisol, stress, bem-estar animal

ABSTRACT

The control of ammonia during the transport of living fish is one of the most problematic demands of chemical controllers.

Until now, AmQuel[®] presents itself as an alternative and possible solution to this problem. This product has been tested in various situations and initial concentrations and rates of excretion of ammonia have been manipulated. In the first part (I), by monitoring an effective transport of meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) and two simulations of transport, meagre and mackerel (*Argyrosomus regius* e *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782). At the laboratory (II), several simulations of ammonia excretion rates and the chelate effect of AmQuel[®] on these were tested.

According to the results, there is a linear relationship between AmQuel[®] and ammonia and a possible inference in the concentration of cortisol released into the water. The laboratory results showed that small differences in the concentrations of each cocktail may have different results in the control of ammonia. *Cocktail* B (15/15/7.5ppm) proved effective in controlling ammonia excretion rates to below 5 mg/h, even with initial concentration (0.25mg/L) of ammonia in the tank. *Cocktails* below 15/15/7.5ppm proved ineffective in controlling ammonia excretion rates for more than 1mg/h. These results will facilitate the choice of the most appropriate *cocktail* of Amquel[®], depending on the time and characteristics of each transport.

Keywords: Ammonia, AmQuel[®], transport, cortisol, stress, welfare

INDÍCE

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Perspectiva histórica do transporte de animais vivos.....	2
1.2. Actualidade do transporte de peixe vivo.....	4
1.3. Finalidade do transporte de peixe vivo.....	9
1.4. Problemas no transporte de peixe vivo.....	11
1.4.1 Stress e Bem-estar animal.....	16
1.4.2 Cortisol como parâmetro de avaliação de stress.....	20
1.4.3 Parâmetros químicos da água.....	22
1.4.4 Controlo dos parâmetros químicos da água.....	27
1.4.5 AmQuel®.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
<u>Parte I – metodologia de campo:</u>	
2.1. Simulação de transporte de Corvinas (<i>Argyrosomus regius</i> Asso, 1801).....	33
2.2. Simulação de transporte de Cavalas (<i>Scomber japonicus</i> Houttuyn, 1782).....	34
2.3. Transporte Corvinas (<i>Argyrosomus regius</i> Asso, 1801).....	35
2.4. Quantificação Amónia.....	36
2.5. Cortisol.....	37
2.5.1. Recolha de sangue.....	37
2.5.2. Recolha amostras água.....	40
2.5.3. Radioimunoensaio (RIA).....	41
<u>Parte II – metodologia laboratorial:</u>	44
2.6. Experiência 1: Diferentes concentrações iniciais de Amónia.....	45
2.7. Experiência 2: Simulação de uma taxa de excreção de amónia, constante, vs 5 cocktails AmQuel®.....	46
2.8. Experiência 3: Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel®.....	47
2.9. Experiência 4: Concentração inicial amónia (0,25mg/L) + Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel®.....	48

2.10. Detecção de amónia: F. Koroleff (1983).....	49
2.11. Análise Estatística.....	50
3. RESULTADOS.....	51
3.1. Simulação e transporte de corvinas (<i>Argyrossomus regius</i>).....	51
3.1.1. Concentração de cortisol (plasma) em cada indivíduo transportado.....	53
3.2. Simulação de transporte de cavalas (<i>Scomber japonicus</i>).....	54
3.3. Diferentes concentrações iniciais de amónia vs 5 cocktails AmQuel®.....	55
3.4. Simulação de uma taxa de excreção de amónia (2mg/h) vs 5 cocktails AmQuel®.....	59
3.5. Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel®.....	61
3.6. Concentração inicial amónia (0,25mg/L) + Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel®.....	64
4. DISCUSSÃO	
4.1. Parte I: resultados de campo.....	68
4.2. Parte II: resultados laboratoriais.....	74
4.3. Conclusão.....	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	103

1.INTRODUÇÃO

Este trabalho foi feito em parceria com a "*Flying Sharks*¹ - consultoria e inovação, Lda". Criada em 2006, esta empresa está dedicada a promover a utilização sustentável dos Oceanos através da prestação de serviços de consultoria e de transporte de animais marinhos vivos de qualidade para instituições vocacionadas para a educação e para a pesquisa do ambiente marinho. Esta empresa transporta, entre outras espécies, cavala (*Scomber japonicus*) (Correia *et al.*, 2010), ratão (*Mobula mobular*) (Correia *et al.*, 2008), peixe-lua (*Mola mola*) (Correia *et al.*, 2008), quimera (*Hydrolagus collii*) (Correia, 2001), peixe-rei (*Thalassoma pavo*), para aquários um pouco por todo o mundo (Tóquio, Lisboa, Valência, Stralsund, Dubai, Virginia, etc.), e também para instituições de aquacultura (transporte *Argyrossomus regius*, IRTA², Tarragona). A parceria existente entre a *Flying Sharks* e a "*Tunipex* - Empresa de Pesca e Tunídeos, S.A." permite ainda uma nova aproximação ao transporte de peixe vivo, através da recolha dirigida de espécimes directamente do mar que são de seguida transportados para as instituições de destino.

O objectivo primordial da nossa parceria com a *Flying Sharks* é o de contribuir com alguns estudos sistemáticos e empíricos que dêem respostas a algumas das dificuldades encontradas no processo do transporte de animais vivos de qualidade, particularmente de teleósteos marinhos. Devido à enorme complexidade entre as diferentes variáveis com impacto directo no transporte de peixe vivo, e à impossibilidade de total clarificação em apenas um trabalho, optou-se por uma exploração com principal incidência naquele que será o parâmetro da água mais problemático em termos de transporte: a amónia.

Este trabalho encontra-se dividido em duas partes. Na primeira parte, acompanhou-se um transporte de corvinas (*Argyrossomus regius*) e duas simulações de transporte de corvinas e de cavalas (*Scomber japonicus*) realizados pela *Flying Sharks*. Tanto no transporte como nas simulações, foram recolhidos dados dos diversos parâmetros da água (pH, oxigénio dissolvido, temperatura e amónia). Para uma possível avaliação de stress nos animais, foram recolhidas amostras de água dos tanques e de sangue dos indivíduos, para posterior quantificação de cortisol. Para além de uma aproximação à realidade do transporte de peixe vivo, esta primeira parte teve como

¹ <http://flyingsharks.eu>

² <http://www.irta.es>

principal objectivo a monitorização dos indivíduos durante um transporte e avaliação do seu estado fisiológico.

Tendo como ponto de partida o trabalho efectuado pela *Flying Sharks* no controlo de amónia em situação de transporte, na segunda parte deste trabalho foram criadas laboratorialmente diversos cenários, manipulando-se diferentes concentrações de amónia em conjugação com AmQuel[®], o controlador de amónia utilizado por esta empresa. O objectivo desta segunda parte passa por uma exploração do potencial deste controlador da amónia, com a finalidade de melhor compreender a dinâmica do seu comportamento, avaliando a sua eficácia em função do tempo.

Com estes ensaios espera-se poder indicar em termos práticos qual a “janela” de segurança na qual a concentração de Amquel[®] manterá a toxicidade de amónia baixa durante o intervalo de tempo de transporte. Assim, os resultados obtidos neste trabalho poderão ser de utilidade à empresa *Flying Sharks* no sentido em que vão permitir fazer uma planificação dos transportes a serem efectuados, tendo por base estudos empíricos o que poderá evitar situações de sobredosagem de Amquel[®] ou a necessidade de paragens imprevistas para controlo da amónia durante o transporte.

1.1.Perspectiva histórica do transporte de animais vivos

No séc. XVI, o principal meio de transporte de mercadorias eram os navios. Em 1607, o navio inglês *Susan Constant* atravessou o atlântico, rumo a Virgínia, na América do Norte, transportando a primeira carga de animais vivos (gado) e tornando-se no primeiro navio a fazê-lo exclusivamente (Lavery, 1988). Em 1700, o transporte de animais vivos tornou-se regular, apesar de registar 50% de mortalidade durante o transporte, devido a falta de alimento, sobrelotação e instabilidade do meio de transporte. Em 1867, alterou-se a metodologia até então utilizada, com o primeiro transporte rodoviário, a ser efectuado, uma vez mais, com gado (Lavery, 1988). As melhorias inerentes a este novo meio de transporte, levaram a uma maior taxa de sucesso e após 1900, este era o principal meio de transporte de animais vivos terrestres.

Se é complicado determinar, com certeza, qual o primeiro transporte de animais vivos terrestres, torna-se quase impossível saber, de facto, quando terá sido o primeiro transporte de animais aquáticos. Numa abordagem mais “industrial”/profissional, os primeiros avanços no transporte de peixe vivo terão sido efectuados pela *U.S. Fish Commission* em parceria com Dr. Livingston Stone (Leonard, 1979). Em 1873, não existia ainda a metodologia e material necessário construídos exclusivamente para o

transporte de peixe vivo. Os primeiros transportes foram então efectuados num vagão de comboio previamente modificado para transportar fruta e posteriormente modificado para transportar peixe (FWS, 2009). Por sua vez, os milhares de juvenis, representantes de várias espécies da costa Oeste, foram transportados dentro de vasilhas outrora utilizadas para transportar leite. O facto de se utilizar o comboio, conferia uma vantagem logística, existindo mais espaço e capacidade de armazenamento (FWS, 2009). Após o sucesso da primeira expedição, que transportou com sucesso 40.000 juvenis de Sável-americano (*Alosa sapidissima*, Wilson, 1811), tornou-se óbvia a necessidade de transportes especializados, que garantissem não só uma taxa de sobrevivência de 100% à chegada, como também uma melhor adaptação dos indivíduos transportados, ao novo habitat onde seriam inseridos. Iniciava-se assim o que a *U. S. Fish and Wildlife Service* denominou de *Fish Car Era*, uma série de 10 versões de vagões de comboio especializados, que transportaram peixe vivo em toda a América do Norte, entre 1881 e 1947 (FWS, 2009). Cada versão foi alterada ao longo do tempo, tendo as 10 versões sido melhoradas no sentido de aumentar a eficiência do transporte, possuindo características que ainda hoje são essenciais e que foram transferidas para os transportes actuais (FWS, 2009).

Por volta de 1930, houve uma grande melhoria nos acessos rodoviários, que conseguiam ligar localidades sem acesso ferroviário. Foi o início duma nova era no transporte de peixe vivo, onde camiões especializados assumiam agora maior protagonismo. Em 1932, o transporte de peixe vivo em camiões especialmente concebidos para este propósito, tornou-se mais económico, principalmente após a subida dos custos do transporte via ferroviária. E assim, apesar de os camiões conseguirem transportar cargas muito inferiores aos vagões de comboio, a sua metodologia de transporte implicava menos manuseamento dos animais, o que aliado a um menor custo e a melhores acessos, tornou este meio de transporte no mais utilizado (Lavery, 1988). Em 1937 existiam já diversos camiões totalmente modernizados - tendo em conta a época - e especializados, com o único propósito de uma maior celeridade e economia, garantindo no entanto, e cada vez mais, o bem-estar dos indivíduos transportados.

Em 1928, cerca de 27.000 espécimes de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) e truta-das-fontes (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill, 1814), foram transportadas de avião, com sucesso, desde Northville (Michigan), até Dayton (Ohio), sem uma única perda. Nos finais da década de 50 e 60, o transporte aéreo surgia como uma inovadora

solução, particularmente quando era feito para águas interiores, de difícil acesso. No entanto, nem sempre os peixes eram transportados dentro de vasilhames apropriados. Nesta altura era prática comum lançar os peixes do avião quando este se aproximava da superfície da água. Apesar de vários ensaios de sucesso, e da boa taxa de sobrevivência (cerca de 95%), a verdade é que não só se estava dependente das condições de voo, como havia sempre um maior risco, inerente a esta metodologia de transporte, que poderia resultar na perda de toda a carga. Com o avanço da tecnologia e do conhecimento, o transporte de peixe vivo por via aérea tornou-se uma mais-valia, particularmente em distâncias muito longas.

1.2. Actualidade do transporte de peixe vivo

Hoje em dia já não se justifica um transporte por via-férrea, uma vez que a sua principal vantagem, ser mais económico, não pesa o suficiente, relativamente à dificuldade de manuseamento, pouca acessibilidade e morosidade do transporte (Berka, 1986). Actualmente, o transporte rodoviário, o transporte em barcos com porões especializados e o transporte aéreo, são os principais sistemas para transportar peixe vivo (Branson, 2008).

As unidades de transporte dividem-se em duas categorias diferenciando-se pelo facto de os tanques estarem ou não incorporados no veículo. Ou seja, existem carros-tanque especializados e construídos única e exclusivamente para o transporte de peixe vivo; e existe uma outra alternativa, que será transportar os tanques em si, num camião de carga, em que os tanques são unidades completamente distintas do veículo. Com o aumento das acessibilidades rodoviárias, diminuindo a distância global entre a maioria das localidades de destaque, o uso de veículos construídos exclusivamente para o transporte de peixe vivo tornou-se um processo natural.

Os veículos mais modernos possuem já o sistema de oxigenação e bomba de circulação de água, completamente integrados e controlados electricamente no próprio veículo, facilitando em muito a sua metodologia, diminuindo o manuseamento excessivo dos tanques, durante o transporte (Berka, 1986). Estes veículos apresentam também isolamento térmico, para que a temperatura dos tanques se mantenha o mais constante possível, independentemente da temperatura exterior. No entanto, no caso de se transportar tanques individuais em veículos de carga, o isolamento nem sempre está garantido, uma vez que estes veículos não foram desenhados exclusivamente para o transporte de peixe, implicando que se utilize tanques com isolamento próprio. Neste

momento, este tipo de veículo é uma boa garantia de transporte, assegurando estabilidade, celeridade e sendo economicamente viável. No entanto, no futuro, com a escassez de petróleo, antevê-se uma nova revolução nos transportes rodoviários, implicando uma evolução paralela no transporte de peixe vivo, para que cada vez mais se aperfeiçoe a sua fórmula: rápido, seguro e económico.

O principal meio de transporte de peixe vivo por via marítima, são os *well boats*. Estes tipos de barcos, modificados especialmente para o transporte de peixe vivo, caracterizam-se pela incorporação de tanques na embarcação em si, sendo utilizados principalmente no transporte de salmão (Branson, 2008). Neste tipo de transporte, o peixe é bombeado para os tanques no interior da embarcação, que à semelhança dos camiões especializados no transporte de peixe, possuem já um sistema de oxigenação e circulação de água, totalmente incorporado na embarcação, que permite ainda uma monitorização dos parâmetros essenciais à qualidade da água. O facto de se movimentarem facilmente entre aquaculturas – uma vez que a sua grande maioria se encontra situada junto à costa – e de permitirem o transporte de grandes volumes, tornam este tipo de transporte essencial, principalmente em países como a Noruega, onde as instalações de crescimento de peixe se situam longe das instalações de processamento (Berka, 1986). Na Noruega, empresas especializadas alugam estas embarcações especialmente concebidas para este tipo de transporte, possuindo a frota mais evoluída e moderna de *well boats* no mundo. Estes barcos possuem uma superestrutura para facilitar a observação dos poços; um sofisticado sistema de monitorização com imagens vídeo dos poços; sensores com alarmes no controlo dos parâmetros essenciais, como o oxigénio dissolvido; tratamentos avançados da água, incluindo sistemas de filtração de compostos orgânicos e arejamento intensivo para reduzir as concentrações de dióxido de carbono; e um tabique móvel, para facilitar o manuseamento do peixe, quando está a ser carregado/descarregado (Branson, 2008; HSA, 2006). O planeamento é uma das principais etapas para qualquer transporte de animais vivos. Quando o transporte implica rotas marítimas, as condições atmosféricas são um factor preponderante no sucesso do transporte e o planeamento é um dos factores principais na preparação de um transporte (HSA, 2006; Iversen *et al.*, 2005; Branson, 2008).

Ao contrário de outros meios de transporte, até à data não existe ainda um veículo aéreo construído unicamente para o transporte de peixe vivo. Assim sendo, a melhor alternativa de transporte para distâncias muito longas, são os aviões de carga,

sendo uma solução extremamente útil, reduzindo drasticamente o tempo de transporte (Branson, 2008). O outro meio de transporte aéreo, apenas para transportes de pequena duração, é o helicóptero. Este tipo de veículo não permite transportar tanques no seu interior, sendo que a sua metodologia de transporte é diferente de todas aqui mencionadas e apenas para pequenas distâncias. O peixe é descarregado para um tanque, que é depois selado e ligado ao helicóptero, ficando suspenso e sendo imediatamente transportado. Quando chega ao destino, o tanque é baixado até à jaula respectiva, onde um mecanismo de flutuação existente no tanque vai libertar os peixes directamente na água (Branson, 2008).

O transporte aéreo implica alguns riscos, onde as suas principais perdas de carga se devem a voos indirectos e atrasados ou a erros no posicionamento dos tanques durante a espera e durante o transporte (Branson, 2008). Para uniformizar estas situações e garantir a segurança da carga, os transportes aéreos internacionais de animais vivos são regulados pela *International Air Transport Association* (IATA), que garante não só, que todos os requisitos do transporte sejam cumpridos, como também é responsável pelo aconselhamento ao nível das leis individuais de cada país, no sentido a seguir, relativamente à importação de peixe vivo.

Em pleno século XXI, com o comboio definitivamente descartado como meio de transporte preferencial, os caminhos rodoviários, marítimos e aéreos, assumem-se como principais e, para já, únicos candidatos ao transporte de peixe vivo (Branson, 2008). Com o evoluir dos tempos, todos eles irão sofrer evoluções, ou quem sabe, ser mesmo postos de lado, consoante o rumo que a nossa civilização tomar. Mas uma coisa é certa, a escolha do transporte a utilizar irá sempre depender do tipo de carga que se vai transportar, do local de partida/destino do transporte, da sua duração e viabilidade económica.

Independentemente da complexidade de cada metodologia de transporte, estas poder-se-ão dividir em duas categorias principais, sistema fechado ou sistema aberto, dependendo da sua interacção com o meio ambiente.

Num sistema fechado, não existe renovação de água nem libertação dos produtos de excreção para o exterior, onde os requisitos necessários à sobrevivência dos indivíduos transportados se encontram incorporados no próprio sistema (Berka, 1986). No transporte aéreo, em tanques posicionados em cabines despressurizadas, este tipo de sistema de transporte garante uma maior estabilidade e protecção que um sistema aberto. Uma das principais desvantagens do transporte em sistema fechado é o facto de

não haver renovação de água, o que implica uma depleção de oxigénio e um aumento crescente dos metabolitos de excreção dos indivíduos, com aumento de amónia e CO₂ e consequente diminuição de pH. A principal vantagem deste tipo de sistema, reside no transporte de ovos, larvas e juvenis em sacos de polietileno, que devido à sua forma arredondada, evita que indivíduos de tamanhos reduzidos (até 25mm) (Berka, 1986) sejam esmagados ou danificados, caso fossem transportados num tanque (Swann, 1914; Berka, 1986). O transporte em sacos de plástico de polietileno garante ainda uma redução do volume e do peso de água necessária ao transporte, permite o uso de transportes públicos e do prolongamento do tempo de transporte – até 48h sem efectuar mudanças de água (Bocek, 2009) – tornando-se economicamente vantajoso.

Vários estudos detalham pormenorizadamente as diferentes técnicas da metodologia utilizada num transporte em sacos de plástico. Um dos principais cuidados a ter quando se prepara um saco de plástico para transporte, é adicionar oxigénio apenas depois de se ter adicionado a água e os peixes. Deve-se garantir uma oxigenação correspondente a $\frac{3}{4}$ do volume do saco, e apenas $\frac{1}{4}$ de água. O oxigénio deverá ser injectado directamente na água e a partir daí preencher o resto do saco, garantindo-se uma saturação máxima de oxigénio na água. Isto implica que, após a água ser colocada, se retire primeiro o ar existente no saco, procedendo-se de seguida à injeção de oxigénio (Berka, 1986; Bocek, 2009). Durante o transporte, os vários sacos de plástico são posicionados dentro de caixas, para evitar contacto directo com as unidades transportadoras, prevenindo possíveis rasgões ou erosões, provocadas pelo desgaste de um transporte moroso e pelo manuseamento entre as várias unidades de transporte. Estas caixas, que poderão ser de diversos materiais consoante o tipo de transporte, permitem não só uma facilidade de movimentos no transporte dos sacos, como também garantem o isolamento térmico entre o ambiente e a água, sendo uma mais-valia neste tipo de transporte, independentemente de ser efectuado por via terrestre, aérea ou marítima.

Relativamente a outras unidades adequadas ao transporte, como tanques propositadamente construídos para o efeito, quando completamente seladas e em total isolamento relativamente ao exterior, são tão eficazes quanto os sacos de plástico, não necessitando de tantos cuidados no seu manuseamento, apesar da manutenção inerente à sua reutilização (Berka, 1986). No entanto, apesar de poder ser utilizado novamente, o seu preço elevado por unidade faz com que seja muitas vezes preterido, relativamente aos sacos de plástico (Berka, 1986).

Em sistema aberto, existe uma completa renovação de água, garantindo uma vantagem na reposição dos níveis de oxigénio com o *input* de água e assegurando a “limpeza” do sistema, através da remoção dos metabolitos de excreção dos indivíduos, pelo *output* de água. No entanto, o *input* de águas contaminadas química ou biologicamente, podem contaminar os indivíduos, pondo em causa todo o sistema. Em sentido inverso, o *output* de água de sistemas contaminados, ainda que devidamente filtrados, não exclui a probabilidade de contaminação do meio ambiente, configurando-se como principais desvantagens no sistema aberto. Para além de uma boa circulação de água, nesta metodologia o sucesso do transporte estará também directamente influenciado pela forma do tanque, pelo arejamento fornecido e outros critérios específicos de cada tanque. Os tanques podem ter vários tamanhos, em que o mais comum tem uma capacidade de 1700 L, podendo no entanto variar ente 1000 L a 11400 L. Tanques de volumes elevados, como 4500 L e 11400 L, são pouco usuais, sendo, no entanto, utilizados ocasionalmente nos EUA, no transporte de Peixe-gato, truta e robalo (Piper, 1982; Berka, 1986). A forma rectangular e, mais recentemente a elíptica são as mais utilizadas. Tanques parcialmente redondos, em forma de V, ou elípticos são aconselhados em volumes maiores, assegurando uma melhor recirculação e mistura da água, à medida que o volume do tanque aumenta (Berka, 1986). O arejamento poderá ser efectuado através de bombas previamente incorporadas no sistema de recirculação ou através de arejadores independentes, acoplados ao respectivo tanque. Independentemente de se optar por arejadores ou bombas, os sistemas de arejamento deverão ser capazes de prover a circulação a, pelo menos, 40% da água do tanque, por minuto. Este arejamento deverá ainda ser monitorizado no sentido em que o oxigénio seja difundido a uma taxa superior, através de bolhas mais pequenas, ao invés de bolhas maiores, que poderão, inclusive, interferir no bem-estar dos indivíduos transportados (Correia, 2001). O transporte em sistema aberto poderá ser considerado menos arriscado que em sistema fechado, uma vez que neste último, o metabolismo do peixe irá afectar as propriedades químicas da água (Correia *et al.*, 2008). No entanto, devido ao contacto permanente com o ambiente exterior e consequentes oscilações da temperatura e química da água, existe uma maior dificuldade em controlar os parâmetros em sistema aberto, particularmente em água doce (Correia *et al.*, 2008).

1.3.Finalidade do transporte de peixe vivo

Actualmente existem diversas actividades cujo sucesso está directamente ligado ao sucesso do transporte de peixe vivo. Destas, podemos destacar três grupos principais: a indústria alimentar de peixe vivo, a aquacultura e o comércio de peixes com fins ornamentais.

Segundo a tradição Cantonesa, a melhor maneira de manter a textura e paladar do peixe, é mantê-lo vivo até instantes antes a ser cozinhado (Lee & Sadovy, 1998). Por todo o mundo são transportadas milhões de toneladas de pescado vivo, unicamente para o consumo alimentar (FAO, 2008). Neste caso, se considerarmos que no fim do transporte se irá proceder ao abatimento dos animais transportados, poderíamos cair no erro de assumir que não necessitaria dos mesmos cuidados e prevenções, existentes noutras áreas de transporte de peixe vivo. No entanto, precisamente por os animais transportados se destinarem ao consumo humano, este tipo de transporte é tanto ou ainda mais controlado e regulado, que os anteriormente mencionados (Branson, 2008). Adicionalmente, o facto de se destinarem a um prato culinário, faz com que uma boa apresentação esteja directamente interligada com um bom manuseamento durante todos os processos de transporte, porque para este fim, apesar da primeira preocupação ser o estado fisiológico dos indivíduos, o que conta para o consumidor, é a “boa aparência” do prato. Ou seja, se o transporte não for efectuado com todos os requisitos exigidos ou se os peixes são tratados com displicência durante todas as etapas, poderá resultar em danos físicos, visíveis, que irão retirar valor económico aos animais transportados.

Mesmo que seja apenas mais uma etapa em aquacultura, o transporte é o processo intermediário nas várias fases de produção de peixe vivo. O transporte assume a responsabilidade de movimentação de espécimes entre as diversas instalações de aquacultura (consoante as diferentes etapas de crescimento em que se encontram), assegura o transporte de indivíduos adultos para as instalações de processamento, e garante a viabilidade de ciclos biológicos específicos, como o salmão - que por ser um peixe anádromo necessita ser transportado de água salgada para água doce (para desova) e novamente para as jaulas existentes em água salgada (Roncarati & Melotti, 2007; HSA, 2006). O transporte de peixe vivo é parte integrante da aquacultura, não só nas suas fases de produção, como em outras actividades, directa ou indirectamente ligados à aquacultura.

O transporte de indivíduos reprodutores torna-se importante na introdução de novas espécies em aquacultura, sendo crucial que os espécimes reprodutores estejam

nas melhores condições, após o transporte. Ou seja, que consigam sobreviver, ter uma boa adaptação ao novo meio e que apresentem não só um bom estado físico, mas principalmente fisiológico, para garantir a entrada de variabilidade genética no *pool* genético existente em cativeiro.

A cultura de peixe, aliada ao transporte de peixe vivo, torna-se uma ferramenta útil no repovoamento de habitats aquáticos. De facto, um dos principais objectivos do transporte de peixe vivo em 1870, nos EUA, foi a repovoação de alguns rios, nomeadamente o rio Sacramento, com o intuito de introduzir novas espécies na costa Oeste (Leonard, 1979). O transporte de ovos e larvas de peixe, no início da produção, é uma etapa de peso em aquacultura, onde o insucesso do transporte poderá significar uma perda significativa da carga, a curto/médio prazo. Estudillo e Duray (2002) atribuíram as altas mortalidades verificadas em larvas de garoupas (*Epinephelinae*), durante as três primeiras semanas, à sua fraca condição larvar, causada por um transporte inadequado. O transporte de peixe vivo, é, assim, uma das etapas mais importantes em aquacultura (Bocek, 2009), sendo um processo fundamental, uma vez que se falhar, o sucesso das fases anteriores torna-se irrelevante, uma vez que toda a carga ficará comprometida, perdendo-se todo o investimento até então, e o possível lucro do futuro.

À semelhança da aquacultura, também na aquariofilia o transporte assume um papel fundamental. Por serem espécies raras, e por isso muito desejadas, se o transporte não ocorre nas melhores condições, não só se está a pôr em causa o bem-estar animal, como se põe em risco milhares de espécies.

O termo “ornamental” refere-se a duas vertentes da aquariofilia. A industrial e profissional, como por exemplo os aquários públicos, e a vertente amadora, desde o mais simples aquário ao mais dedicado e complexo hobby. Segundo a *Ornamental Aquatic Trade Association* (OATA), em países como o Reino Unido, estima-se que existam entre 3 a 3,5 milhões de lares que possuem um ou mais aquários, representando cerca de 14% do total de lares, num total de mais de 144 milhões de peixes mantidos em aquários. Isto representa quase 2,5 peixes por pessoa, tornando o peixe no terceiro animal de estimação de eleição, sendo ultrapassado apenas por cães e gatos.

Devido à destabilização crescente dos ambientes aquáticos, passa pelas entidades educacionais a protecção de algumas espécies. Isto muitas vezes implica a manutenção de espécies em cativeiro, na tentativa de educar as pessoas e dar a conhecer espécies que, de outra maneira, raramente, ou nunca, seriam apreciadas.

Independentemente da sua controvérsia, os aquários públicos são uma realidade e o transporte torna-se num dos passos mais importantes. Numa primeira abordagem, poderíamos pensar que o principal cuidado a ter seria o da protecção física dos indivíduos, uma vez que vão ser dispostos ao olhar público, que se sensibiliza com a aparência física do animal. No entanto, para um espécime que vai ser retirado do seu habitat natural, passar por uma etapa - muitas vezes longa – de transporte e ver o seu espaço largamente reduzido, torna-se importante que o animal se encontre, principalmente, em boas condições fisiológicas, para que consiga sobreviver e, mais tarde, adaptar-se o melhor possível ao seu novo meio ambiente. Mais uma vez, um transporte mal efectuado implica a perda de espécies valiosas, não só a nível económico, como essencialmente a nível histórico, pelo valor que cada espécie representa, na evolução da Terra.

1.4.Problemas no transporte de peixe vivo

O transporte tem um impacto negativo nos peixes, inculindo-lhes danos físicos e mudanças fisiológicas, stress e maior vulnerabilidade a doenças (Branson, 2008). A contínua perda de sais, durante o transporte – resultante do efeito de stress e perda do muco que protege as brânquias – vai provocar danos nos tecidos dos peixes e distúrbios na sua osmorregulação (Wurts, 1999; Branson, 2008). O manuseamento de que são alvo, o aumento da densidade nos tanques de transporte e o movimento imprevisível do meio de transporte em si, resultam em danos físicos, como erosão das barbatanas, abrasão na cabeça ou lesões nos olhos (Branson, 2008). Existem ainda danos, característicos ou ampliados por um tipo de transporte específico, como o transporte aéreo e/ou marítimo. Apesar de ainda não ser totalmente claro o efeito da altitude nos peixes, quando transportados em porões de aviões despressurizados, é no entanto credível um possível distúrbio provocado pela diferença de pressão (Branson, 2008). No transporte por *well boats*, particularmente durante condições inóspitas do mar, os danos físicos são de tal maneira extremos, e visíveis, que não deixam dúvida das dificuldades físicas a que os peixes são sujeitos, principalmente quando transportados em más condições (Branson, 2008).

Existem, assim, vários factores que vão interferir, directa ou indirectamente, no bem-estar dos peixes transportados. O manuseamento de que são alvo, no início e no fim do transporte; os parâmetros químicos associados à qualidade da água; a densidade do stock; a duração do transporte; o grau de perturbações existentes durante o

transporte; o nível de biossegurança presente – ex.:assegurar a limpeza completa dos tanques de transporte e altas densidades de indivíduos, afectam negativamente o estado físico e fisiológico dos indivíduos transportados, podendo provocar lesões, doenças, maior vulnerabilidade a agentes patogénicos, desconforto e mal-estar animal (Branson, 2008). Apesar de muitas incertezas relativas a este aspecto, não existem dúvidas de que o transporte de peixe vivo tem conotações negativas nos indivíduos transportados, sendo essencial uma boa prática de transporte, que inclua um alargado conhecimento sobre cada espécie transportada, um manuseamento exemplar, um controlo exaustivo dos parâmetros químicos da água de transporte e uma metodologia adequada, que garanta o menor stress possível aos indivíduos transportados. Isto implica aprender com os erros, ir corrigindo pormenores que, ao longo do tempo, farão a diferença e significarão uma evolução na metodologia do transporte de peixe vivo.

Inicialmente, as primeiras ilações sobre o transporte de peixe vivo foram extrapoladas da metodologia utilizada em animais terrestres, com a devida adaptação aos indivíduos aquáticos (Branson, 2008). Hoje em dia, devido à evolução diária da indústria de aquacultura, existe uma evolução mais célere dos processos no transporte de peixe vivo. No entanto, não existe ainda – e devido ao seu carácter único, provavelmente não será possível – uma standardização dos parâmetros ou processos envolvidos no transporte de peixe vivo, havendo no entanto guias e tabelas que servirão apenas para uma orientação geral. As simulações, precedentes a cada transporte, tornam-se assim um passo essencial para aperfeiçoar a metodologia de cada transporte, individualmente.

A etapa do transporte normalmente fica a cargo de uma terceira parte, independente do fornecedor e receptor (Branson, 2008). Isto implica que as pessoas responsáveis pela etapa de transporte tenham capacidade para reconhecer, e compreender, o impacto potencial do transporte, no bem-estar dos indivíduos transportados (OIE, 2009; Branson, 2008), possuindo autoridade para interromper o transporte, se necessário (HSA, 2006). Em 2009, foi publicado o *Aquatic Animal Health Code*, onde as competências de cada entidade envolvida, directa ou indirectamente, no transporte, podem ser consultadas, detalhadamente, para minimizar o erro e *standardizar* o transporte, independentemente da maior ou menor experiência dessas entidades (OIE, 2009). Parte destas competências passam por conseguir reconhecer os possíveis efeitos do transporte no bem-estar dos peixes, identificando situações que possam causar mal-estar nos indivíduos, não só durante o transporte, como lesões que se

possam manifestar mais tarde, após o transporte (Branson, 2008). É crucial que sejam também tomadas medidas de biossegurança, garantindo que apenas os indivíduos saudáveis sejam transportados, minimizando o risco de contaminação de outros indivíduos e respectivo meio, à chegada (Branson, 2008) (HSA, 2006).

A qualidade do peixe a ser transportado é um critério decisivo (HSA, 2006). Legalmente, os indivíduos transportados têm de garantir uma boa condição, física e fisiológica (Branson, 2008; HSA, 2006), seguindo o requerimento de 1997, denominado de *Welfare of Animals Transport Order* (WATO) (HSA, 2006). Este requerimento defende o bem-estar dos animais transportados, incluindo os peixes, proibindo o transporte de animais debilitados (Branson, 2008; Berka, 1986). Quando os indivíduos apresentam fraca condição física, ou alguma incapacidade de sobrevivência à etapa de transporte, mesmo em densidades reduzidas, será impossível de prevenir a mortalidade, uma vez que os peixes em más condições apresentam uma maior taxa de mortalidade, que aqueles em boas condições, principalmente em transportes de longa duração (Berka, 1986).

As densidades óptimas durante um transporte dependem de diversos factores, que deverão ser apreendidos e ajustados pela prática e não por cálculos teóricos uniformizados (Berka, 1986). A capacidade de carga que poderá ser transportada, em segurança, depende da eficiência do sistema de arejamento, da temperatura e qualidade da água, da duração do transporte, do tamanho do peixe e da sua espécie (Berka, 1986; Swann, 1914). Se considerarmos constantes as características inerentes à qualidade da água, como temperatura, oxigénio, pH, dióxido de carbono e amónia, o factor decisivo será a espécie (Berka, 1986; Swann, 1914; Wurts, 1984).

No transporte de peixe vivo, a preparação é fundamental e deverá estar consciente de qualquer falha ou avaria, tanto do veículo, como do material de transporte. Assim sendo, o planeamento do transporte, incluindo as simulações, deverá sempre ter em mente qualquer falha ou atraso durante o transporte, e abranger medidas que não comprometam o bem-estar dos indivíduos, caso alguma destas situações se verifique (Branson, 2008). O planeamento deverá ser sempre orientado no sentido único de cada espécie; ou seja, o que metodologicamente funciona para uma espécie, poderá falhar redondamente noutras espécies. A preparação do transporte deverá sempre incluir um plano de contingência, identificando os principais perigos ao bem-estar dos peixes durante o transporte, quaisquer imprevistos que possam surgir e como resolvê-los (Swann, 1914).

A densidade transportada deverá permitir um prolongamento do tempo de transporte, no mínimo, 1.5 vezes (Berka, 1986). Esta medida serve de prevenção a qualquer imprevisto ou atraso que não dependa da entidade transportadora, como por exemplo, atrasos nos voos, atracar de emergência, ou qualquer falha do veículo, como um pneu furado ou tantas outras possibilidades e imprevistos (Berka, 1986). Outra característica a ter em conta é a vertente económica de cada transporte. Quando o valor do peixe transportado não compensa os elevados custos do transporte, poder-se-á considerar um aumento da densidade, para rentabilizar o transporte. No entanto, esta medida irá aumentar a probabilidade de perdas durante o transporte (Berka, 1986). Pelo contrário, quando está em causa o transporte de espécies em risco de extinção, a principal prioridade é 100% de sobrevivência e recuperação fisiológica, em que o lado económico passa a ser secundário, em prol da segurança e bem-estar destes indivíduos (Berka, 1986).

Cada parâmetro químico da água é afectado, individualmente, pelo peso e tamanho do peixe transportado e pela duração do transporte (Swann, 1914). Diferentes autores consideram diferentes parâmetros como o principal a controlar. O oxigénio dissolvido (Berka, 1986; Branson, 2008), a amónia ou pH (Correia *et al.*, 2010), serão os mais referenciados como principal parâmetro de monitorização. No entanto, todas as opiniões convergem na ideia de que, se o transporte falhar e se verificar perda da carga, será devido a uma combinação de factores e não apenas associado a um, individualmente (Swann, 1914).

A água é o meio ambiente dos peixes. Como tal, as condições em que esta se encontra são determinantes para o bem-estar dos indivíduos aquáticos. Os peixes estão em constante contacto com a água, através das brânquias e da pele. A água é mais do que um meio ambiente, uma vez que não só fornece o oxigénio necessário à sua sobrevivência, como dilui e remove metabolitos tóxicos, proporcionando ainda suporte contra a gravidade (Branson, 2008). Por estas razões, os peixes são extremamente sensíveis a águas de qualidade inferior ou mesmo a mudanças de ambientes, com águas de diferentes propriedades/características, particularmente em água doce, devido à sua fraca capacidade de tampão, comparativamente à água salgada (Branson, 2008; Berka, 1986). Em aquacultura, por exemplo, a qualidade da água é uma prioridade para o sistema. No transporte de peixe vivo, a água utilizada é um elemento crucial para o seu sucesso (HSA, 2006), e é muitas vezes idêntica à utilizada nos tanques de espera, onde os peixes residem, anteriormente ao transporte (HSA, 2006). A exposição crónica a

condições adversas poderá resultar em mudanças no sistema imunitário, originando uma maior vulnerabilidade ao aparecimento de doenças (Pickering & Pottinger, 1989; Branson, 2008), que são a principal ameaça ao bem-estar dos peixes (Berka, 1986).

As etapas imediatamente antes (carregamento) e depois (descarregamento) do transporte, são extremamente stressantes para os indivíduos transportados. Ambas deverão ser realizadas o mais célere e calmamente possível. Ou seja, as pessoas que vão fazer a ligação dos tanques para a unidade de transporte deverão ser em número reduzido, para evitar confusão, mas suficiente para garantir a celeridade do processo (Rubec & Cruz, 2005; HSA, 2006). Assim sendo, esta etapa deverá ser o menos stressante possível, para não comprometer a qualidade da água, resultante do aumento da libertação de produtos de excreção, por parte de indivíduos stressados (HSA, 2006; OIE, 2009). Em aquacultura, uma das metodologias desta etapa passa por bombear os peixes directamente para a unidade de transporte, poupando tempo e minimizando o manuseamento, uma vez que se evita o contacto com a rede e elimina-se a necessidade de captura dentro dos tanques, para a unidade de transporte (Rubec & Cruz, 2005). No entanto, também esta medida implica algum risco no dano físico dos indivíduos, devido à fricção existente durante este processo, existindo por isso diversos estudos (Branson, 2008), não só com o intuito de melhorar esta metodologia, como também no aperfeiçoamento da metodologia tradicional de captura, usando uma rede ou manga. Neste caso, as principais variantes de estudo são direccionadas para o material, e cor, das redes ou mangas utilizadas (Rubec & Cruz, 2005; Branson, 2008).

Como consequência das duas etapas complicadas já ultrapassadas - carregamento e transporte - o descarregamento é a fase mais crítica a nível fisiológico, para os animais transportados (HSA, 2006; OIE, 2009; Berka, 1986). Esta situação resulta do stress acumulado e da exposição a águas alteradas, no seu destino, com diferentes características (pH, temperatura, CO₂, etc.) ou de qualidade inferior, originando um acréscimo de stress, muitas vezes superior ao limite suportado pelos indivíduos transportados (Berka, 1986). Por estas razões, o descarregamento deverá ser o mais imediato possível, assim que a unidade de transporte chegue ao seu destino (OIE, 2009). Algumas espécies irão necessitar de aclimatização à chegada, particularmente quando vão ser expostas a diferentes qualidades de água (OIE, 2009; Swann, 1914). No transporte em sacos de polietileno, é sempre aconselhado deixar o saco repousar na água de destino, durante tempo suficiente para que a temperatura dentro do saco iguale a temperatura da água onde se irão introduzir os espécimes

(Swann, 1914; Wurts, 1984). Recomenda-se ainda que os peixes sejam mantidos em isolamento, numa área escura e tranquila, no mínimo durante 48h, após a chegada ao destino (OATA; Branson, 2008). Durante este período, deverá ser feita uma avaliação do estado dos indivíduos, administrando-lhes medicamentos contra possíveis parasitas ou outros tratamentos que venham a ser necessários, sendo alimentados a tempos espaçados.

Para minimizar o efeito prejudicial do transporte, é importante que exista uma monitorização dos indivíduos, o máximo possível (Branson, 2008). No entanto, e apesar de inspeções periódicas durante o transporte serem necessárias, alguns autores (Branson, 2008; Berka, 1986) consideram que demasiadas verificações poderão inflacionar o stress já existente. A melhor maneira de conjugar estas duas teorias, é uma monitorização da carga o menos invasiva possível, como a existente nos *well boats*, equipados com circuito de vigilância nos poços onde os peixes vão acondicionados, permitindo uma monitorização constante, sem pôr em causa o seu bem-estar (OIE, 2009). A monitorização começa ainda antes do transporte, quando se selecciona os indivíduos em condições de serem transportados; é crucial durante todo o percurso de transporte, para assegurar que tudo corre como esperado e deve continuar mesmo quando os espécimes já se encontram acomodados nas instalações de destino, após o transporte, para assegurar que os peixes se encontram em boas condições ou identificar qualquer dano ou lesão provocada por qualquer uma das etapas de transporte (Branson, 2008). Este *feedback*, por parte do destinatário, é essencial para a evolução do transporte de peixe vivo, para se corrigir qualquer falha existente ou aperfeiçoar qualquer aspecto técnico, material ou metodológico.

1.4.1. Stress e Bem-estar animal

A capacidade dos peixes em tolerar o manuseamento, densidades elevadas e distúrbios físicos, depende da espécie, idade, tamanho e condição fisiológica (Branson, 2008). O transporte implica privação de comida, manuseamento físico e mudança de meio ambiente nos indivíduos transportados; estas implicações resultam num acumular de situações negativas, prejudiciais ao bem-estar dos espécimes transportados, cabendo aos responsáveis pelo transporte, a garantia de que este será efectuado nas melhores condições possíveis, de modo a evitar e/ou minimizar o desconforto e stress desnecessários (HSA, 2006).

O conceito de bem-estar animal, apesar de claro de intenções, será sempre alvo de diferentes perspectivas, consoante o grupo de interesse envolvido (Branson, 2008). Uma das perspectivas mais populares, baseia-se na capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente que o rodeia (Broom, 1991; Broom, 1998). Independentemente da abordagem escolhida, existem diversos aspectos a ter em atenção na definição de bem-estar animal. As diferentes perspectivas resultam das diferenças de valores de opinião, não existindo uma perspectiva correcta ou errada, apenas diferentes abordagens. No entanto, o conceito de bem-estar animal deverá ser consensual tanto numa aproximação científica, como pelo público em geral. Com base neste consenso, o *Farm Animal Welfare Council* (FAWC) divulgou uma teoria, baseada em cinco requisitos para um estado de bem-estar animal, na qual os animais deverão estar alimentados, livres de desconforto, “dor”, lesões, registando níveis comportamentais idênticos aos verificados no seu habitat natural.

Muitas questões relativas ao bem-estar dos animais, particularmente dos peixes, encontram-se ainda sem resposta e cabe às entidades envolvidas no manuseamento de peixe vivo, determinar o verdadeiro sentido e resultado de bem-estar. Para isso, contribuirá em grande parte a experiência ganha em cada transporte, que permite uma evolução na avaliação dos diversos parâmetros, sejam eles físicos, fisiológicos ou comportamentais, que permitam uma melhor percepção do significado de bem-estar.

Organizações como a *Humane Slaughter Association* (HSA), a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE - *Office International des Epizooties*), a *Ornamental Fish International* (OFI), entre muitas outras, tiveram um contributo importante tanto na consciencialização pública, como na pressão política para uma maior celeridade na criação de novas leis e direitos animais. O *Animal Welfare Act*, criado em 1966 (e posteriormente modificado por seis vezes, a última em 2007), continua actualmente a ser a única lei federal, nos EUA, que controla o manuseamento animal em situações que ponham em causa o seu bem-estar físico e fisiológico, devido a práticas como investigação, transporte ou mesmo contrabando e exposições animais (Branson, 2008).

Apesar da enorme controvérsia existente sobre a capacidade dos peixes de experienciar dor, diversos estudos fundamentam cada vez mais a ideia que os peixes teleósteos partilham a capacidade e processos de dor e stress fisiológico, idênticos aos restantes vertebrados (Barton & Iwama, 1991; Sneddon *et al.*, 2003a); Branson, 2008).

Existem ainda poucas pesquisas referentes ao stress fisio- e imunológico, nos peixes, uma vez que a maioria das pesquisas a nível fisiológico se focam quase

exclusivamente ao entendimento da função humana, existindo por isso uma maior clarificação do stress em mamíferos. Adicionalmente, torna-se difícil extrapolar os testes dos mamíferos, como ponto de partida para a avaliação do stress em peixes, uma vez que alguns métodos utilizados, como sinais vocais ou faciais, se tornam irrelevantes quando se lida com peixes (Branson, 2008).

Durante o processo evolutivo, desde os organismos unicelulares aos organismos mais complexos, as células começaram a usar moléculas que sinalizam uma série de sinais de emergência, de modo a proteger funções celulares de agressões externas e repentinas. A resposta ao stress, aumenta as hipóteses de sobrevivência do indivíduo, quando confrontado com uma ameaça imediata, quer seja real ou aparente (Johnson *et al.*, 1992; Branson, 2008). Esta resposta caracteriza-se pelo desencadeamento de diversos mecanismos fisiológicos, cujo objectivo passa por contrariar os efeitos originados pelo agente stressante, retornando assim o equilíbrio do indivíduo, ou estabelecendo um novo equilíbrio, adaptado às novas condições em que o indivíduo se encontra. A resposta ao stress fisiológico pode ser dividida em três fases – primária, secundária e terciária – de acordo com o Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (Carmichael *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1987; Moyle & Cech, 1998; Staurnes *et al.*, 1994; Oliveira & Cyrino, 1998; Alves *et al.*, 2010).

Numa primeira fase, a resposta ao stress manifesta-se através dos sistemas sensoriais e endócrinos, despoletando diversas reacções, que vão definir e sinalizar o tipo de stress a que os indivíduos estão expostos, e qual a resposta apropriada. Esta fase caracteriza-se pela rápida activação das células do eixo da BSC (*brain-sympathetic-chromaffin*) e do eixo HPI (*hypothalamic-pituitary-interrenal*), havendo libertação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e cortisol na corrente sanguínea (Alves *et al.*, 2010; Branson, 2008; Robertson *et al.*, 1987). Com a libertação de adrenalina, a frequência cardíaca vai aumentar, provocando dilatação dos vasos sanguíneos, dirigindo o fluxo sanguíneo para regiões específicas do corpo, quando necessário. No caso particular dos peixes, irá aumentar o seu batimento opércular. É nesta primeira fase, que se define a reacção dos indivíduos ao estímulo stressante (reacção *fight-or-flight*), em que a activação de vários tecidos – devido aos efeitos metabólicos e cardiovasculares desencadeados pela libertação de adrenalina e noradrenalina – vai aumentar a disponibilização e mobilização de energia para os músculos e sistema nervoso, com o intuito de enfrentar ou evitar a ameaça gerada (Pickering, 1993; Pickering & Pottinger, 1995; Branson, 2008).

Num segundo nível de resposta ao stress – marcado pela resistência dos indivíduos quando expostos intensiva e prolongadamente a situações de stress – as alterações fisiológicas provocadas por esta fase de resistência, vão ter um efeito fisiológico mais prolongado e significativo, que as sentidas numa primeira fase de alarme. Este nível de resposta é então expresso pelos efeitos hormonais com implicações ao nível do sangue e dos tecidos, causando não só um distúrbio no equilíbrio hidromineral, como também alterando o metabolismo e as funções cardio-respiratórias e imunológicas do indivíduo (Alves *et al.*, 2010). Segundo Bonga (1997), o aumento de catecolaminas no sangue, em conjunto com uma possível danificação nas brânquias ou na pele dos indivíduos, aumenta a permeabilidade da superfície epitelial, a água e a iões, perturbando o balanço hidromineral. É devido a esta correlação existente entre balanço hidromineral e stress nos peixes, que factores externos como pH, composição mineral e níveis iónicos de cálcio na água, representam um grande impacto na intensidade do agente stressor (Strange *et al.*, 1977).

Numa terceira fase de resposta ao stress, os indivíduos entram numa fase de exaustão, caracterizada pelos efeitos fisiológicos que vão afectar negativamente todo o funcionamento do peixe, com impacto ao nível de crescimento, aumento da susceptibilidade a infecções, alteração comportamental, colapso de um ou mais sistemas de órgãos e, até mesmo, pondo em causa a sua própria sobrevivência (Alves *et al.*, 2010; Barton, 2002; Bonga, 1997; Iwama, 2007; Berka, 1986; Pickering, 1993).

A resposta ao stress envolvendo uma curta exposição a situações desfavoráveis, poderá ser superada ou evitada, ou resultar na morte do animal. Em exposições longas, como em cativeiro ou piscicultura intensiva, os indivíduos poderão encontrar situações desfavoráveis, assimiladas como possível ameaça, que poderão não ser imediatamente resolvidas, mas não sendo necessariamente letais (Branson, 2008). Numa exposição única de stress agudo, não há necessariamente um dano acentuado. No entanto, quando expostos repetitivamente a agentes stressantes, com efeito cumulativo, como acontece no transporte, poderá levar a um efeito crónico, com supressão do sistema imunitário, aumento a susceptibilidade a doenças e lesões, reduzindo a resposta imunitária (Branson, 2008). A “inactivação” dos principais sistemas de defesa no exacto momento crítico, a nível fisiológico, em que seria de esperar o início da sua função, pode parecer um pouco contra-senso. No entanto, na realidade, a imunossupressão induzida pelo stress imediato, é necessária e fundamental na contenção de processos, que sem esta acção levariam a reacções auto-imunes (Nesse & Young, 2000). Um destes casos é o efeito

supressor do cortisol nos processos reprodutivos (Schreck *et al.*, 2001) e de crescimento (McCormick *et al.*, 1998). Este efeito pode ser considerado como uma “recolocação” de recursos de actividades não essenciais, numa tentativa de colmatar o desgaste fisiológico imediato, até a sobrevivência do indivíduo estar garantida (Branson, 2008).

Diversos trabalhos (Weiss, 1972) sobre o impacto do stress fisiológico, demonstraram vários efeitos do stress, afectando o crescimento, reprodução, comportamento e sistema imunitário (Bonga, 1997; Branson, 2008). Estudos mais recentes, indicam a possibilidade do stress como causa de erosão (Kindschi *et al.*, 1991b) e ulceração (Udomkusonsri *et al.*, 2004) das barbatanas (Branson, 2008). O stress pode ainda afectar o peso dos peixes, aumentando o de indivíduos de água doce e diminuindo o peso dos de água salgada, através do aumento da adrenalina, influenciando as funções branquiais, resultando num aumento de permeabilidade da membrana, que permite a entrada (peixes água doce) ou saída (peixes água salgada) de água e conseqüente variação de peso (Moyle & Cech, 1998). É ainda de notar, que a resposta ao stress difere, qualitativa e quantitativamente, entre espécies (Strange *et al.*, 1977; Branson, 2008).

A relação entre stress e bem-estar do peixe é difícil de identificar com absoluta certeza, mesmo com metodologias de análise do *fitness*, produção e resposta fisiológica e neurológica (Goede & Barton, 1990; Turnbull *et al.*, 2005; North *et al.*, 2006; Varsamos *et al.*, 2006; Branson, 2008). Apesar da relação directa entre stress e bem-estar não se encontrar ainda totalmente identificada e esclarecida, na realidade, estes dois parâmetros encontram-se correlacionados e interligados, uma vez que os principais agentes stressores durante um transporte de peixe vivo, normalmente coincidem com os factores prejudiciais ao bem-estar dos indivíduos transportados (Iverson *et al.*, 1998; Oliveira & Cyrino, 1998), tornando a detecção de stress numa ferramenta indispensável na avaliação do bem-estar animal (Branson, 2008).

1.4.2. Cortisol como parâmetro de avaliação de stress

A resposta primária e secundária dos peixes, ao stress, pode ser avaliada através de diversos parâmetros hormonais, metabólicos, hematológicos e hidrominerais. (Barton, 2002; Alves *et al.*, 2010; Strange *et al.*, 1977; Oliveira & Cyrino, 1998). Uma vez que a resposta ao stress pode ser influenciada por vários factores, extrínsecos e intrínsecos ao peixe (Barton, 2002; Mommsen *et al.*, 1999; Pottinger, 2008; Alves *et al.*,

2010; Branson, 2008), a metodologia eleita para aferir o stress nos peixes, deverá cumprir uma série de critérios.

O indicador escolhido deverá ter significado a nível de diagnóstico, informar acerca do estado de stress no peixe, garantido especificidade à resposta ao stress (Branson, 2008). Neste momento, o indicador que mais se aproxima de cumprir todos os requisitos é a uma hormona esteróide, o cortisol (Branson, 2008; Scott & Ellis, 2007; Scott *et al.*, 2008). As concentrações de cortisol no sangue variam entre as diferentes espécies. No entanto, entre indivíduos da mesma espécie, os níveis de cortisol num indivíduo sem stress, são mais baixos comparativamente aos níveis verificados durante uma situação de stress (Strange *et al.*, 1977; Branson, 2008). Apesar de ser um indicador fiável do estado de stress existente no peixe, o uso da concentração de cortisol não está isenta de algumas complicações, derivadas do factor “instabilidade”, inerente aos parâmetros que afectam esta concentração.

Existem diferentes metodologias para a obtenção de amostras, para dosear cortisol. Estas amostras podem ser recolhidas através de métodos invasivos, como exemplo as amostragens provenientes da bÍlis ou do plasma; ou recorrendo a uma aproximação menos invasiva, através de amostras de fezes ou da água em que se encontram os animais (Scott & Ellis, 2007; Branson, 2008). A recolha de sangue ou da água dos peixes, são as metodologias mais utilizadas, em que esta última tem vindo a sofrer melhorias, na tentativa de creditar esta metodologia não invasiva, em detrimento da recolha de sangue que é extremamente invasiva. No entanto, desenvolvimentos recentes em proteómica e genómica, sugerem que este tipo de parâmetros, como o cortisol, poderão não ser suficientes na avaliação fisiológica, em situações de stress crónico, devido à aclimatização do eixo HPI (Alves *et al.*, 2010). De facto, o “acesso” privilegiado aos mecanismos envolvidos nos processos relativos ao stress, poderão trazer uma melhor perspectiva, na compreensão e identificação de indicadores de stress e/ou bem-estar animal (Alves *et al.*, 2010).

Segundo Branson (2008), a quantificação de cortisol através do plasma, do ponto de vista científico, será a metodologia mais precisa, comparativamente às diferentes opções de obtenção dos níveis de cortisol nos peixes. Isto deve-se ao facto de o sangue reflectir imediatamente a actividade secretória do tecido interrenal. Esta será a principal vantagem na escolha deste tipo de amostragem, que permite também uma aferição individual da concentração de cortisol existente. No entanto, o carácter invasivo desta metodologia torna-se problemático quando estão em causa animais raros, de tamanho

reduzido ou com elevado valor económico para serem sujeitos a uma prática que implica dano directo, como a perda de sangue (Scott *et al.*, 2008). Para além disso, a recolha de sangue implica ainda um manejo adicional, o uso de anestésicos e uma exposição ao meio atmosférico, que poderão resultar numa modificação do estado fisiológico e comportamental, não só no indivíduo a ser amostrado, como nos restantes indivíduos no tanque (Scott *et al.*, 2008). Outro aspecto dúbio neste tipo de amostragem, tem a ver com o tempo que se demora a cumprir esta metodologia, desde a apanha, até à recolha de sangue, uma vez que se esta for efectuada num tempo superior a 5 minutos, estará a pôr em causa o próprio resultado, onde os distúrbios associados ao método vão activar a resposta ao stress, ou mesmo aumentar os níveis já existentes (Branson, 2008). Mesmo com a máxima optimização e celeridade possível, poderão sempre ocorrer discrepâncias, provenientes do método, e não propriamente do estímulo que se pretende avaliar.

Torna-se possível avaliar o nível de cortisol, existente na água onde se encontram os indivíduos, uma vez que os esteróides conjugados são também excretados pela urina, e onde os esteróides livres são libertados para a água, de forma passiva, durante a passagem do sangue pelas brânquias (Vermeirssen & Scott, 1996; Ellis *et al.*, 2005; Branson, 2008). Diversos estudos (Scott & Ellis, 2007) demonstram a competência deste método, que se encontra ainda em modelação, na tentativa de um melhoramento dos seus factores mais instáveis (ver Scott & Ellis, 2007 e Scott *et al.*, 2008). Uma das principais desvantagens, prende-se com o facto de este método não avaliar a concentração de cortisol, a nível individual. No entanto, no transporte de peixe vivo, este problema não se coloca, uma vez que a principal preocupação incide no controlo dos parâmetros do tanque, no geral, e não nos indivíduos, em particular. O facto deste método depender da recolha de água, onde existe excreção por parte dos indivíduos avaliados, torna esta técnica problemática na avaliação em sistemas com renovação de água, tornando-se mesmo inadequado em sistemas de jaulas em alto mar (Branson, 2008).

Este método permite a obtenção de resultados sem o stress adicional, provocado pela amostragem (como o que sucede nas técnicas invasivas), garantindo uma monitorização fisiológica e comportamental (Scott & Ellis, 2007), que em complemento com os parâmetros (bio)químicos aumenta a clarificação do estado do indivíduo durante um transporte.

1.4.3. Parâmetros químicos da água

Apesar da existência de diversos limites para cada parâmetro da qualidade da água (Boyd, 1996), a verdade é que as interações entre si são extremamente complexas e considerar estes parâmetros individualmente é um erro que irá pôr em risco o transporte (Berka, 1986). Não só se tem de examinar as interações entre os mais diversos parâmetros que influenciam a qualidade da água – oxigénio, dióxido de carbono, pH, amónia, temperatura, sólidos em suspensão – como perceber o impacto que essas interações irão assumir, no dano real causado nos indivíduos (Swann, 1914). Ou seja, concentrações idênticas de um parâmetro irão ter repercussões diferentes, consoante as concentrações dos outros parâmetros directamente influentes.

Como por exemplo (HSA, 2006), se considerarmos o tanque A (pH 6,5; 10°C) e B (pH 7,8; 15°C), ambos com idênticas concentrações de amónia total, vão resultar em diferentes concentrações de toxicidade, devido à diferença de pH e temperatura, onde no tanque A essas concentrações vão ser inofensivas, enquanto no tanque B, assumem uma toxicidade 20 vezes superior à verificada em A (HSA, 2006).

A temperatura, os sólidos em suspensão, pH, CO₂, oxigenação e amónia serão os principais alvos de controlo, onde a oxigenação e a amónia assumem maior importância.

As temperaturas recomendadas para um transporte irão sempre depender da espécie dos indivíduos transportados. No entanto, e salvo alguma peculiaridade por parte de algumas espécies, o transporte deverá ser efectuado entre 4°C a 12°C. A temperaturas inferiores, o metabolismo dos indivíduos transportados é reduzido, levando a uma aglomeração dos peixes no fundo, resultando na asfixia dos indivíduos do fundo; por outro lado, temperaturas mais elevadas implicam uma diminuição no oxigénio dissolvido, levando a uma maior propensão na ocorrência de stress, por parte dos indivíduos transportados (HSA, 2006).

Durante o transporte poderão ainda ocorrer mudanças bruscas, tanto da temperatura como do pH, principalmente nos transportes de espécies de água doce, onde a capacidade de tampão da água doce é muito inferior relativamente à existente em água salgada, propiciando oscilações nestes parâmetros. Os sólidos em suspensão são também um factor importante. Para além da colmatção das brânquias – com elevado dano no epitélio branquial, facilitando o aparecimento de infecções por bactérias e fungos e comprometendo as trocas gasosas (Moyle & Cech, 1998; Swann, 1914). As partículas em suspensão aumentam a erosão da pele dos indivíduos e dificultam a sua

visão. No transporte de ovos, em incubação, a acumulação no fundo de partículas em suspensão vai privar os ovos de oxigénio, pondo em risco toda a carga (Alabaster & Lloyd, 1982; Wedemeyer, 1996).

A qualidade da água de transporte varia em função da densidade da carga transportada e do tempo de transporte (Berka, 1986). A bibliografia recomenda uma mudança de água completa, se o transporte se alongar por tempo superior a 16h (Berka, 1986). No entanto, nem sempre isto é possível e quando se efectua um transporte sem mudança de água, a deterioração da água é inevitável, resultando no aumento dos produtos de respiração – libertação de CO₂ – e excreção – libertação de amónia – tendo como consequência um decréscimo no pH e um acréscimo de material orgânico e sólidos em suspensão (Branson, 2008; Berka, 1986).

Relativamente à oxigenação no transporte, a primeira hora assume extrema relevância, devido aos elevados níveis de excitabilidade, que requisitam maiores quantidades de oxigénio, num curto tempo de ajuste (Berka, 1986). Em sistemas fechados, este problema é ultrapassado, devido à natureza da atmosfera pressurizada, havendo oxigénio suficiente, não se tornando um factor limitante (Berka, 1986). Nos sistemas abertos, é aconselhável preparar os tanques com oxigénio extra, para prevenir qualquer necessidade extra e/ou problemas que possam surgir durante o transporte. No entanto, um défice de oxigénio poderá ocorrer, particularmente em casos de elevadas densidades ou durações de transporte (Berka, 1986).

Quando os peixes estão confinados num espaço reduzido, comparativamente ao seu habitat natural, vai haver um aumento na actividade muscular, resultando numa privação de oxigénio, que se torna insuficiente para colmatar as necessidades dos indivíduos. Como consequência, o ácido láctico vai-se acumular nos músculos e no sangue, causando uma diminuição do pH no sangue. Esta acumulação de ácido lácteo, poderá demorar cerca de 24h para ser reduzida, variando entre cada espécie o tempo de recuperação (Berka, 1986). A capacidade de uso de oxigénio, nos peixes, depende da sua tolerância a diversos factores, como stress, temperatura da água, pH, CO₂ e amónia. A manutenção dos níveis de oxigénio é crucial, permitindo uma melhor resposta a outros desafios existentes no transporte de peixe vivo (Berka R, 1986).

Ao serem transportados em ambientes confinados, os peixes são expostos a elevadas concentrações de CO₂, que são prejudiciais, e que poderão resultar no factor limitante do transporte (Berka, 1986). À medida que o CO₂ se dissolve, são libertados iões de hidrogénio, acidificando a água (decréscimo de pH) (Westers, 2001; Branson,

2008; Berka, 1986). O aumento de CO₂ resulta na incapacidade de excretar o CO₂ endógeno, levando ao aumento de CO₂ no sangue (hipercapnia), afectando o equilíbrio ácido-base e o transporte de oxigénio das brânquias para os tecidos (Chow *et al.*, 1994; Oliveira & Cyrino, 1998; Branson, 2008). Consequentemente, o pH do sangue vai diminuir, levando a que haja acidose, resultado da redução da capacidade de transporte de oxigénio no sangue – efeito de *Bohr* – e também reduzindo a saturação de oxigénio no sangue – efeito de *Root*. Mesmo quando os níveis de oxigénio são adequados, se a concentração de CO₂ é elevada, poderá significar a morte dos indivíduos. Um arejamento adequado, mais do que necessário, é fundamental no transporte de peixe vivo, reduzindo as concentrações de CO₂ dissolvido (Berka, 1986).

Por estes motivos, e apesar de o controlo da oxigenação ser relativamente simples, comparativamente ao controlo de amónia, a oxigenação é, a par com a amónia os principais parâmetros (bio)químicos a serem controlados, uma vez que se ambos atingirem níveis críticos durante o transporte, poderá ter um impacto catastrófico nos indivíduos transportados.

Ao contrário da oxigenação, o controlo de amónia torna-se mais complicado, uma vez que se pretende que esta seja removida ou transformada para um estado não tóxico. A amónia é uma substância tóxica, para todos os vertebrados, existente no ambiente aquático e que resulta dos produtos de excreção de plantas e animais, da decomposição da matéria orgânica, de emissões vulcânicas e, cada vez mais, do impacto antropogénico (Randall & Tsui, 2002; Branson, 2008). A amónia é o primeiro metabolito de excreção, resultante do catabolismo das proteínas e aminoácidos, existentes no alimento (Evans *et al.*, 2005; Branson, 2008; Berka, 1986). Devido à sua elevada toxicidade e à necessidade de diluição para níveis menos tóxicos (cerca de 400 mL de água por cada 1g de amónia), a amónia é utilizada como produto de excreção, maioritariamente pelos animais aquáticos (Withers, 1998).

Nos peixes teleósteos, a formação de amónia ocorre no fígado, sendo transportada no sangue e posteriormente libertada directamente para a água, através das brânquias (Smith, 1929). Este processo vai evitar um gasto de energia suplementar na transformação de amónia em produtos menos tóxicos, como a ureia e o ácido úrico (*Figura 1*). Em solução aquosa, a amónia encontra-se em equilíbrio entre a sua forma ionizada (NH₄⁺) e não ionizada (NH₃⁻), sendo que esta última é extremamente tóxica (Berka, 1986). A percentagem de amónia não ionizada depende tanto da temperatura,

como do pH (Berka, 1986) (Figura 2), sendo directamente proporcional ao aumento destes (Correia *et al.*, 2010).

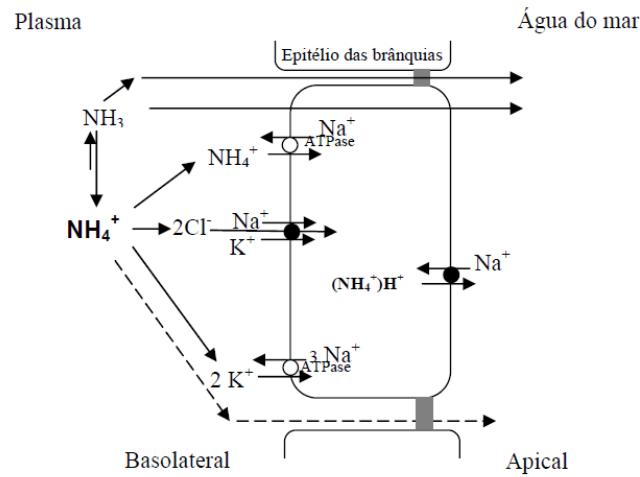


Figura 1: Modelo da excreção de amónia em peixes de água salgada, destacando-se as diversas formas de transporte através do epitélio branquial (Adaptado de Wilkie, 2002).

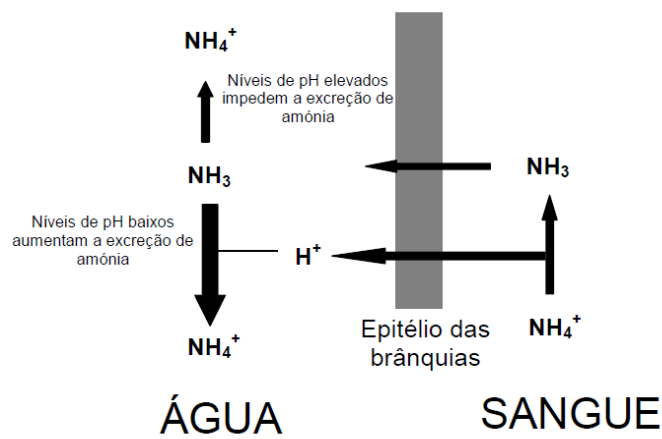


Figura 2: Esquema do efeito do pH ambiental na excreção de amónia através do epitélio das brânquias dos peixes (Adaptado de Ip *et al.*, 2001).

Para evitar o aumento de amónia durante o transporte, por metabolismo dos peixes ou acção bacteriana, deve-se diminuir a temperatura da água de transporte e cessar a alimentação dos indivíduos, 48h a 72h antes do transporte, dependendo do seu tamanho na altura do transporte – peixes com maior comprimento (superior a 20 cm),

necessitam mais tempo sem alimento, relativamente aos de menor comprimento (inferior a 20cm) (Berka, 1986; Swann, 1914).

Os efeitos tóxicos da amónia são registados a diferentes níveis, consoante a espécie em questão. Existem algumas opiniões e teorias em relação ao resultado de uma exposição aguda a elevada toxicidade de amónia. No entanto, em todos os vertebrados, incluindo os peixes, a amónia vai ter um efeito prejudicial no sistema nervoso, (Randall & Tsui, 2002; Haywood, 1983), interferir nos processos fisiológicos, ou levar à despolarização de fibras musculares e neurónios (Randall & Tsui, 2002; Berka, 1986), podendo resultar na morte do indivíduo (Berka, 1986). Ao longo do tempo, diversos autores (Larmoyeux & Piper, 1973; Smith & Piper, 1975; Smart, 1976; Alabaster & Lloyd, 1982; Haywood, 1983; Thurston *et al.*, 1984; Tomasso, 1994; Twitchen & Eddy, 1994; Berka, 1986) reportaram graves lesões, ocorridas em indivíduos da espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris), quando expostos a um efeito crónico de amónia. Desde variados danos nas brânquias – produção de muco, hiperplasia, fusão das lamelas das brânquias, etc. – mal funcionamento dos rins e do fígado, decréscimo na assimilação de alimento, dificuldade no crescimento e aumento da erosão nas barbatana.

A exposição a elevadas concentrações de amónia, de forma crónica, resulta na falência de vários órgãos e funções, pondo em causa muito mais do que o bem-estar dos indivíduos, originando um perigo à saúde e viabilidade dos animais transportados.

1.4.4. Controlo dos parâmetros químicos da água

A utilização de substâncias para ajudar o controlo dos parâmetros (bio)químicos da água, é um ideal perseguido desde os primeiros transportes. Não só será o campo no transporte de peixe vivo, em constante desenvolvimento, como é aquele que reúne maior discordância, cuidado e evolução. Por tudo isto, a decisão da utilização de produtos químicos no controlo do ambiente de transporte, deverá ser feito com plena consciência que o que funciona para uma espécie, num determinado transporte, poderá não funcionar num outro transporte, ou mais tarde se revelar como prejudicial em vez de benéfico. Estes métodos incluem, na maioria dos casos, o uso de reagentes químicos, que ao longo de dois séculos de transporte de peixe vivo sofreram mudanças e evoluções. O uso de anestésicos ou tranquilizantes permite o decréscimo tanto da produção de CO₂ e NH₃, como do consumo de O₂ (Branson, 2008). No entanto, o seu uso terá de ser sempre muito bem ponderado, uma vez que o efeito criado poderá resultar em perdas de larga escala. Quando sedados, os indivíduos perdem parte da

capacidade natatória, e corre-se o risco de estes se amontoarem no fundo dos tanques, sufocando e danificando fisicamente os indivíduos do fundo. A benzocaína (éster etílico do ácido paraaminobenzóico) é um dos anestésicos mais efectivos (Allen, 1998; Meinertz, 1999). Apesar de apresentar bons resultados numas espécies (ex: Tilapia [*Pseudocrenilabrinae*]), noutras como o Matrinxã (*Brycon amazonicus*) observou-se uma elevada mortalidade após o transporte (Carneiro e Urbinati, 1998), tornando a benzocaína num bom exemplo de um químico que acaba por ser eficaz, mas com uma ténue margem de segurança entre a dose letal e a correcta (Olfert *et al.*, 1993; Allen, 1998). Diversos autores (Dupree & Huner, 1984; Johnson, 1979; Hatting, 1975; Powell, 1970; Carmichael, 1984) aconselham a adição de NaCl, para reduzir a produção de muco, e de CaCl₂, para suprimir a disfunção metabólica e osmoreguladora (Branson, 2008).

O pH é, também, um factor importante a controlar, visto que as proporções de amónia e CO₂ são funções directas deste (Coward & Lunn, 1981; Berka, 1986). O pH da água tem tendência a diminuir, acidificando o meio, devido à libertação de CO₂ através da respiração dos indivíduos transportados. O uso de soluções tampão permite controlar o pH durante o transporte, sendo também aconselhado por diversos autores (Correia *et al.*, 2010; Correia *et al.*, 2008; Johnson, 2004; Wurts, 1995; Johnson, 1979; Amend *et al.*, 1982; Dupree & Hunter, 1984; Berka, 1986). O Tampão *Tris* (tris-(hidroximetil)-aminometano - (HOCH₂)₃CNH₂), o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e o carbonato de sódio (Na₂CO₃) são ainda hoje utilizados com sucesso (Correia *et al.*, 2010), em diversos transportes, podendo ser considerados como as soluções tampão mais comuns no transporte de peixe vivo.

A análise dos dados do transporte, contabilizando apenas a etapa do percurso, mais do que insuficientes, tornam-se refutáveis, porque danos fisiológicos a médio/longo prazo, apenas se tornam perceptíveis na etapa complementar ao transporte, sendo importante o feedback do receptor. É importante a consciencialização de que mesmo com dados que suportem o uso de determinada substância, mais tarde, o aparecimento de novos métodos ou tecnologias, poderão sempre pôr em causa essa mesma substância. O acompanhamento da evolução deste campo é, assim, uma das principais preocupações e obrigações a ter em conta, quando se organiza um transporte de peixe vivo.

1.4.5. AmQuel®

O controlo da amónia durante o transporte de peixe vivo, é uma das problemáticas mais exigentes ao nível de controladores químicos. Nos anos 80, para controlar a amónia, era recorrente o uso de Clinoptilolite e Zeolite mineral, particularmente em transportes de longa duração, efectuados em sacos (Berka, 1986; Amend *et al.*, 1982; Bower & Turner, 1982). A Clinoptilolite é da família da Zeolite, pertencendo a um numeroso grupo de minerais que possuem uma estrutura porosa. São minerais de aluminosilicatos hidratados, que vão funcionar como adsorventes das moléculas de amónia. Devido à sua estrutura, podem ligar-se a uma diversidade de iões positivos, como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Devido a esta característica, estas substâncias tem uma elevada afinidade com o cálcio, podendo por isso causar a sua depleção da água, deixando de ser tão utilizados. Actualmente muitos transportes acabam por ser efectuados sem nenhum agente químico controlador de amónia, optando-se por várias mudanças de água, dependendo da duração e percurso de transporte. No entanto, mudanças de água durante o transporte poderão ser prejudiciais para os indivíduos, na medida em que se está a interferir negativamente numa situação, já de si, stressante. Existe uma outra opção, até agora viável, que consiste na remoção de amónia através de um agente quelante, o AmQuel® (Novalek Inc., U.S.A.), tendo sido utilizado, com sucesso, em diversos transportes de peixe vivo, particularmente elasmobrânquios (Correia *et al.*, 2010; Visser, 1996; Young *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2008).

O AmQuel® foi desenvolvido em 1980, com o intuito de controlar amónia, cloretos e cloraminas na água. O AmQuel® vai quelar a amónia, não a removendo, mas neutralizando a sua toxicidade, sendo necessária filtração biológica para converter a amónia, entretanto neutralizada, em nitrito e nitratos. O factor activo do AmQuel® é o hidroximetanosulfonato de sódio ($HOCH_2SO_3Na$) (Figura 3a). O hidroximetano vai reagir com a amónia, formando uma substância estável, não tóxica e solúvel em água. A parte sulfonato da molécula de AmQuel® vai reagir tanto com os hipocloritos (OCl^-), como cloretos, levando à formação de Cl^- e à reacção instantânea entre a amónia em solução e o hidroximetano (Figura 3b).

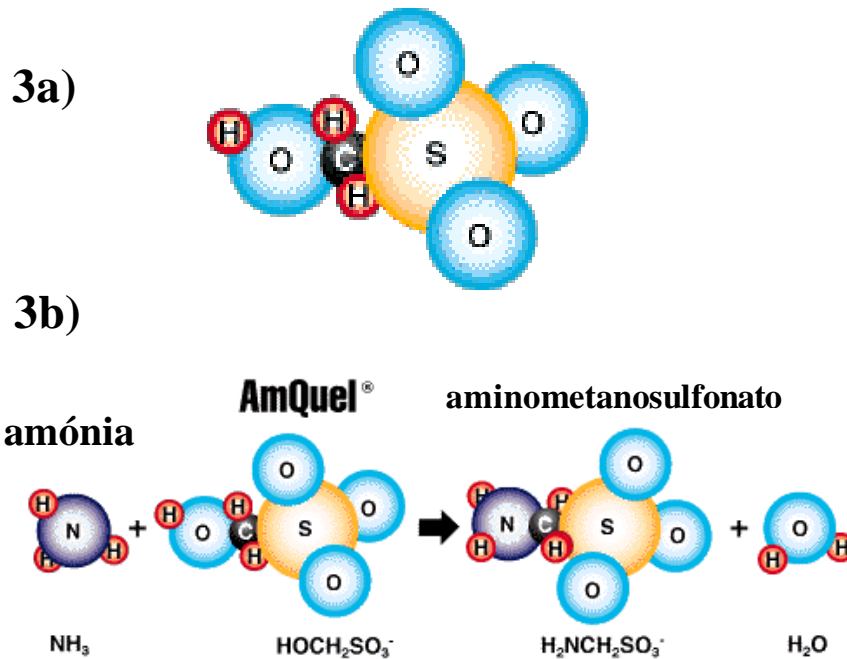


Figura 3: a) Hidroximetanosulfonato de sódio ($\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$), factor activo do AmQuel[®]. b) Reacção de hidroximetano com a amónia, formando uma substância estável, não tóxica e solúvel em água (adaptado de KORDON[®] LLC., 2009).

Segundo a marca representante deste produto, foram efectuados testes em que não só a molécula resultante desta reacção seria estável, como existe a garantia de que mesmo na inexistência de um filtro biológico, a amónia não será libertada novamente na água. Adicionalmente, a molécula de AmQuel[®] é também ela estável, e exceptuando as mudanças de água ou a existência de carvão activado em granulado no tanque, continuará disponível para reagir com a amónia, até o AmQuel[®] se encontrar completamente saturado na água em que foi adicionado. Esta será uma das vantagens deste produto, quando utilizado no transporte de peixe vivo, uma vez que permite que o excesso de AmQuel[®] adicionado ao tanque seja utilizado posteriormente à sua adição. Até ao presente, o AmQuel[®] adicionado não revela aparentes efeitos adversos, quer em teleósteos, elasmobrânquios, anfíbios ou invertebrados. O facto de o AmQuel[®] transformar a molécula de amónia numa forma não tóxica, confere vantagem relativamente a outros métodos que actuam por decoloração, deixando a amónia tóxica na água, necessitando de ser removida através de acção bacteriana ou por adsorção, como por exemplo através de Zeolites. O AmQuel[®] funcionará igualmente em água doce ou salgada, o que não se verifica nas Zeolites, uma vez que estas apenas funcionam em água doce.

É recomendado o uso de soluções tampão em conjunto com o AmQuel[®], uma vez que este vai baixar o pH, que já tem tendência a diminuir para níveis mais baixos, devido à libertação de iões H⁺ provenientes da respiração e produtos de excreção dos peixes. Este problema é acentuado no transporte em sacos de plástico, em trajectos longos, uma vez que se torna mais complicado controlar o pH num transporte em sistema fechado, devido à impossibilidade de se adicionar soluções tampão durante o transporte, como o que sucede em sistema aberto, onde uma súbita descida de pH poderá ser controlada com a adição de bases (ex: carbonato e bicarbonato). Em águas de baixo nível de mineralização, quando a amónia é removida do equilíbrio, vai diminuir o pH. No entanto, o AmQuel[®] não poderá ser usado em conjunto com soluções tampão que possuam um grupo amina (ex: solução *tris*), uma vez que esta molécula se vai ligar à molécula de AmQuel[®] (Robertson *et al.*, 1987), impedindo que esta se ligue à amónia.

É previsto que este produto actue nos primeiros 5 minutos após ser adicionado à água, não afectando as bactérias associadas ao ciclo do azoto, nem afectando a vida aquática. Apesar dos diversos testes, onde terão sido adicionadas quantidades 40 vezes superiores às recomendadas, sem se verificar qualquer dano para os indivíduos aquáticos testados, na realidade é difícil aferir ao certo que impactos poderão ter nesses mesmos indivíduos. Ainda que num transporte de peixe vivo, os indivíduos apenas sejam expostos ao AmQuel[®] durante o tempo do transporte, não existem certezas dos efeitos fisiológicos, que poderão ocorrer a médio ou longo prazo, particularmente em situações de exposição crónica ao AmQuel[®], como as verificadas em aquários.

Mais uma vez, é fundamental o feedback e cooperação entre todas as entidades intervenientes nas diversas etapas do transporte de peixe vivo, para uma melhor clarificação, certeza e partilha de informação, crucial na evolução e avaliação da viabilidade metodológica do transporte de peixe vivo.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho divide-se em duas partes (I e II), tendo em conta o seu perfil prático. A primeira parte engloba o acompanhamento do transporte e de simulações de transporte de teleósteos marinhos realizados pela empresa *Flying Sharks*. Nesta secção do trabalho incluem-se dados referentes a um transporte de corvinas (*Argyrosomus regius*) e duas simulações de transporte, uma de corvinas, correspondente ao transporte acompanhado, e outra de cavalas (*Scomber japonicus*) relativa a um transporte efectuado pela empresa e posteriormente descrito por Correia *et al.* (2010). A segunda parte do trabalho descreve quatro experiências executadas em laboratório, com o intuito de melhor compreender o funcionamento e comportamento do produto comercial AmQuel[®] no controlo dos níveis de amónia na água.

I – Metodologia de campo

Esta primeira parte do trabalho foi feita em parceria com a *Flying Sharks*, sendo possível o acompanhamento e observação de duas simulações de transporte e de um transporte efectivo. Realizaram-se colheitas de água, com o intuito de acompanhar o comportamento do cortisol (ver 2.5), monitorizando-se os principais parâmetros da água, como a temperatura e oxigénio dissolvido (utilizando-se uma sonda OxyGuard[®] Handy Oxygen probe[®]), pH (através de OxyGuard[®] Handy pH probe[®]) e amónia (usando-se o Palintest[®] Photometer 7000[®] photometer – Palintest, UK), em cada amostragem efectuada.

Os animais utilizados tanto no transporte efectivo como nas simulações de transporte, foram recolhidos pela empresa de pesca *Tunipex* durante a exploração de uma armação de atum ao largo do porto da Fuzeta. Os animais foram recolhidos com redes de vinil, não abrasivas, sendo transportados para terra em tanques redondos, em polietileno, com 1.6m de diâmetro, preenchidos com água do mar até uma altura de 1m. Este transporte até terra demora cerca de 1h, durante a qual o oxigénio foi fornecido através de pedras difusoras conectadas a uma garrafa de oxigénio, mantendo-se uma saturação de 150%.

Após a chegada às instalações em terra, os animais foram então transferidos para o tanque principal, em fibra de vidro, com 10m de diâmetro e 1.8m de altura. Este tanque possui um sistema de circulação de água, com uma taxa de renovação de água, diária, de cerca de 100%. Esta água é bombeada directamente da Ria Formosa, em

Olhão, onde as instalações da *Flying Sharks* se localizam. Este tanque não possui um sistema de controlo de temperatura, sendo necessário um período de aclimatização, entre 10 a 15 minutos, antes de os animais serem colocados no tanque. A filtração do tanque é efectuada mecanicamente através de um filtro de areia, e biologicamente através de bactérias estabelecidas num sistema de biobolas (*bioballs*) (Bailey & Dakin, 2001).

2.1. Simulação de transporte de corvinas (*Argyrosomus regius* Asso, 1801)

Para além de testar o material técnico de apoio ao transporte, as simulações garantem uma perspectiva do gasto dos químicos durante o transporte, e permitem também uma observação comportamental, normalmente difícil de realizar em transportes via rodoviária ou via aérea.

Esta simulação ocorreu a 12 de Novembro de 2008, com o propósito de se testar o comportamento de dois espécimes de corvinas, com 12.3Kg e 18.0Kg, em condições idênticas (ex: duração do ensaio, espaço físico, fornecimento de oxigénio, etc.) às existentes durante o transporte (Anexo I).

Após a sua captura e transferência do oceano para as instalações em terra, estes indivíduos foram sujeitos a uma adaptação, iniciando-se a sua alimentação um dia após a sua chegada. O regime alimentar destes indivíduos, passa pela introdução de cavalas (*Scomber japonicus* e *S. scombrus*) no tanque. Nos primeiros dias de cativeiro, as corvinas tendem a rejeitar alimento que não esteja vivo, sendo por isso fornecido espécimes de cavala, capturados diariamente pela *Tunipex*, sendo mantidos vivos para este propósito (Correia *et al.*, 2008).

Para a simulação, estes indivíduos foram colocados num tanque com um volume de 1.3 m³, durante 20h, correspondendo ao tempo previsto do transporte. A oxigenação do tanque foi garantida através de pedras difusoras conectadas a uma garrafa de oxigénio colocada no exterior, mantendo-se os níveis de oxigenação acima de 150% nas duas horas iniciais e superior a 300% nas restantes 18h de simulação. A cada intervalo de 2 horas mediram-se os principais parâmetros (pH, oxigénio dissolvido, temperatura e amónia) e foram retiradas amostras de água (1,5L), para posterior quantificação do cortisol.

Sempre que a amónia se aproximou de concentrações acima de 0,20 mg/L, adicionou-se um *cocktail* de AmQuel[®], bicarbonato e carbonato, com concentrações de 30ppm (0,030 g/L), 77ppm (0,077 g/L) e 38,5ppm (0,0385 g/L), respectivamente, com o

intuito de baixar a amónia e manter o pH. Nesta simulação, apenas foi necessária uma adição deste cocktail, à passagem da segunda hora, em que a amónia registou uma concentração de 0,33 mg/L, mantendo-se a concentrações aceitáveis até fim da experiência.

2.2. Simulação de transporte de cavalas (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782)

Nesta simulação foram testados dois tanques, simulando o mesmo transporte, onde num tanque (com tratamento) se utilizou um *cocktail* de AmQuel[®], bicarbonato e carbonato, e no outro (sem tratamento) os indivíduos foram mantidos no tanque sem qualquer espécie de controlador de amónia ou pH e sem qualquer mudança de água. O objectivo deste ensaio – para além de permitir encontrar possíveis problemas durante o transporte – passou por permitir a observação do aumento de amónia no tanque sem tratamento, servindo não só de controlo relativamente ao tanque “original”, com tratamento, como também para perceber se o aumento contínuo de amónia no tanque sem tratamento terá algum efeito na concentração de cortisol libertada pelos indivíduos para água, relativamente ao tanque com tratamento.

Após a sua captura, os indivíduos foram colocados no tanque principal. Um dia após a chegada, iniciou-se a administração de alimento, distribuindo-se camarão congelado (*Palaemonetes varians*), com cerca de 5 a 8 mm de comprimento, pela superfície da água (Correia *et al.*, 2010). Para a simulação, os indivíduos foram transferidos para dois tanques redondos, em polietileno. Cada tanque tinha um volume de água de 1.5 m³, com 250 indivíduos em cada tanque.

Esta simulação ocorreu a 25 de Maio de 2009 e teve uma duração de 17h (Anexo II). O *cocktail* de Amquel[®], bicarbonato e carbonato utilizado foi de 15ppm, 15ppm e 7,5ppm, respectivamente, adicionados apenas no tanque com tratamento. Devido à concentração inicial de amónia existente no tanque (0,039 mg/L), foi adicionado este *cocktail* no início da simulação, sendo necessário adições extra, à passagem da quarta, quinta, sétima e décima hora. A oxigenação variou entre os 100% e 250% nos dois tanques e serviu de exemplo da utilidade duma simulação, uma vez que a 4/5 horas do final da experiência, se verificou uma falência no oxigénio, implicando um aprovisionamento extra de oxigénio, no transporte em si. Com o intuito de simular o transporte o mais fiável possível, entre a sétima e a décima hora, a bomba de oxigenação foi desligada, uma vez que esta parte corresponderia ao tempo de transporte

percorrido por via aérea, onde não é permitido este tipo de oxigenação, nem qualquer contacto com o tanque, devido ao seu acondicionamento restrito.

2.3. Transporte de corvinas (*Argyrosomus regius* Asso, 1801)

A 20 de Novembro de 2008, acompanhou-se a empresa Flying Sharks no transporte de 32 corvinas, desde Olhão até Tarragona (Norte Espanha) (Figura 4a), para as instalações do IRTA, onde se desenvolve um estudo para reproduzir estes indivíduos em cativeiro, para uso futuro em aquacultura (Duncan *et al.*, 2009). O transporte foi efectuado por via rodoviária, num veículo especializado para o transporte de peixe vivo (Figura 4b). Monitorizaram-se 3 tanques, com 3 indivíduos em cada tanque (n=9), com a massa total em cada tanque oscilando entre os 31 Kg e 37 Kg. A duração do transporte foi de 20h, sendo administrado um cocktail de AmQuel[®], bicarbonato e carbonato à passagem da 12^a hora. Foram retiradas amostragens de água dos tanques, no início e ao fim de 4, 8, 14 e 18 horas (T₀, T₄, T₈, T₁₄ e T₁₈, respectivamente), registando-se os principais parâmetros da água de transporte. Destes 32 indivíduos, apenas um não sobreviveu, não durante o transporte, mas durante o tempo de quarentena no local de destino.

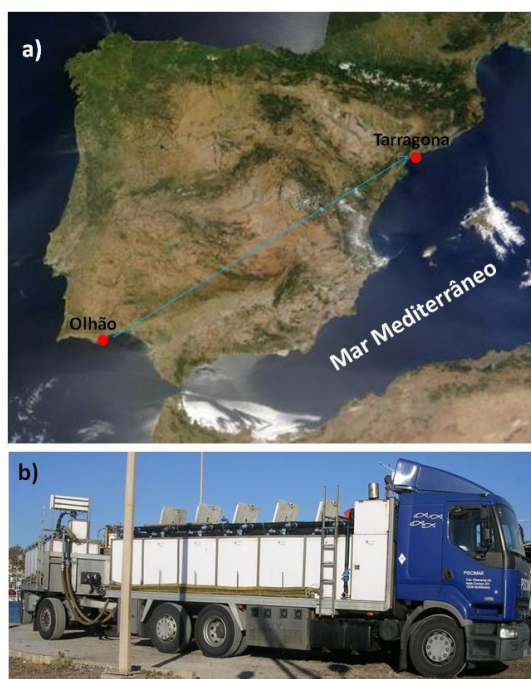


Figura 4 – Na figura 4a), encontra-se a representação geográfica do trajecto do transporte, entre as instalações da *Flying Sharks* em Olhão (Portugal) e as instalações do IRTA, em Tarragona (Espanha). O transporte teve a duração de 20h e foi efectuado através da viatura representada em 4b). (figura 4a) adaptada de Jacques Descloitres, MODIS Rapid Response Team, NASA/GSFC).

2.4. Quantificação de amónia na água

Tanto no transporte como em ambas as simulações, a quantificação de amónia na água foi feita através de um teste rápido, colorimétrico. Devido à sua rapidez de leitura (entre 10 a 15min), simplicidade metodológica e carácter móvel, o *Palintest® Photometer 7000® photometer* – Palintest, U.K., permite uma quantificação de amónia na água, facilitando o processo de transporte, onde as paragens efectuadas durante o transporte deverão ser céleres e com resultados imediatos das condições dos tanques de transporte.

Este teste baseia-se no método do indofenol, em que a amónia, na presença de cloro, vai reagir com salicilato alcalino, formando um complexo de indofenol, de cor verde. A concentração de amónia existente nas amostras irá ser proporcional à intensidade de cor produzida, que é então medida, em forma de absorvância, por um fotómetro portátil.

Para a realização deste teste, são necessários dois reagentes (*Palintest Ammonia N°1* e *Palintest Ammonia N°2*), fornecidos em forma de comprimido, sendo adicionados um de cada às amostras. Como estas amostras provêm da água salgada, para evitar a precipitação de sais, que levam a uma leitura errónea, adicionou-se hidróxido de lítio, fornecido em pó, com a própria medida incorporada no frasco, em forma de uma pequena colher.

- Metodologia:

1. Recolha de 10mL de amostra, que é então colocada dentro do tubo PALINTEST®;
2. Adicionaram-se os dois reagentes e uma colher de hidróxido de lítio, dissolvendo-os completamente;
3. Aguardou-se entre 10-15min., dependendo da temperatura das amostras. A temperaturas inferiores a 20°C, o desenvolvimento da cor é mais demorado, devendo por isso aguardar-se 15min. Para temperaturas superiores a 20°C, 10min. serão suficientes para a cor se revelar;
4. Após este tempo, procedeu-se à respectiva leitura da amostra, utilizando fotómetro.

2.5. Quantificação de cortisol na água e no plasma

Neste trabalho recolheram-se amostras de água nas duas simulações e no transporte (tabela I), recolhendo-se amostras de sangue apenas no transporte de corvinas.

Tabela I: Esquemática da amostragem de recolha de água, durante um transporte e duas simulações.

Característica do Teste	Espécie	Duração do teste (horas)	Amostragens (horas)	Total Amostras
Transporte	<i>Argyrosomus regius</i>	18	T ₀ ; T ₄ ; T ₈ ; T ₁₄ ; T ₁₈ .	15 (3 tanques x 5 tempos)
Simulação	<i>Argyrosomus regius</i>	20	T ₀ a T ₂₀ (2h em 2h)	11 (11 tempos)
Simulação	COM	20	T ₀ a T ₂₀ (2h em 2h)	11 (11 tempos)
	AmQuel®			
	SEM	20	T ₀ a T ₂₀ (2h em 2h)	11 (11 tempos)
	AmQuel®			

2.5.1. Recolha de amostras de água

Devido ao ambiente controlável e maior estabilidade existente durante ambas as simulações, retiraram-se amostras dos respectivos tanques, com intervalos de tempo de 2h em 2h. No transporte, com rotas, tempos e paragens a cumprir, torna-se difícil uma amostragem perfeitamente sistemática. No entanto, foram recolhidas amostras de água em intervalos espaçados o mais semelhante possível, ocorrendo entre 4h a 6h. A amostragem de água de cada tanque, a diversos tempos de amostragem, serviu para se obter uma perspectiva geral, das concentrações de cortisol, em cada tanque.

- Metodologia recolha de água:
 1. Com um recipiente próprio, de plástico, recolheu-se 1L de água, para cada amostra;
 2. As amostras foram imediatamente congeladas, para posterior filtração;

3. As amostras foram então filtradas, primeiro por um filtro de papel e depois por um cartucho ISOLUTE®SPE C18, utilizando um sistema de bomba a vácuo (Figura 5).

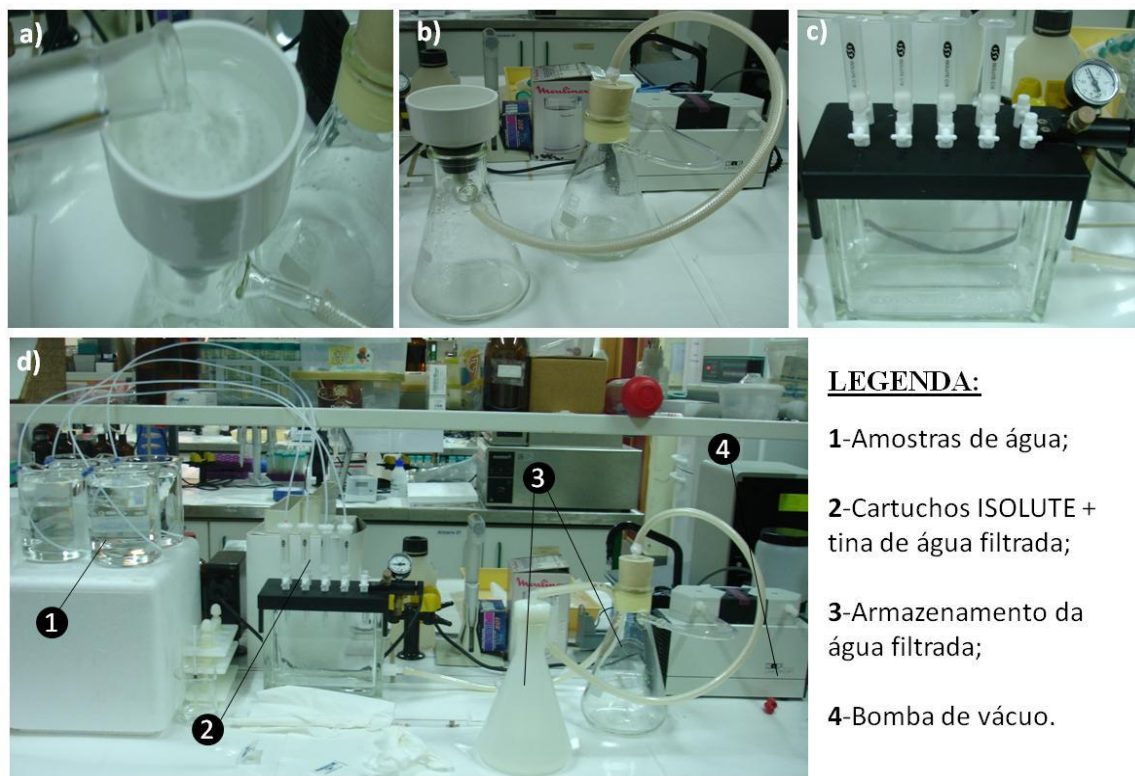


Figura 5 – Processo de filtração das amostras de água. *a)* Filtração através de um filtro de papel, recorrendo a um sistema de vácuo (*b*). Após a filtração com filtro, procedeu-se à filtração através de cartuchos ISOLUTE®SPE C18 (*c*), montando-se um sistema de vácuo, esquematizado em *d*).

- Filtração das amostras de água:

Uma vez recolhidas as amostras, estas são filtradas por um filtro de papel, para retirar as partículas maiores, que se vão acumulando no tanque, e que devido ao seu tamanho iriam colmatar o filtro do cartucho. A filtração com cartuchos ISOLUTE®SPE C18 retém as moléculas de cortisol na coluna de filtração do cartucho. Para que as moléculas de cortisol sejam retidas eficazmente no filtro, a filtração tem de ocorrer de forma muito lenta, gota a gota, a uma velocidade aproximada de 1gota/s. Após filtração, as amostras foram recolhidas e conservadas para posterior análise.

- Etapas filtração das amostras de água:

- Activação dos cartuchos C18:

1. Adicionou-se 5mL de metanol ao cartucho, descartando-se o metanol eluído. Efectuou-se este passo duas vezes;
2. Adicionou-se 5mL de água destilada, sendo descartada após eluída;
3. Repetiu-se o passo anterior, mantendo-se uma pequena quantidade de água acima da coluna de filtração, para impedir que este seque.

- Filtração das amostras nos cartuchos:

1. Adicionou-se o volume (1L) de água, previamente filtrada pelo filtro de papel, ao cartucho;
2. Utilizaram-se tubos de sucção, para conectarem as amostras com os respectivos cartuchos;
3. Sempre que foi necessário parar a filtração (ex: esvaziar os recipientes onde a água das amostras se vai acumulando após filtração), existiu sempre o cuidado de nunca deixar o filtro secar.

- Eluição do material retido no cartucho:

1. Retirou-se toda a água da tina, colocando-se os tubos no suporte, dentro da tina, sobrepostos ao respectivo cartucho com a amostra correspondente à etiqueta de cada tubo;
2. Adicionou-se 5 mL de metanol, recolhendo-se a amostra nos respectivos tubos. Efectuou-se este passo duas vezes, obtendo-se o total de 10mL para cada amostra.

- Evaporação do solvente usado na eluição:

1. As amostras foram colocadas em banho seco (40°C), sob fluxo de azoto gasoso para evaporar o metanol;
2. Após a evaporação estar completa, retirou-se os tubos do banho seco, adicionando-se 1 mL de tampão fosfato;
3. Agitou-se os tubos no vortex;
4. Congelou-se as amostras (-20°C) até ao procedimento para doseamento de cortisol, através do Radioimunoensaio (RIA).

2.5.2.Recolha amostras de sangue

No transporte efectuado, optou-se por uma amostragem de sangue à partida e à chegada, nos indivíduos dos três tanques monitorizados, com o intuito de recolher uma perspectiva individual, ao nível da concentração de cortisol.

Num transporte de peixe vivo, esta amostragem poderá ser necessária à chegada ao destino, fazendo parte da monitorização *standard* a nível de possíveis infecções, desenvolvidas durante o transporte. Uma possível amostragem à partida, apenas será coerente se realizada para fins científicos. Causar qualquer tipo de estímulo, capaz de activar a resposta ao stress, previamente ao transporte, será acrescentar ou acentuar um problema, ainda antes ao início do transporte.

- Metodologia recolha de amostra de sangue (*Argyrosomus regius*):
 1. Recolheu-se 1mL de sangue, à partida e à chegada, de nove espécimes de *Argyrosomus regius*;
 2. O sangue foi recolhido da artéria caudal, com uma seringa U-100 INSULIN 1mL (figura 6);
 3. Procedeu-se à centrifugação das amostras, durante 15 minutos, a 5500 r.p.m., à temperatura de 4°C, recolhendo-se o plasma, entretanto separado dos restantes componentes do sangue;



Figura 6 – Recolha de sangue (1mL) da artéria caudal de um indivíduo de *Argyrosomus regius*.

- Extracção de Esteróides:
 1. Retirou-se 100µL de plasma, de cada amostra, transferindo-os para respectivos tubos de extracção;
 2. Adicionou-se 3mL de éter dietílico a cada tubo;
 3. Agitou-se em *vortéx*, durante 5min., cada amostra;
 4. Centrifugou-se os tubos, durante 5min., a 200 rpm, 5°C, formando-se duas fracções, uma orgânica, contendo os esteróides livres, e uma aquosa, contendo os restantes componentes do plasma;
 5. Colocou-se os tubos em azoto líquido, durante 10seg., para separar as duas fases. A fase aquosa irá congelar, permitindo transferir o sobrenadante contendo a fase orgânica, para novos tubos de vidro (5mL);
 6. Para evaporação do éter, colocou-se os tubos em banho-seco (42°C);
 7. Após evaporação, adicionou-se mais 3mL de éter dietílico, repetindo-se os passos 2-6;
 8. Após segunda evaporação, os esteróides livres foram ressuspensos em 1mL de tampão gelatina: 0,5g gelatina + 0,5mL tampão fosfato + 500mL água desionizada;
 9. Procedeu-se à respectiva quantificação, através da realização de RIA para cortisol.

2.5.3. Radioimunoensaio (RIA)

O princípio dos RIAs baseia-se na competição entre o antigénio que se quer dosear - denominado antigénio “frio”, uma vez que não é marcado radioactivamente – e o antigénio marcado radioactivamente, em condições onde a concentração de anticorpo é limitante (Figura 7) (©Abbott Laboratories, 2008; Andrade, 2006; Chard, 1978).

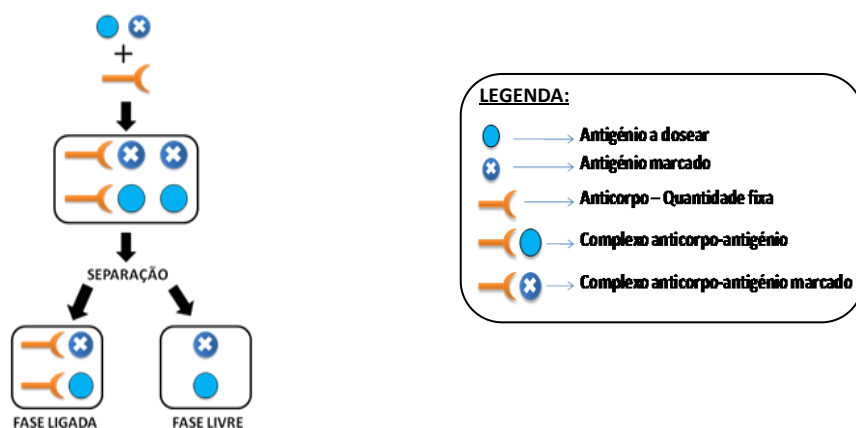


Figura 7 - Esquematização do princípio da técnica de RIA, baseado na competição entre o antígeno que se quer dosear e o antígeno marcado radioativamente, em condições onde a concentração de anticorpo é limitante, procedendo-se de seguida às respectivas contagens da fase ligada e da fase livre.

Assim sendo, quanto maior for a concentração de antígeno “frio” na amostra, menor a concentração de antígeno marcado que se liga ao anticorpo, resultando em menores níveis de radioactividade expressos no fim do ensaio.

Neste trabalho efectuou-se o RIA em 70 amostras:

- *Argyrosomus regius*:
 - 1 a 26: amostras água → 15 transporte + 11 simulação;
 - 27 a 48: amostras plasma → 18 transporte (n=9 x 2 amostragens [Partida + Chegada]) + 4 simulação (n=2 x 2 amostragens [$T_{inicial}$ + T_{final}]).
- *Scomber japonicus*
 - 49 a 70: amostras água → 22 simulação (11 tempos x 2 tanques [Com e Sem AmQuel®])

Durante todo este procedimento, incluindo a preparação das soluções padrão, é crucial que as amostras estejam sempre em gelo. Assim, ao se garantir que as amostras se encontram todas à mesma temperatura, consegue-se alguma estabilidade, uma vez que as reacções antígeno-anticorpo dependem da temperatura.

Para cada amostra de plasma, foram retirados 15µL, ao qual se adicionou 300µL de solução tampão num *ependorf* de 1.5mL, para diluir as amostras. A diluição evita que as moléculas de grande dimensão existentes no plasma, como as proteínas, interfiram na ligação das moléculas ao anticorpo (Guerreiro *et al.*, 2006). As amostras

foram então desnaturadas, a 70°C, durante 30 minutos, para evitar que as proteínas se liguem, com conseqüente interferência nos resultados finais.

Numeraram-se os tubos em duplicado e estes foram colocados num suporte metálico da seguinte forma: Padrões: S₁-S₁₂; T - Total; M - Máximo; B - Branco; Amostras: 1-70; Controlo (32ng/mL): C₁ e C₂. Foram adicionados 100µL de uma solução com marcador (5µL em 10mL), contendo cortisol marcado com trítio, para obter 1500cpm/100µL de solução. As amostras foram então incubadas a 4°C durante a noite.

A validação de um ensaio é crucial para se chegar a conclusões estatísticas válidas (Makkar, 2008). A curva de calibração é um dos principais passos de um radioimunoensaio (©Abbott Laboratories, 2008). A curva padrão foi preparada através de várias diluições de hormona não marcada, em cadeia (1:2), da concentração mais alta para a mais baixa. Estes padrões são processados da mesma maneira que as amostras, sendo diluídos no mesmo volume com o tampão fosfato com gelatina. Para além da adição da hormona não marcada, adicionou-se também a solução anticorpo-marcador (21µL em 10mL). Os padrões (S₁-S₉) ficaram então com as seguintes concentrações (ng/mL): 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1.25 e 0.625, dos quais se retiraram 5µL para cada tubo do RIA, adicionando-se 100µL de tampão gelatina. A concentração 0 da curva padrão equivale ao máximo, com 50% de ligação, sem Hormona “Fria”.

Após a incubação, adicionou-se 250µL de carvão activado a todos os tubos excepto no T, onde se adicionou 250µL de tampão fosfato, uma vez que este representa o número total de contagens, tendo apenas hormona marcada, indicando a actividade total ocorrente em cada tubo. Esta adição de carvão activado, serve para separar a fase ligada da fase livre (ver figura 7), uma vez que apenas as moléculas pequenas ficam adsorvidas nos poros do carvão activado. Este passo não deve demorar mais do que 12 minutos, para garantir que o tempo de adição entre o primeiro e o último tubo não comprometa a adsorção de moléculas, pois se estas estiverem demasiado tempo em carvão activado, as moléculas grandes começam também a ser adsorvidas. O carvão activado vai ligar-se ao antigénio marcado, separando-o do complexo antigénio-anticorpo em suspensão.

De seguida, para separar os antigénios ligados ao carvão do sobrenadante, centrifugaram-se os tubos durante 12 minutos, a 4°C e 2000 rpm. O sobrenadante dos tubos RIA foi então colocado em frascos de cintilação. Adicionaram-se 4ml de líquido cintilante (Ecolite (+) ICN) ao sobrenadante contido nos tubos de cintilação. Os níveis de radioactividade emitidos foram medidos num contador de cintilações *Beckman LS*

6500. O antigénio “quente” (marcado radioactivamente) vai competir com o antigénio “frio” pelos locais de ligação no anticorpo. Assim, quanto maior a quantidade de antigénio “frio” na amostra, maior a quantidade de antigénio “quente” que fica livre nos tubos. Espera-se que amostras com maior quantidade de antigénio “frio”, tenham menor cintilação, uma vez que o antigénio “quente” irá ficar adsorvido ao carvão activado.

Os resultados foram então tratados, numa folha de Excel, onde se converteram as contagens de cintilação das hormonas nas amostras de cpm para ng/mL, através das concentrações obtidas na curva padrão.

II – Metodologia Laboratorial

Nesta parte da metodologia efectuada em laboratório, explorou-se a dinâmica amónia *versus* AmQuel[®], com o intuito de facilitar a optimização de uma dinâmica com cada vez mais impacto no transporte de peixe vivo.

Com este propósito, foram então efectuados vários testes, envolvendo diversas concentrações de amónia e AmQuel[®], com e sem simulação de uma taxa de excreção.

(NOTA: para facilidade de comparação → 1mg/L NH₄⁺ = 0,056mM = 1PPM)

Durante estas experiências, foram testadas 5 concentrações de AmQuel[®]. O AmQuel[®] foi sempre adicionado em conjunto com Bicarbonato e carbonato, formando um *cocktail*, denominado A, B, C, D e E, consoante as respectivas concentrações (Tabela II).

Tabela II: diversos *cocktails*, contendo diferentes quantidades de AmQuel[®], bicarbonato e carbonato, utilizados nas experiências de laboratório.

<i>Cocktail</i>	AmQuel[®] (mg/L = PPM)	Bicarbonato (mg/L = PPM)	Carbonato (mg/L = PPM)
A	20	20	10
B	15	15	15
C	10	10	10
D	7,5	7,5	3,75
E	5	5	5

Foram efectuadas quatro experiências diferentes (I, II, III e IV) para uma percepção da reacção do AmQuel[®], quando exposto a diferentes concentrações de amónia (Tabela III). Estas concentrações de amónia foram manipuladas com o intuito de se aproximarem de situações reais, que poderão acontecer durante um transporte de peixe vivo. Por exemplo, até que ponto a concentração de amónia inicial, na água do tanque de transporte, terá ou não influência na aproximação que se faz a esse mesmo transporte e até que ponto essa possível interferência terá consequências nos indivíduos, durante e/ou após o transporte.

Tabela III – Principais aspectos e variantes existentes nas quatro experiências realizadas e, laboratório.

# Ensaio	Amónia Inicial (mg/L)	Taxa Excreção (mg/L)	Cocktail AmQuel [®]
I	0,25/ 0,50/ 1,00 1,50/ 2,50	-	A, B, C, D, E
II	-	200	0 (N), A, B, C
III	-	0/ 25/ 100/ 250/ 500	B, C
IV	0,250	0/ 25/ 100/ 250/ 500	B, C

2.6. Diferentes concentrações iniciais de Amónia vs 5 cocktails AmQuel[®] – I

Nesta experiência, adicionou-se uma concentração inicial de amónia a cada tanque. Cada um dos 5 tanques representou as 5 diferentes concentrações do *cocktail* de AmQuel[®] (A, B, C, D, e E). Repetiu-se esta experiência, para um total de 5 concentrações iniciais de amónia (0,25mg/L; 0,50mg/L; 1,00mg/L; 1,50mg/L e 2,50mg/L) testada com cada um dos 5 cocktails de AmQuel[®] (Figura 8).

Foram recolhidas amostras em 9 tempos (min.): T₀, T₁, T₂, T₃, T₅, T₇, T₁₀, T₁₅, que posteriormente foram tratadas segundo o método Koroleff (ver 2.10), para doseamento de amónia.

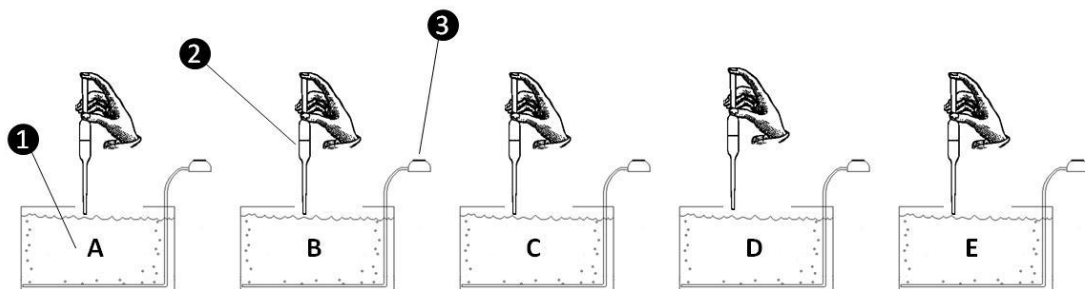


Figura 8 – Esquemática da experiência I. 1: Para cada tanque com respectivo cocktail de AmQuel® (A, B, C, D e E), foram testadas diferentes concentrações iniciais de amônia (2). Todos os tanques foram oxigenados através de uma pedra difusora (3).

2.7. Simulação de uma taxa de excreção de amônia (200mg/L), constante, vs 5 cocktails AmQuel® - II

Nas experiências 2, 3 e 4, recorreu-se a uma bomba peristáltica (*MasterFlex L/STM – Pump drive 0,1 HP, 6-600 rpm – Cole-Parmer Instrument Company*) e respectivo controlador de velocidade (*MasterFlex L/STM – Modular controller - Cole-Parmer Instrument Company*) para simular uma taxa de excreção de amônia constante (2mg/h). Para se obter esta taxa, recorreu-se às diversas fontes bibliográficas, que apontam para uma taxa de excreção de amônia entre 1-10mg/Kg/h (Anexo III). Assumindo a existência de um tanque, com 1500L de volume e 150 indivíduos com cerca de 100g de massa cada um, equivale a uma massa total, no tanque, de 10g/L. Estas experiências foram efectuadas em tanques de 20L. Se cada litro equivale a 10g, então 20L corresponderão a 200g. Se ajustarmos esta equivalência à taxa de excreção obtida bibliograficamente, multiplicando-as, obtém-se uma taxa de excreção entre 0,2-2mg/h. Como um dos objectivos destes ensaios passa pela simulação de situações extremas, mas realísticas, de elevadas concentrações de amônia, optou-se pela taxa mais elevada, de 2mg/h. Estes ensaios tiveram a duração de 10h, equivalendo a um total de 20mg/10h. A uma velocidade equivalente a 10mL/h, com uma taxa de excreção equivalente a 2mg/h, corresponde uma concentração de amônia de 2mg/10ml (200mg/L).

Nesta experiência adicionou-se inicialmente (T_0) cada *cocktail* de AmQuel® (A, B e C), ao respectivo tanque, para observar o seu efeito quelante e o seu tempo de reacção, quando exposto a um *input* contínuo de amônia (Figura 9). Adicionou-se ainda um tanque controlo, com igual tratamento relativamente aos restantes tanques, mas sem adição de um *cocktail* de AmQuel®.

Foram recolhidas amostras em 12 tempos (h): T_i , T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 , T_9 e T_{10} , que posteriormente foram tratadas segundo o método Koroleff (ver 2.10), para possibilitar a leitura das suas absorvâncias, através do espectrofotómetro.

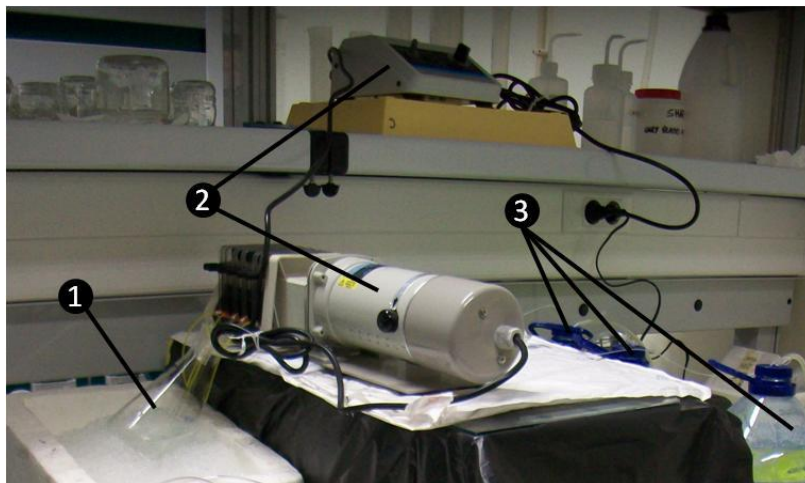


Figura 9 – Esquematização da segunda experiência (II). **1:** Solução de amônia e respectivos tubos para cada tanque. **2:** bomba e respectivo controlador de velocidade. **3:** tanques com diferentes cocktails de AmQuel® - A, B e C.

2.8. Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel® - III

Nesta experiência, partiu-se de uma concentração inicial de amónia, nula, adicionando-se inicialmente (T_0) o *cocktail* de AmQuel® a cada tanque, para observar o seu efeito quelante e o seu tempo de reacção, quando exposto a diferentes taxas de excreção de amónia. Utilizaram-se 5 taxas de excreção de amónia diferentes (0mg/L; 25mg/L; 100mg/L; 250mg/L e 500mg/L) sendo bombeada uma concentração para cada tanque. Efectuou-se esta experiência para dois cocktails intermédios, B e C, observando as suas diferentes reacções, a concentrações cumulativas de amónia (Figura 10).

Foram recolhidas amostras em 10 tempos (h): T_i , T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 e T_8 , sendo posteriormente tratadas aplicando o método Koroleff (ver 2.10), para possibilitar a leitura das suas absorvâncias, através do espectrofotómetro.

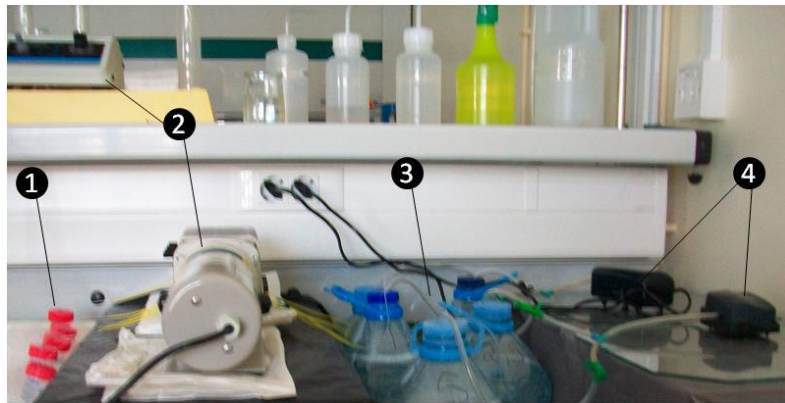


Figura 10 – Esquematização da experiência III. **1:** diferentes soluções de amónia (0mg/L; 25mg/L; 100mg/L; 250mg/L e 500mg/L), que são bombeados (**2**) para os diferentes tanques (**3**), utilizando o mesmo *cocktail* de AmQuel® (B ou C). A oxigenação foi garantida através de pedras difusoras, ligadas a uma bomba de ar (**4**).

2.9. Concentração inicial amónia (0,25mg/L) + Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel® - IV

Esta experiência é a junção da experiência I e III. Iniciou-se a experiência com uma concentração inicial de amónia, em cada tanque, de 0,25mg/L. Adicionou-se o *cocktail* a cada tanque e iniciou-se a fase de simulação de diferentes taxas de excreção de amónia (0mg/L; 25mg/L; 100mg/L; 250mg/L e 500mg/L), bombeadas individualmente para cada tanque respectivo (Figura 11).

Efectuou-se esta experiência para dois *cocktails* intermédios, B e C, observando as suas diferentes reacções, a concentrações cumulativas de amónia, em águas contendo amónia em solução.

Foram recolhidas amostras em 13 tempos (h): T_i; T₋₁; T₀; T_{0,25}; T_{0,50}; T₁; T₂; T₃; T₄; T₅; T₆; T₇ e T₈, sendo posteriormente tratadas aplicando o método Koroleff (ver 2.10), para possibilitar a leitura de suas absorvâncias, através do espectrofotómetro.

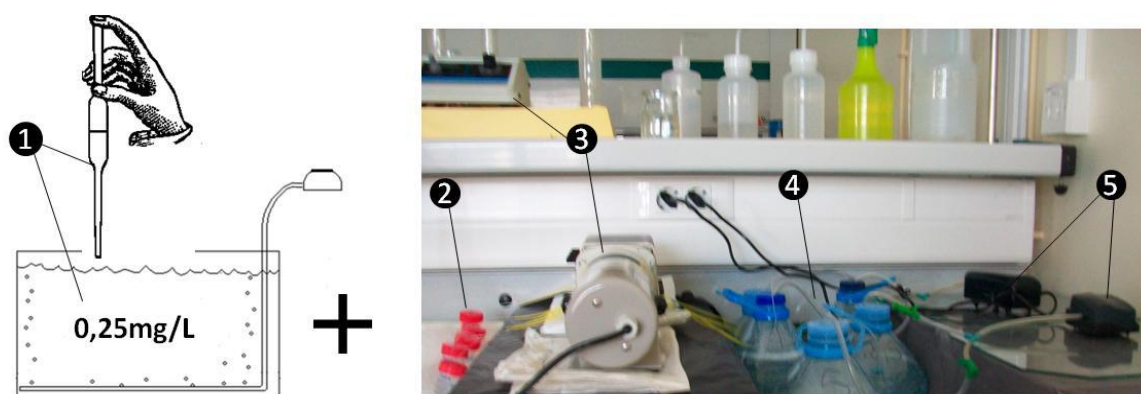


Figura 11 – Esquemática da experiência IV. Na primeira parte, adicionou-se amónia ficando o tanque a uma concentração inicial de 0,25mg/L (1). 2: diferentes taxas de excreção de amónia (0mg/L; 25mg/L; 100mg/L; 250mg/L e 500mg/L), continuamente bombeadas (3) para os respectivos tanques (4). A oxigenação foi garantida através de pedras difusoras, ligadas a uma bomba de ar (5).

2.10. Quantificação de amónia na água

Data de 1859 o primeiro registo da formação de cor azulada do indofenol, como produto da reacção entre fenol e hipoclorito, na presença de NH_3 . Para se obter sensibilidade suficiente é necessário um catalisador ou temperatura elevada. O princípio do método de Koroleff (1983), baseia-se na reacção da amónia com o hipoclorito em soluções moderadamente alcalinas, formando monocloramina, que na presença de fenol, de quantidades catalíticas de iões de nitroprussiato de sódio (nitroferrocianeto de sódio) e excesso de hipoclorito, origina o azul de indofenol (Koroleff, 1983).

Para as mesmas quantidades de amónia, em água destilada ou salgada, a produção de azul de indofenol é inferior em água salgada. Isto deve-se ao efeito dos iões em solução na água salgada, particularmente do magnésio, e do efeito tamponizador da água salgada (HSA, 2006; OATA, 2008).

Originalmente, esta metodologia (Koroleff, 1983) foi concebida para 50mL. Devido ao volume das nossas amostras (1mL), adaptou-se esta metodologia para 1mL.

Após a recolha das amostras, estas foram conservadas no frio, não se devendo ultrapassar as 3h, desde o momento de recolha e a adição dos reagentes.

Utilizaram-se três reagentes (solução tampão, fenol e solução oxidante), adicionando-se a cada amostra, 30 μL de cada reagente. A solução tampão vai actuar como um agente quelante, mantendo o magnésio em solução. O nitroferrocianeto de sódio contido no reagente fenol, vai actuar como catalisador da reacção. Por último,

adicionou-se uma solução oxidante de diclorocianeto de sódio, dissolvida em 10mL de NaOH.

Após a adição dos reagentes, as amostras foram agitadas em *vortex*, sendo armazenadas num sítio seco, escuro e a temperatura ambiente, aguardando-se entre 10h a 24h para se proceder à respectiva leitura de absorvância.

A leitura de absorvância das amostras, foi efectuada através de um espectrofotómetro HITACHI U-2000 *Spectrophotometer*. Devido à possível formação de precipitado, deverá pipetar-se apenas o líquido, quando se efectuar a transferência das amostras, dos respectivos tubos de ensaio, para cada *cuvette*. Procedeu-se então à análise da absorção de amostras, na região espectral de 630nm.

Para a transformação de absorvâncias em concentrações, efectuou-se uma curva padrão em cada ensaio realizado, com o intuito de obter o declive desta recta, que irá permitir a conversão correspondente. Para a construção da curva padrão, utilizaram-se seis concentrações padrão (0.000, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000 e 2.000) (mg/L), de acordo com a janela de resultados esperada.

2.11. Análise estatística

Para comparação entre os valores de cortisol no plasma, antes e depois do transporte, foi utilizado o teste *t-student*.

Para comparar os efeitos de diferentes concentrações de AmQuel[®] na taxa de extinção ou de acumulação de amónia foram utilizados ajustes de rectas. O melhor ajuste foi seleccionado com base no factor R^2 e os declives comparados entre si para determinar a significância relativa de cada tratamento.

Foram utilizados dois softwares, o *sigmastat* e o *sigmaplot*, para representação gráfica dos resultados.

3.RESULTADOS

3.1.Simulação (S) e transporte de corvinas (*Argyrossomus regius*)

Na figura 12 estão representados os parâmetros essenciais, amostrados (na água) num tanque durante a simulação e nos três tanques (I, II e III) do transporte efectivo. Na coluna da esquerda pode-se observar a relação entre cortisol (ng/mL) e amónia (mg/L), em função do tempo (h). Verifica-se um aumento esperado da concentração de cortisol, tanto na simulação como no transporte. A diminuição na concentração de amónia resulta da adição de AmQuel[®] e consequente efeito quelante.

Na coluna da direita, encontra-se esquematizado a taxa de cortisol (ng/h/Kg), nos respectivos intervalos de tempo. Seria de esperar uma concentração crescente, no entanto, em alguns intervalos (S₂, S₁₀, S₁₂, I₁₄, II₁₄ e III₈) tal não se sucedeu. Por outro lado, as maiores taxas de cortisol foram obtidas na última amostragem, no fim do transporte.

Os níveis de saturação de oxigénio dissolvido (OD) foram ligeiramente mais elevados durante a simulação (aproximadamente 300%), que durante o transporte, onde se verificou uma saturação média de 250%. No entanto, durante o transporte, o OD mínimo registado foi de 230%, enquanto na simulação obteve-se uma saturação mínima de 144% (Anexo I).

Relativamente à temperatura, registou-se uma variação de 2°C (15.1°C – 17.1°C) entre temperatura mínima e máxima, durante a simulação, e uma variação de 1°C durante o transporte (14,9°C – 15,9°C) (Anexo I).

O pH obtido, tanto na simulação (7.53 – 8,08), como no transporte (7.83 – 8.17), não registou variações significativas. De notar que o pH mais ácido registado, na simulação (7.53), corresponde à última amostragem, após 20h de ensaio (Anexo II).

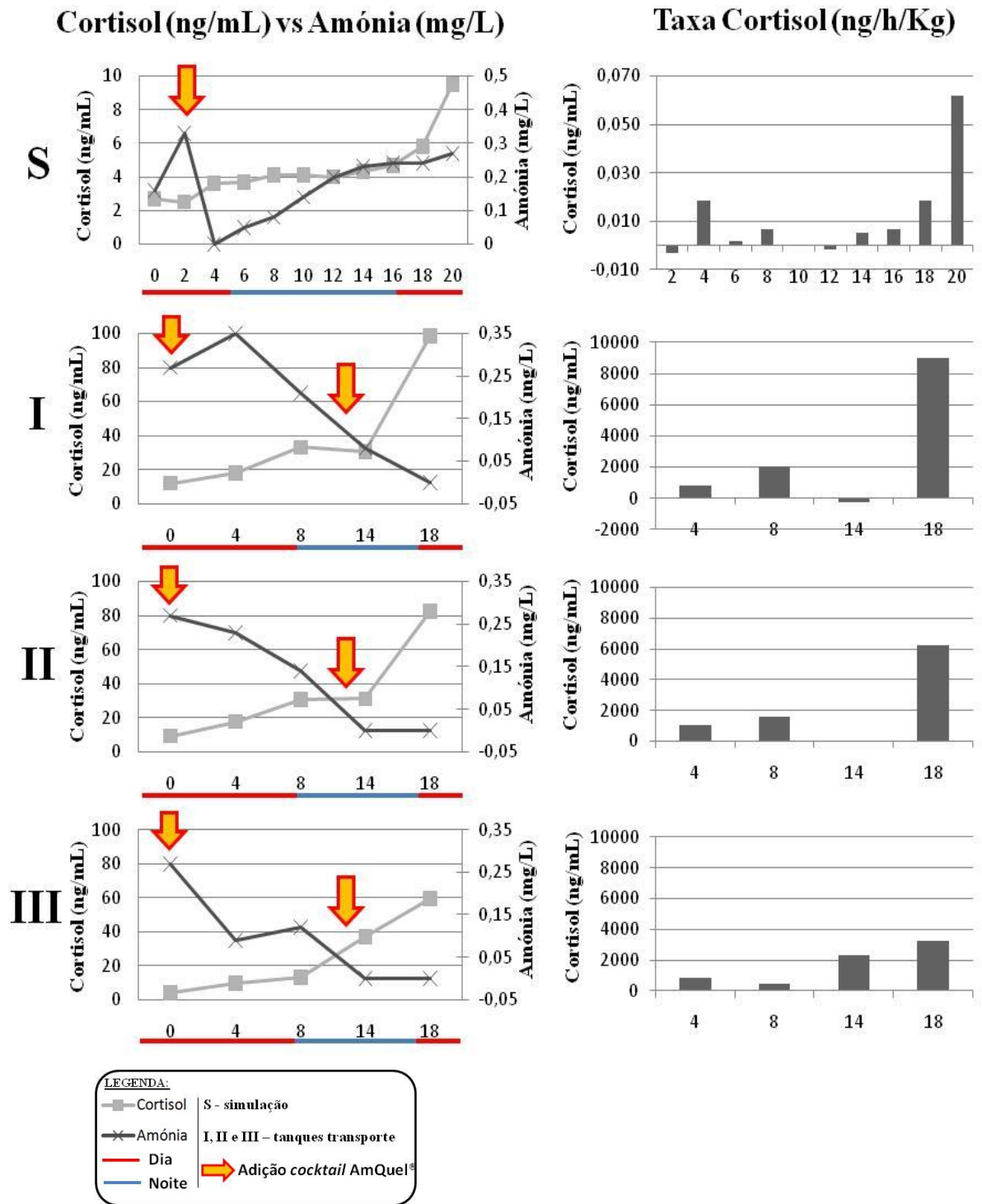


Figura 12: Concentração de cortisol vs concentração de amónia (esquerda), e respectiva taxa de cortisol (direita) nos intervalos de tempo (h) (eixo x), entre as amostragens efectuadas durante uma simulação (S) e transporte (tanque I, II, e III) de corvinas.

3.1.1. Concentração de cortisol (plasma) em cada indivíduo transportado

Através da amostragem de sangue dos indivíduos, no início e no fim do transporte, é possível aferir um possível impacto do transporte nos indivíduos, através do aumento, ou não, da concentração de cortisol existente no plasma destes indivíduos.

Na figura 13, comparam-se as concentrações iniciais e finais de cortisol, de cada indivíduo transportado, em função do respectivo peso. Seria de esperar uma concentração final de cortisol superior à inicial, no entanto isso apenas se verifica em 2 dos 9 indivíduos monitorizados.

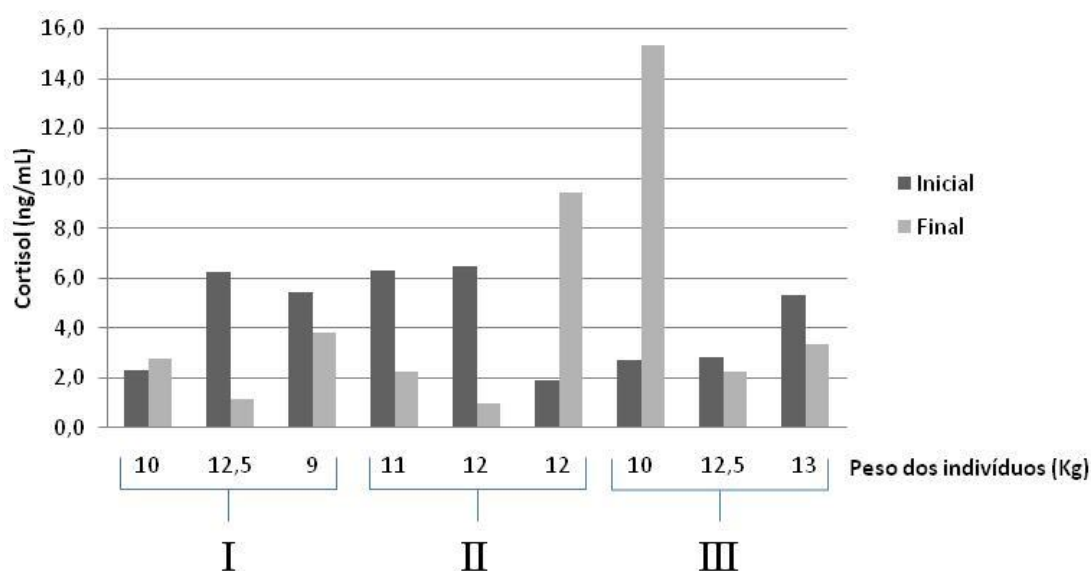


Figura 13: Concentração de cortisol (mg/mL), inicial e final, de cada indivíduo, tendo em conta o seu peso (Kg) e o respectivo tanque (I, II ou III) em que foram transportados.

Para verificar se houve realmente um impacto do transporte na concentração de cortisol no plasma dos indivíduos, procedeu-se a uma análise estatística aos dados obtidos de cortisol, inicial e final. O objectivo é saber se a média do cortisol, antes do transporte, é menor à média do cortisol depois do transporte. Se houve um impacto do transporte nos indivíduos, em média estes terão uma concentração final de cortisol superior à inicial.

Para isso, compararam-se as médias de duas distribuições normais, assumindo que se trata da mesma população, em dois momentos distintos – antes e após um transporte de peixe vivo. Efectuou-se um *teste t* de diferenças entre médias populacionais, para dados pareados, numa mesma população, em diferentes momentos.

Como o n da população é inferior a 30, a variável de distribuição assume-se como: t_{n-1} , com um nível de significância $\alpha=0,01$. Após a definição da hipótese nula (H_0 : transporte sem influência) e como $n=9$, consultando a tabela *standard* deste tipo de teste, obteve-se um valor $t=2,90$ (Tanis, 1987). A hipótese nula será rejeitada se o ρ *value* for superior a 2,90. O resultado do teste t (ρ *value*=0,459) vem de acordo com os dados representados na figura 13, uma vez que a H_0 é aceite. Ou seja, não se verificou um impacto estatisticamente significativo, no aumento do cortisol do plasma dos indivíduos, após o transporte.

3.2.Simulação de transporte de cavalas (*Scomber japonicus*)

Esta simulação serviu não só como preparação para o transporte, como também para explorar o comportamento do cortisol e da amónia, na presença/ausência de AmQuel[®]. O tanque A (com tratamento) seguiu a metodologia *standard*, controlando-se a amónia com AmQuel[®]. No tanque B (sem tratamento), não se utilizou qualquer controlador de amónia ou pH. Como era esperado, a concentração de amónia final no tanque B (2,5mg/L) foi muito superior à registada em A (0,11mg/L), sendo 10 vezes superior a 0,25mg/L, concentração considerada limite para adição de AmQuel[®] (Figura 14).

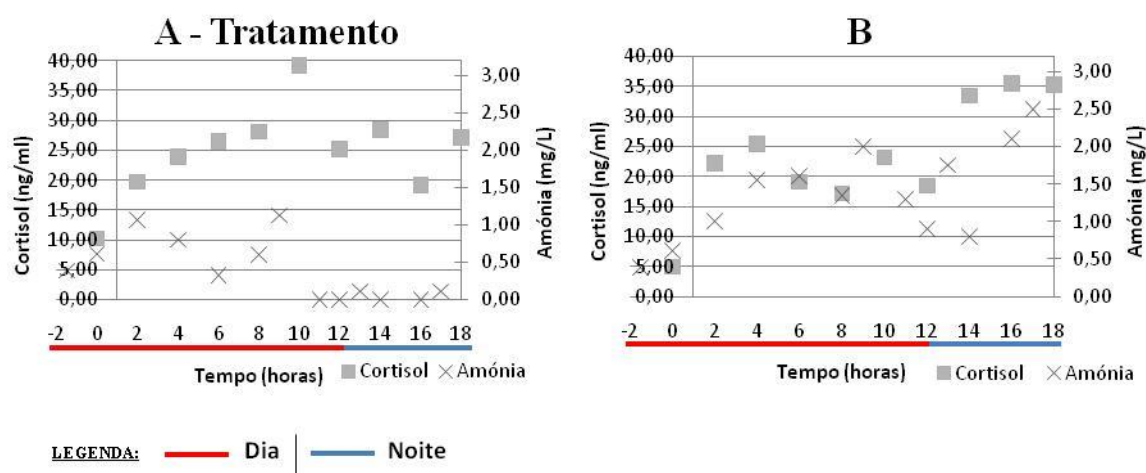


Figura 14: Concentração de cortisol (ng/mL) e amónia (mg/L) em dois tanques, com (A) e sem (B) tratamento (*cocktail* Amquel[®], bicarbonato e carbonato: 15ppm, 15ppm e 7,5ppm, respectivamente. *Cocktail* adicionado às 0h, 4h, 5h, 7h e 10h).

Na figura 15 está representada uma perspectiva individual da evolução da concentração de cortisol (ng/mL) e amónia (mg/L) comparativamente entre o tanque A (tratamento) e B (sem tratamento).

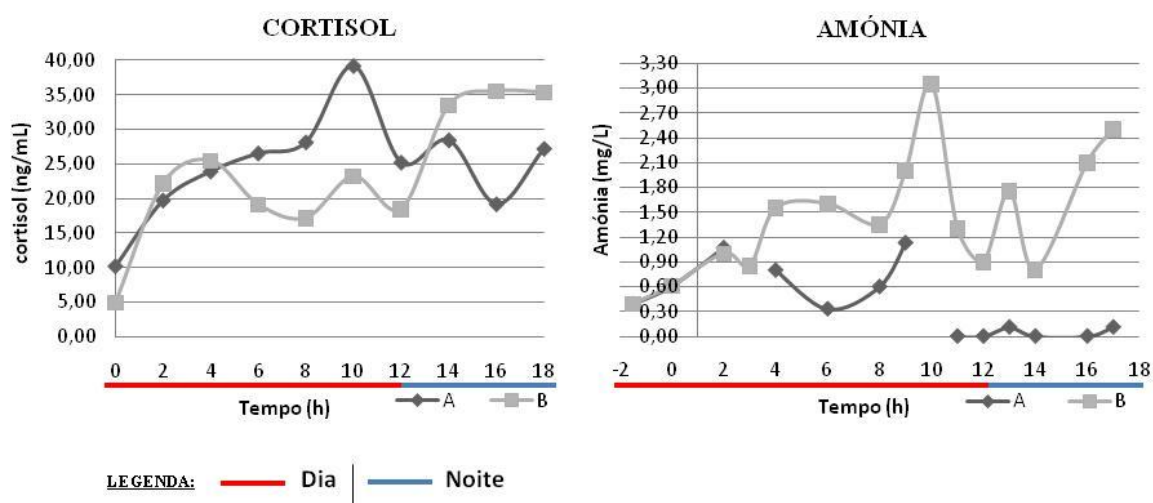


Figura 15: Concentrações de cortisol e amónia, ao longo de 18h de simulação, comparadas directamente entre o tanque A (com tratamento) e B (sem tratamento).

3.3.Diferentes concentrações iniciais de amónia vs 5 cocktails AmQuel

Esta primeira experiência a ser efectuada reflecte o comportamento do AmQuel[®], quando adicionado a água contaminada com amónia. Para uma concentração de amónia inicial de 2,5 mg/L, foram adicionados 5 *cocktails* de AmQuel[®] em 5 tanques distintos, registando-se as concentrações de amónia ao longo de 60 minutos. A concentração de amónia diminuiu significativamente nos primeiros minutos, mantendo um comportamento estável após 15min., para as 5 concentrações de amónia. No entanto, apenas o *cocktail* A e B garantem uma concentração final de amónia inferior a 0,25mg/L (Figura 16).

A figura 17 é semelhante à anterior, experimentando-se os mesmos 5 *cocktails* de AmQuel[®]. No entanto as concentrações iniciais de amónia passam a ser 0,5mg/L (**a**) e 1,7mg/L (**b**), observando-se a sua evolução ao longo de 15min., uma vez que a experiência anterior mostrou um comportamento constante após este tempo.

No gráfico 17**a**), para uma concentração inicial de amónia de 0,5mg/L, todos os *cocktails* de AmQuel[®] registam concentrações finais de amónia inferiores a 0,25mg/L. Por outro lado, para uma concentração inicial de amónia de 1,7mg/L (figura 17**b**), apenas os *cocktails* A e B garantem uma concentração final de amónia inferior a 0,25mg/L.

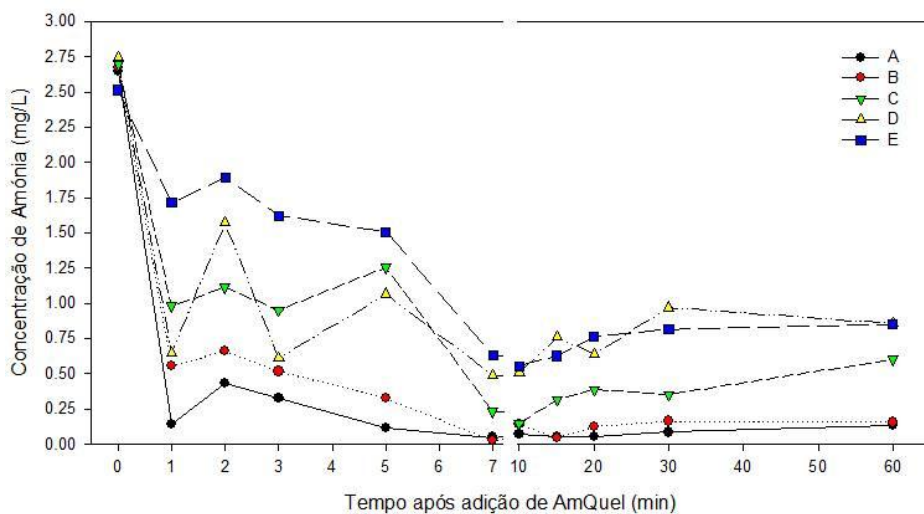


Figura 16: Comportamento de 5 *cocktails* de AmQuel® (A, B, C, D e E), quando adicionados a água com uma concentração inicial de amônia de 2,5mg/L, ao longo de 60 min., após a adição de AmQuel®.

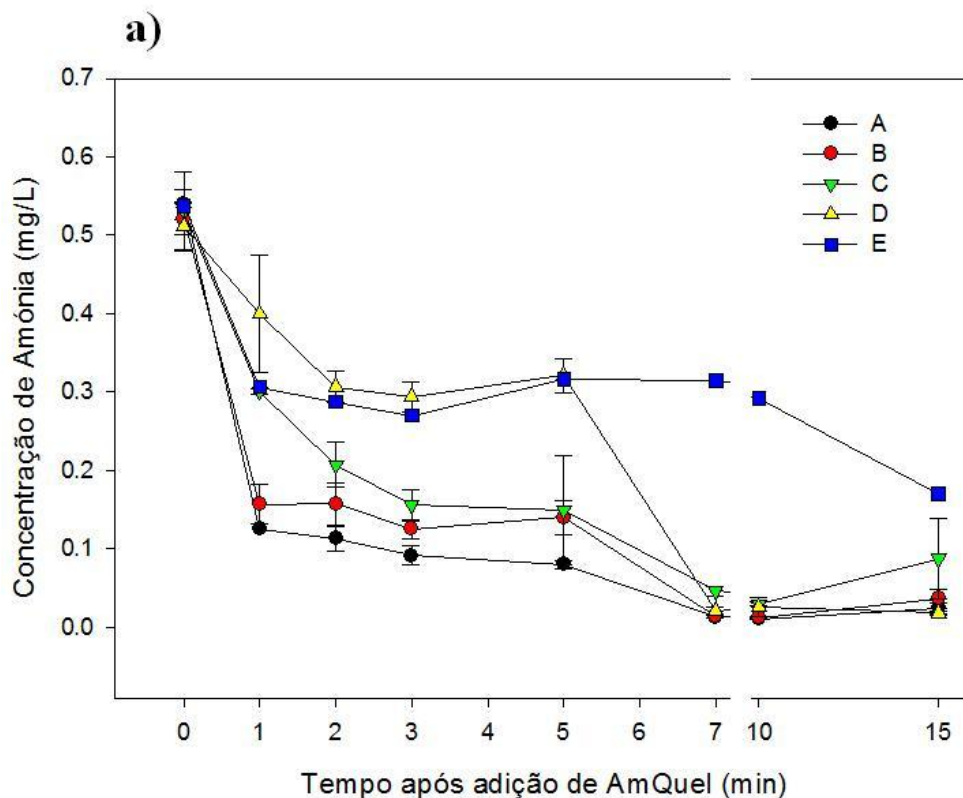


Figura 17a): Comportamento de 5 *cocktails* AmQuel® (A, B, C, D e E), quando adicionados a água com concentração inicial de amônia de 0.5 mg/L.

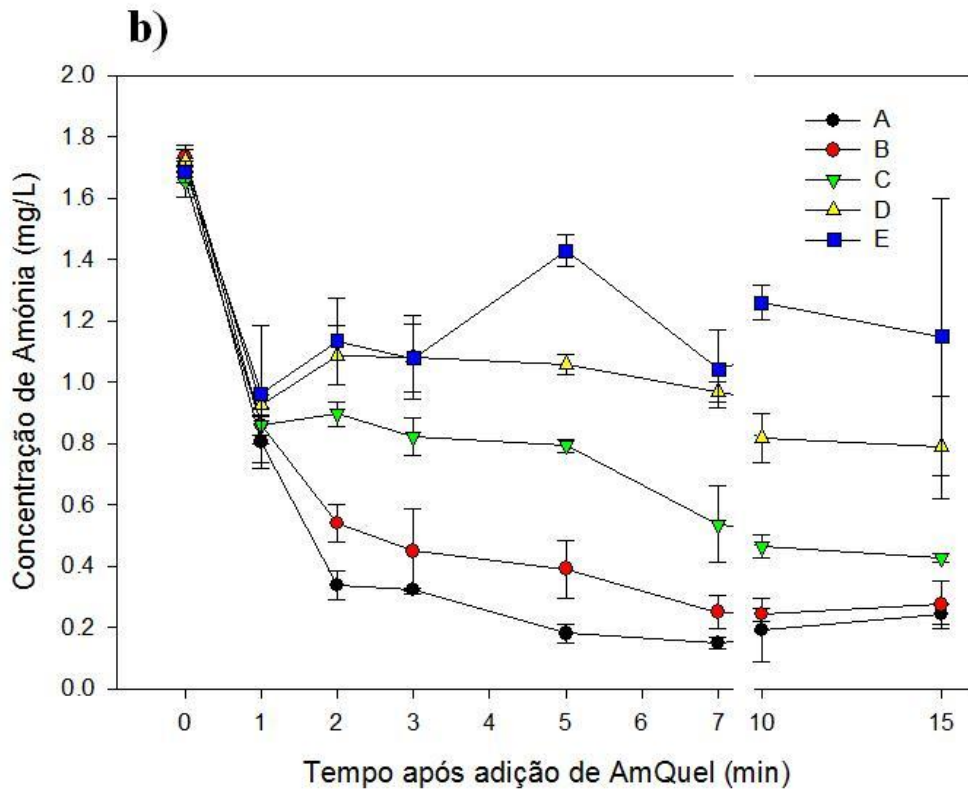


Figura 17b): Comportamento de 5 *cocktails* AmQuel[®] (A, B, C, D e E), quando adicionados a água com concentração inicial de amónia de 1.7 mg/L.

Após se verificarem alguns problemas de homogeneização, resultante da forma e volume do tanque utilizado, optou-se por replicar as experiências anteriores, desta vez em laboratório, em tanques com base redonda em detrimento de tanques com base quadrangular. Assim, a figura 18 representa 3 *cocktails* de AmQuel[®] (B, C e E) quando adicionados a água com diferente concentração inicial de amónia.

Foram testadas 5 concentrações iniciais de amónia (0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.5) (mg/L) ao longo de 15min. após adição de AmQuel[®].

Na tabela IV, está representada a equação da recta ($Y = Y_0 + ae^{-bx}$) com três parâmetros (Y_0 , a e b) e respectivo R^2 . Esta tabela corresponde ao gráfico 18, onde o Y_0 foi ajustado consoante a concentração inicial obtida, nem sempre exacta relativamente à definida na teoria.

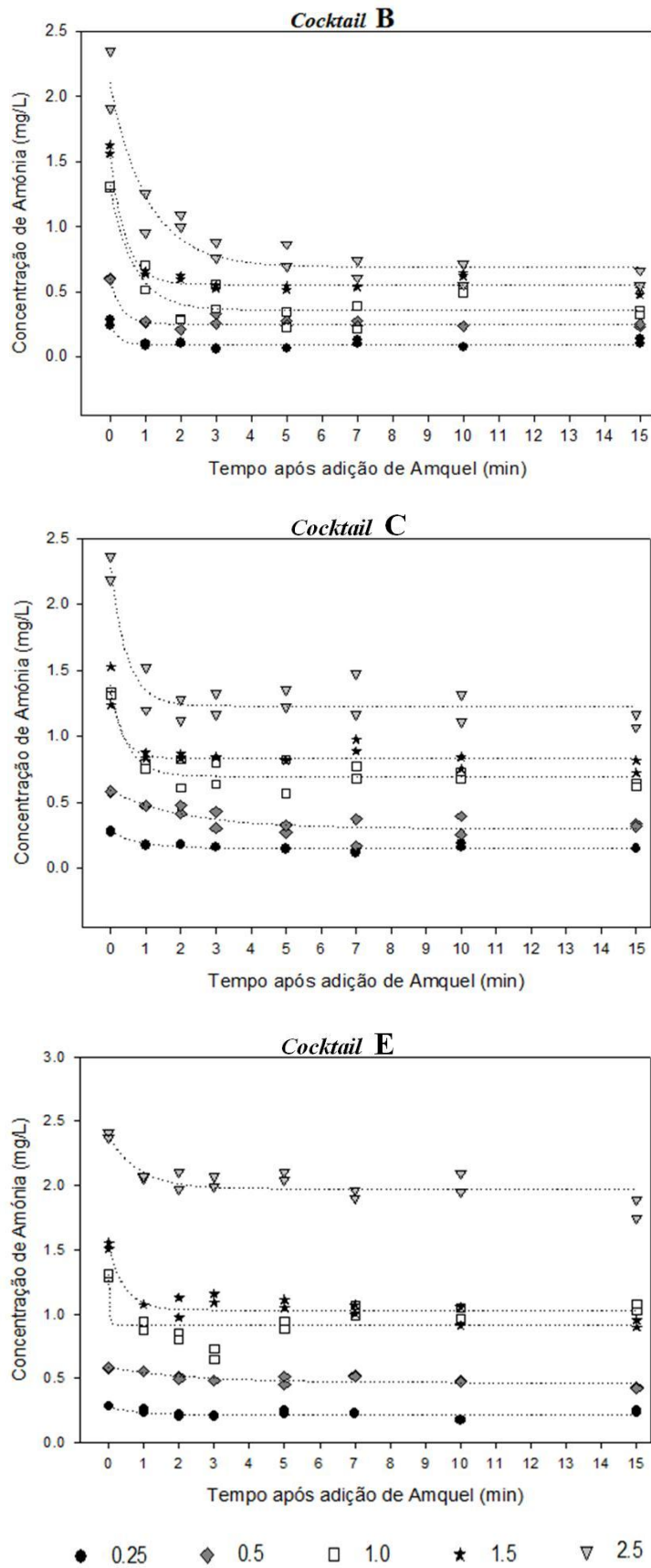


Figura 18: 5 concentrações iniciais de amônia (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5) (mg/L), controladas por 3 cocktails de AmQuel®: B (15/15/10 ppm), C (10/10/5 ppm) e E (5/5/2.5 ppm).

Tabela IV: Para cada concentração inicial de amónia e respectivo *cocktail* de AmQuel[®], estão representados os três parâmetros da equação da recta ($Y = Y_0 + ae^{-bx}$) e respectivo R^2 . Em todos os casos foi verificada uma diferença significativa $p < 0.05$ entre tratamentos.

AMÓNIA INICIAL (mg/L)	AMQUEL	R^2	Y_0	a	b
0.25	B	0.840	9.04E-2	0.17	3.81
	C	0.853	0.15	0.13	1.23
	E	0.495	0.22	6.58E-2	1.17
0.5	B	0.946	0.25	0.35	3.20
	C	0.742	0.30	0.29	0.48
	E	0.687	0.47	0.12	0.41
1.0	B	0.899	0.36	0.95	1.51
	C	0.832	0.67	0.65	30.5
	E	0.548	0.92	0.38	38.7
1.5	B	0.984	0.56	1.04	2.33
	C	0.856	0.83	0.55	3.16
	E	0.840	1.03	0.50	2.24
2.5	B	0.916	0.69	1.41	0.94
	C	0.891	1.23	1.05	2.17
	E	0.701	1.97	0.41	1.18

3.4. Simulação de uma taxa de excreção de amónia (2mg/h) vs 5 cocktails AmQuel[®]

Para recriar uma situação onde exista uma entrada contínua de amónia no tanque, simulou-se uma taxa de excreção de amónia, com o intuito de explorar o comportamento do AmQuel[®] em situações semelhantes a um transporte. Num transporte os indivíduos transportados vão excretando amónia ao longo do tempo, criando um efeito cumulativo no tanque, particularmente quando não se efectuam mudanças de água.

Com o intuito de se observar o comportamento de 5 *cocktails* de AmQuel[®] (A, B, C, D e N[nulo]) na presença de uma taxa de excreção (2mg/h) contínua e cumulativa, durante 10h. Com excepção da concentração mais baixa de AmQuel[®] (D) – e do nulo, ao qual não se adicionou AmQuel[®], para servir de controlo – os restantes *cocktails* (A, B e C) mantiveram a concentração de amónia abaixo de 0,25mg/L, ao longo das 10h de experiência (Figura 19).

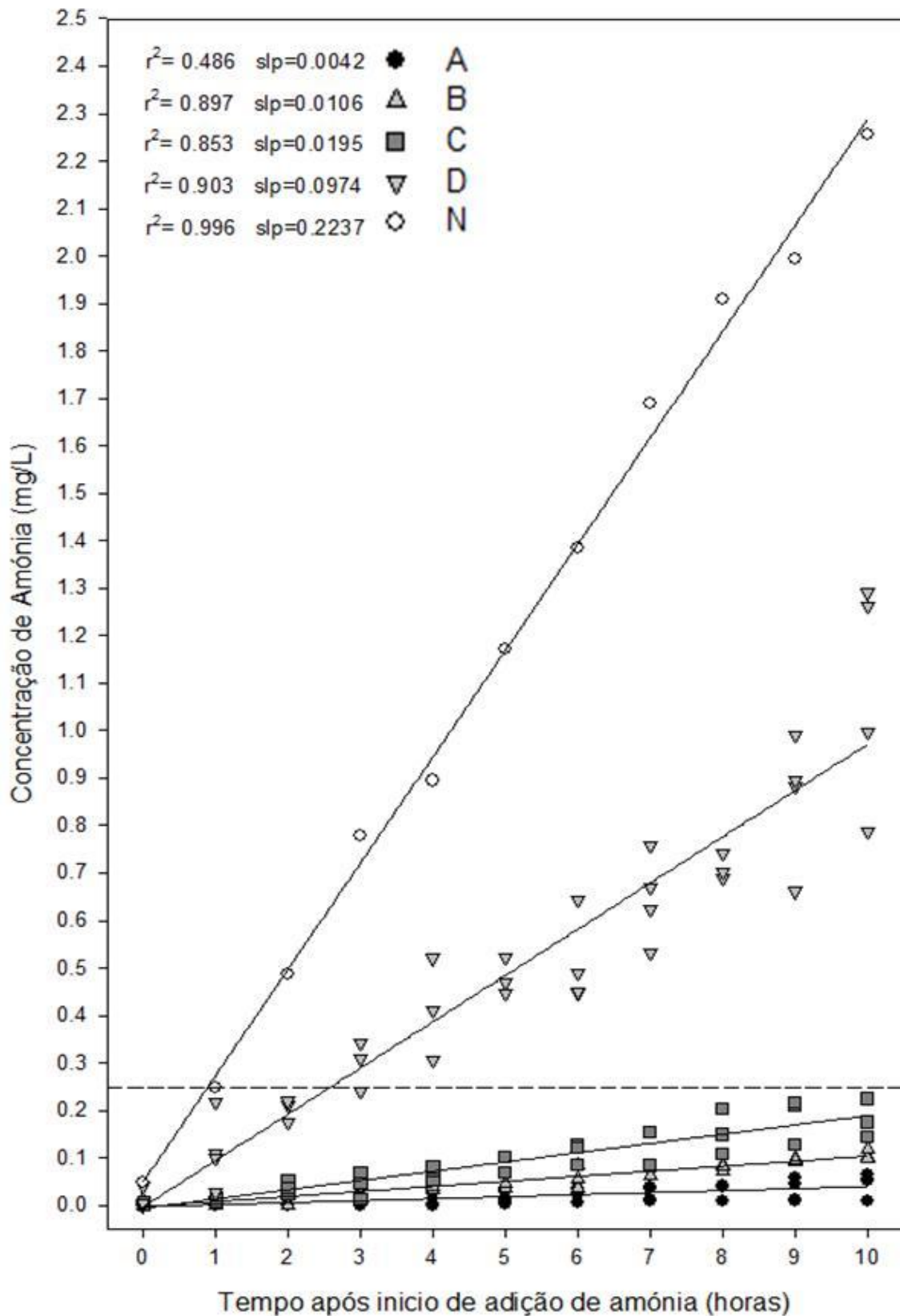


Figura 19: diferentes *cocktails* de AmQuel® (A, B, C, D e Nulo), quando expostos a uma taxa de excreção (2mg/h) contínua, ao longo de 10h. Tanto os R^2 , como os respectivos declives das rectas validam esta experiência.

3.5.Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel®

Cada espécie apresenta diferentes taxas de excreção, existindo variação dentro de cada espécie, consoante o seu peso e tamanho ou mesmo a situação a que é exposta (ex: existência de stress, adaptação a novo ambiente, etc.). Esta experiência foi efectuada com o propósito de testar dois *cocktails* de AmQuel®, simulando diferentes taxas de excreção, como consequência da enorme variabilidade existente entre espécies e situações a que os indivíduos são expostos.

Assim sendo, foram diferentes taxas de excreção de amónia (0.25, 1.0, 2.5 e 5.0) (mg/h) para um *cocktail* de AmQuel® para cada tanque, num total de 2 *cocktails* comparados entre si (B e C), ao longo de 8h (Figura 20). As equações das rectas foram escolhidas consoante o melhor ajuste, alternando-se entre equação linear ($y=a+bx$) e exponencial ($Y= Y_0 + ae^{-bx}$) com três parâmetros (Y_0 , a e b), de acordo com o R^2 mais adequado para cada curva (tabela V). Ainda na figura 20, para a taxa de excreção de amónia de 1mg/h, para o *cocktail* B, foram feitos dois ajustes, uma vez que ambos explicam similarmente o comportamento da recta, de acordo com o seu R^2 .

Invertendo-se os dados da figura anterior, obtém-se uma comparação entre as diferentes taxas de excreção de amónia, para cada *cocktail* de AmQuel® (B e C), representadas na figura 21.

Esta perspectiva gráfica permite uma melhor comparação da eficácia de cada *cocktail*, em função do tempo, para cada taxa de excreção. Os níveis de amónia registados com o *cocktail* C são superiores relativamente a B, como era esperado. O intervalo de tempo que a concentração de amónia, no tanque, demora a ultrapassar os 0,25mg/L, é maior em B (4h), relativamente a C (2h). No entanto, em ambos os *cocktails*, para taxas de excreção até 1mg/h, após 8h de duração, a concentração de amónia no tanque não ultrapassa os 0.25mg/L.

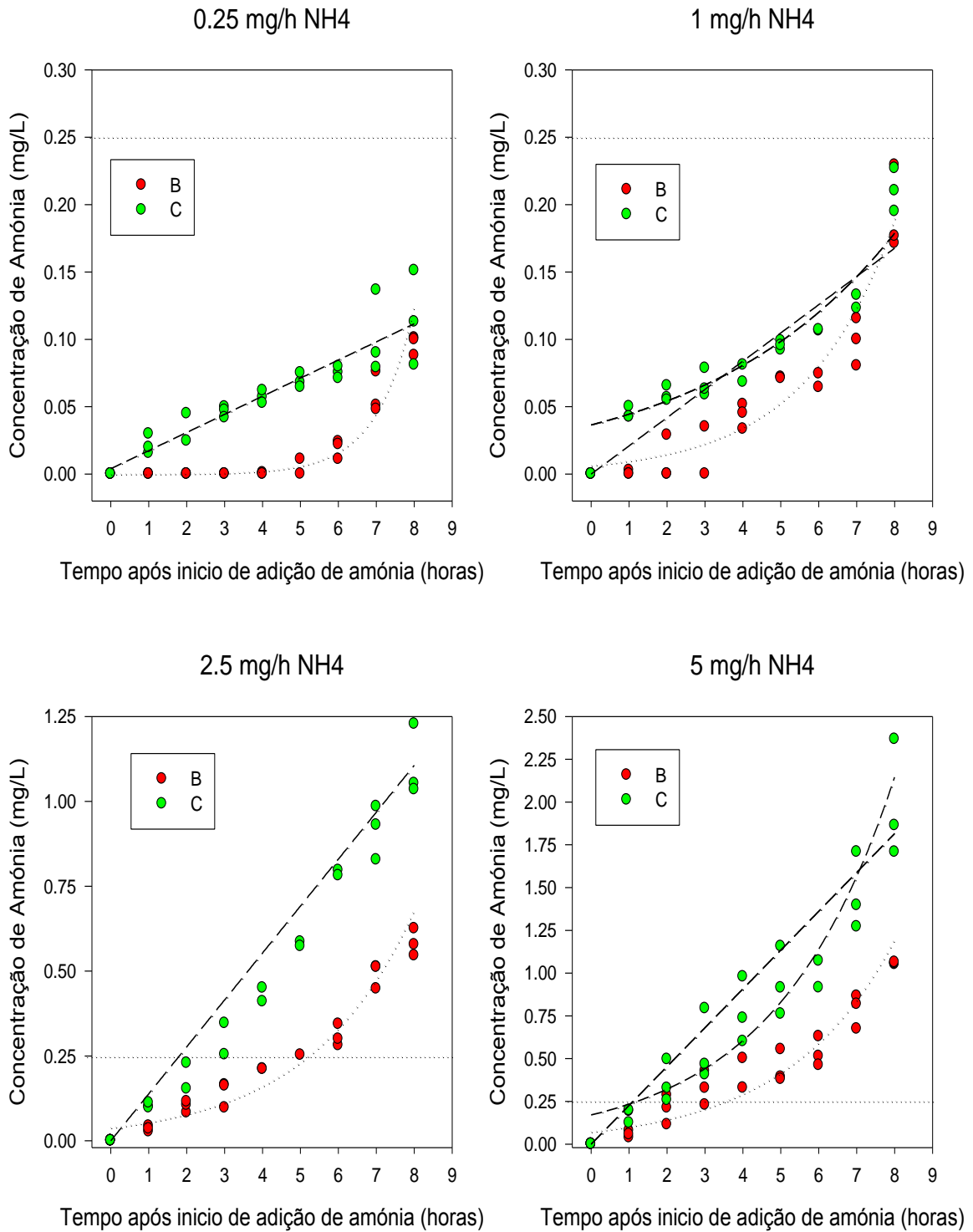


Figura 20: Comparação entre dois cocktails de AmQuel® (B e C), quando expostos a diferentes taxas de excreção de amônia (0.25, 1.0, 2.5 e 5.0) (mg/h), com efeito cumulativo ao longo de 8h de experiência.

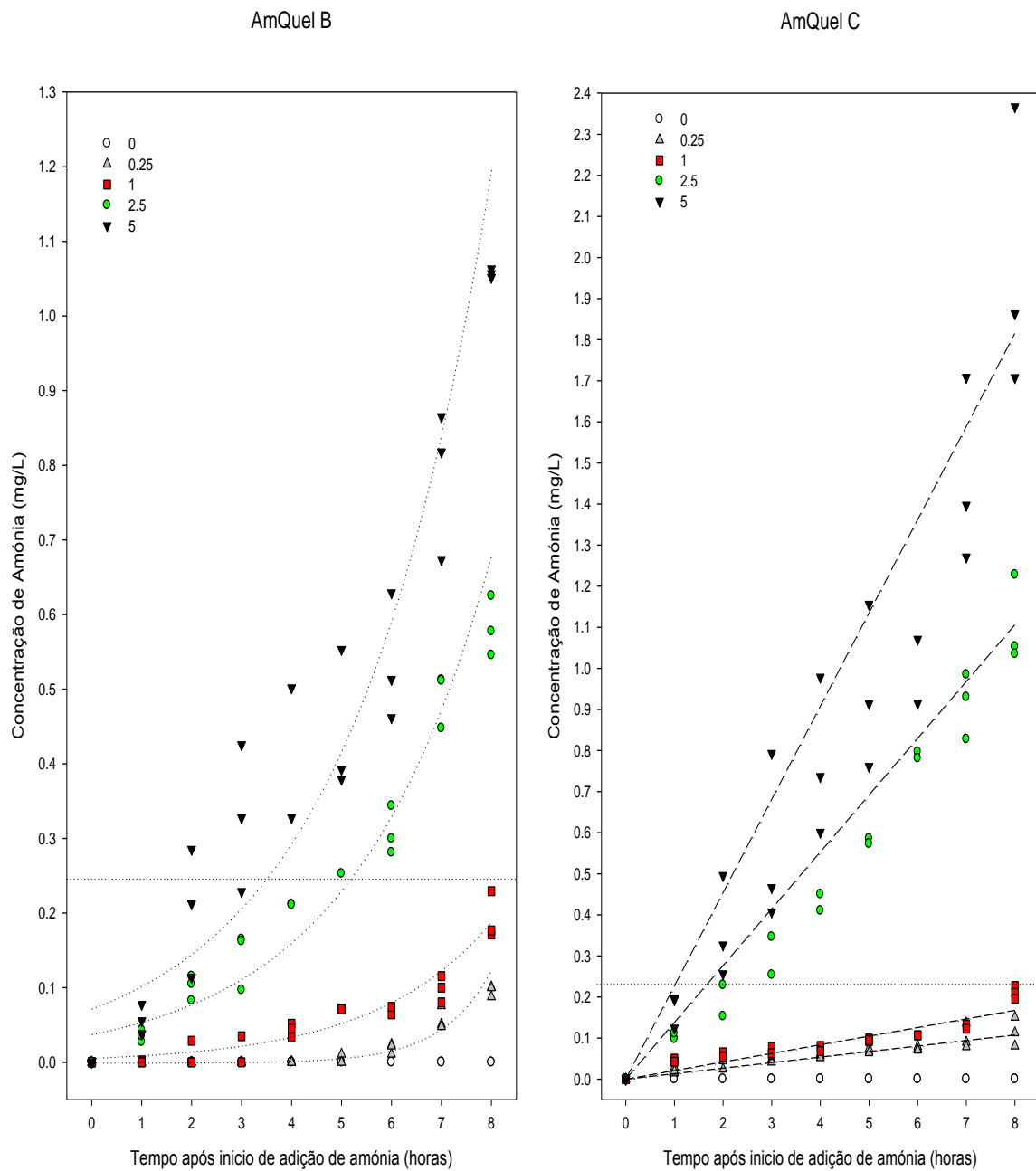


Figura 21: Diferentes taxas de excreção de amônia (0.25, 1.0, 2.5 e 5.0) (mg/h), representadas através de equação exponencial (B) e linear (C), de acordo com o melhor ajuste, verificado através do R^2 .

Tabela V: Recta linear (C) e exponencial com três parâmetros (B), para 5 taxas de excreção de amónia diferentes, consoante o R^2 estatisticamente mais correcto.

	0,25		1		2,5		5	
	Exponencial	Linear	Exponencial	Linear	Exponencial	Linear	Exponencial	Linear
B								
R^2	0,868	0,286	0,919	0,636	0,934	0,895	0,898	0,879
Y_0	3,08E-25	3,13E-25	2,59E-20	4,00E-4	1,4E-20	6,71E-24	1,73E-24	8,55E-24
a	3,68E-5	1,02E-2	6,4E-3	2,09E-2	3,81E-2	7,10E-2	7,24E-2	8,53E-24
b	2,76	-	1,53	-	1,43	-	1,42	-
R^2	0,817	0,846	0,888	0,636	0,917	0,953	0,896	0,740
Y_0	1,04E-20	6,22E-25	2,09E-30	4,00E-4	3,4E-24	8,75E-24	1,2E-19	1,48E-23
a	2,05E-2	1,35E-2	3,65E-2	2,09E-2	9,37E-2	1,38E-1	1,7E-1	2,27E-1
b	1,25	-	1,22	-	1,39	-	1,37	-
C								

3.6. Concentração inicial amónia (0,25mg/L) + Simulação de diferentes taxas de excreção de amónia vs 1 cocktail AmQuel®

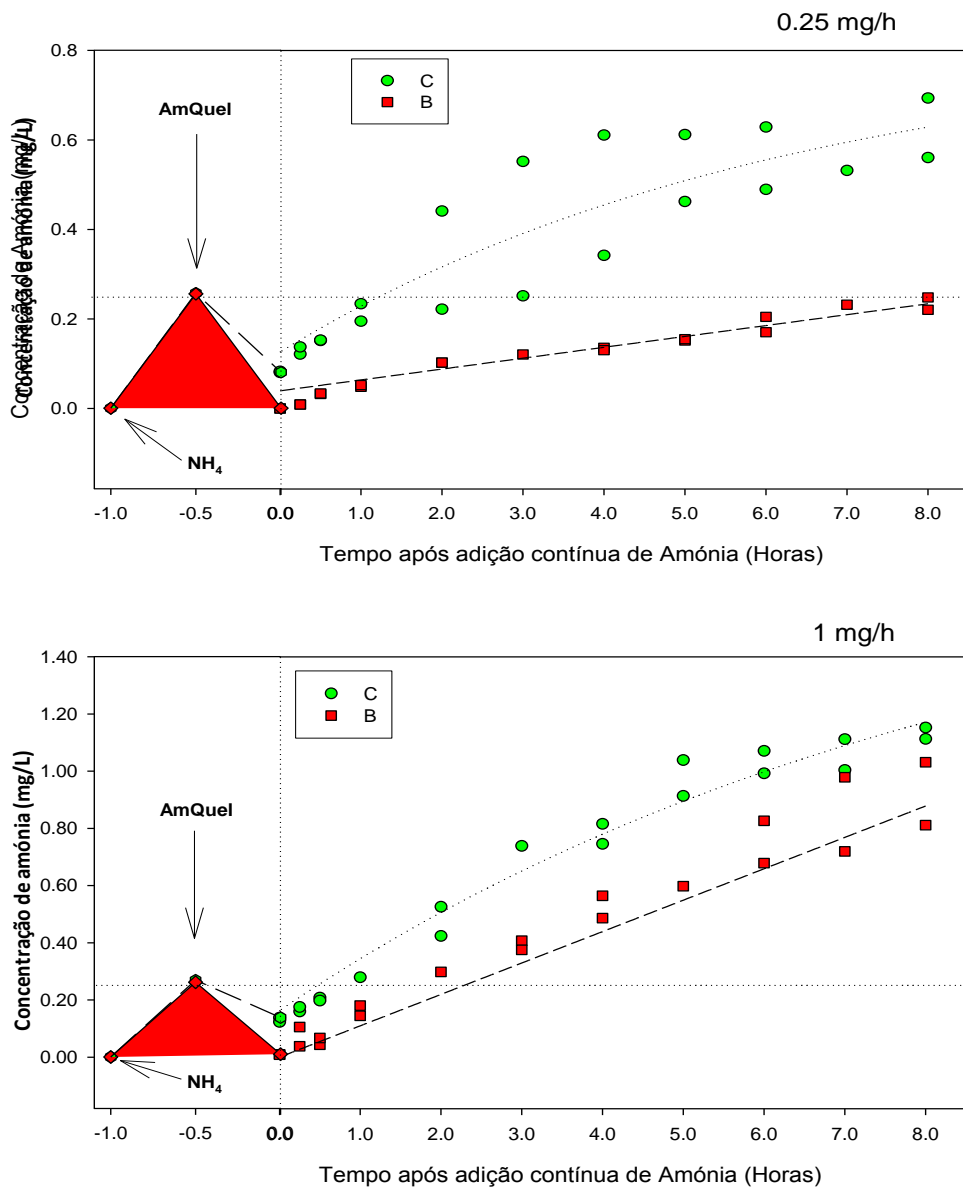
Para testar a durabilidade do AmQuel®, não só em água com uma concentração inicial de amónia ou com uma taxa de excreção contínua de amónia, este ensaio testa a eficácia de cada *cocktail* em águas contaminadas com amónia e com efeito cumulativo desta. Este ensaio simula, por exemplo, uma situação de transporte de peixe vivo, em que a água utilizada no transporte não se encontra desprovida de amónia, como acontece quando se utiliza a água do tanque de espera, onde se encontram os indivíduos antes do transporte.

A figura 22 representa o comportamento do AmQuel® (B e C), quando adicionado a água com uma concentração inicial de amónia (0.25mg/L) e taxa de excreção contínua de amónia (0.25, 1.0, 2.5 e 5.0) (mg/h). Para a maior taxa de excreção (5mg/h), nenhum dos cocktails assegura uma concentração de amónia no tanque inferior a 0,25mg/L, atingindo concentrações superiores após a primeira hora. Apenas para a menor taxa de excreção (0.25mg/h), conjugada com o *cocktail* B, a concentração de amónia é inferior ao limite considerado, durante 6h. Para esta mesma taxa, com o

cocktail C, a concentração de amónia existente no tanque ultrapassa o limite após a primeira hora.

Invertendo-se os dados da figura anterior, obtém-se uma comparação entre as diferentes taxas de excreção de amónia, para cada *cocktail* de AmQuel® (B e C), quando adicionados a água com concentração de amónia inicial de 0,25mg/L, ao longo de 8h, representadas na figura 23.

Esta perspectiva invertida da figura 23, permite uma consulta rápida do tempo que a concentração de amónia, em cada tanque, demora a atingir 0,25mg/L, após a acção quelante do AmQuel®, sobre a amónia inicial, numa situação cumulativa de amónia. As diferenças entre os dois *cocktails* experimentados tornam-se mais evidentes, havendo uma tendência de aproximação entre as curvas de B e C, proporcional às taxas de excreção de amónia superiores.



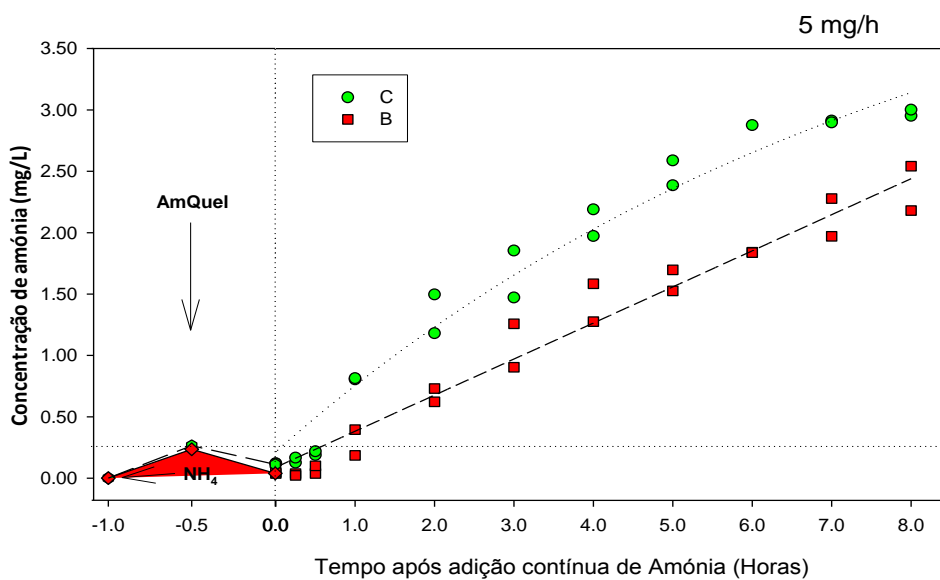
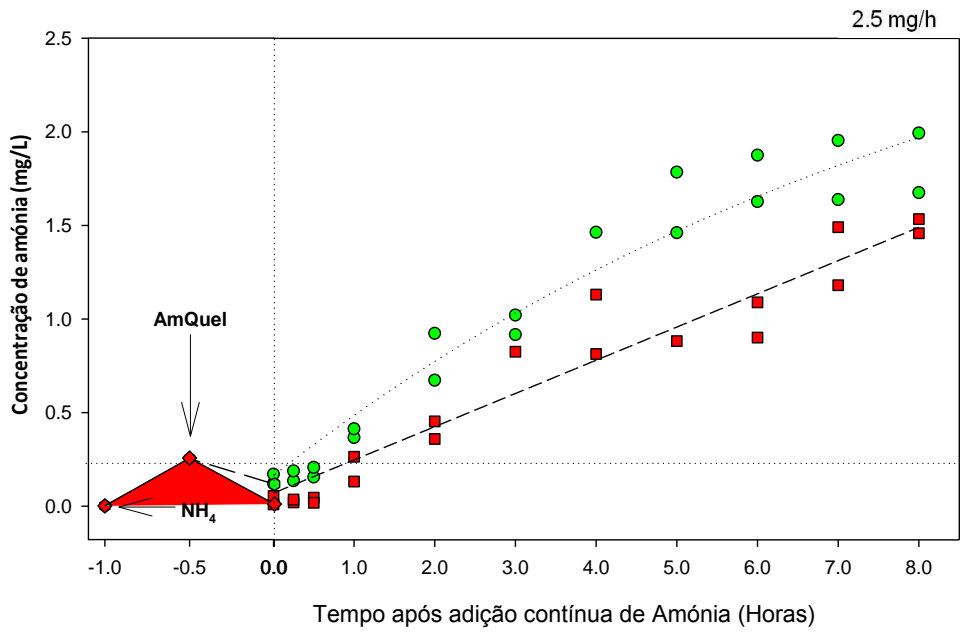


Figura 22: Comportamento de 2 cocktails de AmQuel® (B ou C) quando adicionado a água com 0,25mg/L de amônia inicial e exposto a diferentes taxas de excreção contínua de amônia (0.25, 1.0, 2.5 e 5.0) (mg/h), durante 8h. No ponto 0, iniciou-se o bombeamento contínuo de amônia.

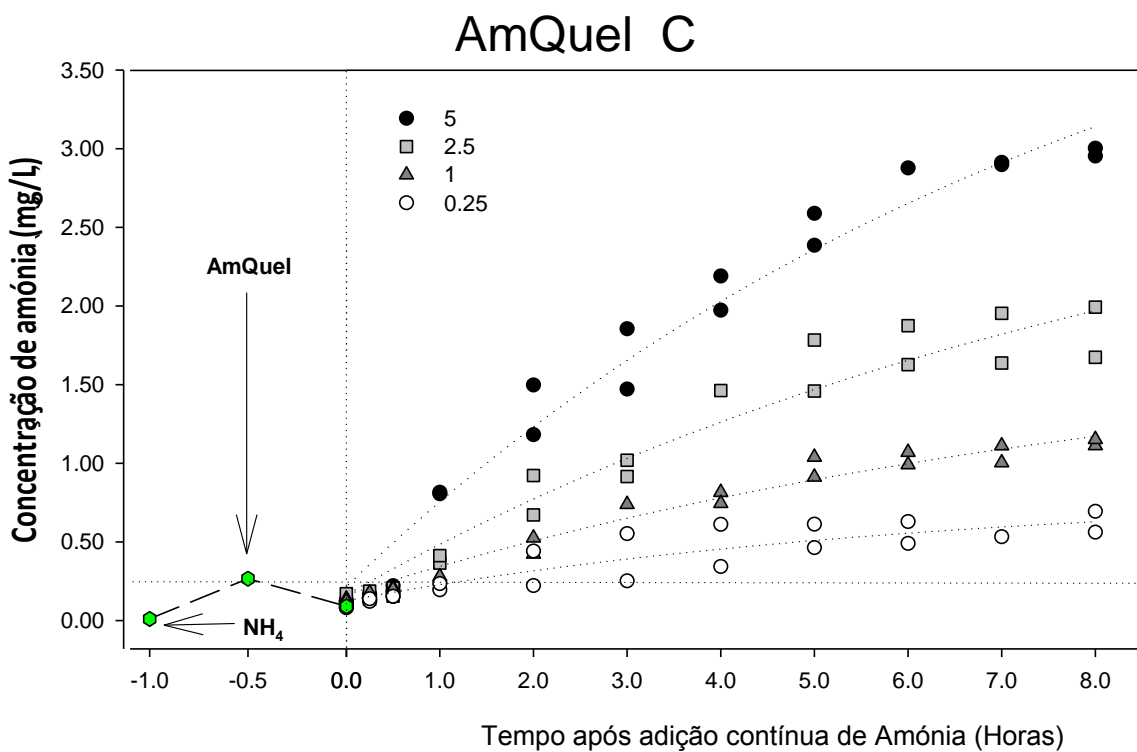
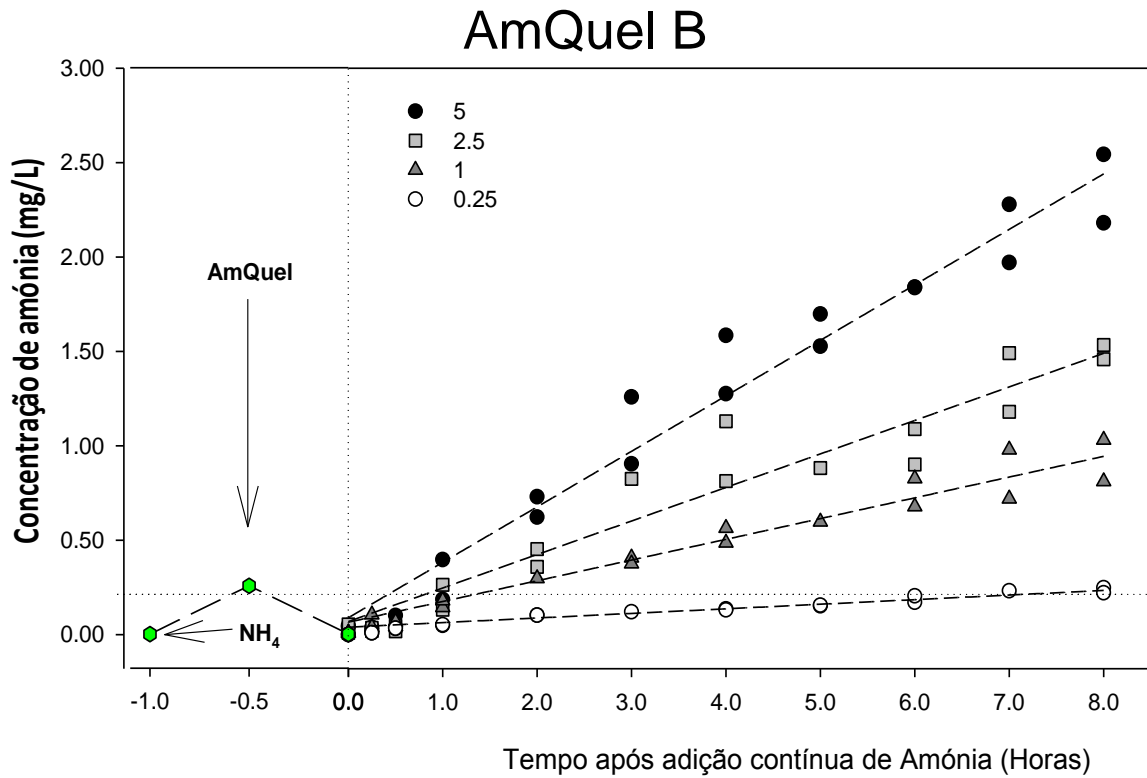


Figura 23: Adição de AmQuel[®] (B e C) a uma água com concentração de amónia inicial de 0,25mg/L, exposta a diferentes taxas de excreção contínua de amónia (0,25, 1,0, 2,5 e 5,0) (mg/h), ao longo de 8h. A excreção de amónia iniciou-se na hora 0.

4.DISSCUSSÃO

4.1.Parte I: trabalho de campo

O transporte de peixes vivos é uma vasta área que engloba diversas variáveis e especialidades, desde o design de todo o material de transporte, aos parâmetros químicos da água e as diversas reacções biológicas de cada indivíduo transportado (Berka, 1986).

O manejo e o transporte aumentam o stress e, por consequência, os níveis de cortisol (Pickering *et al.*, 1987; Barton & Iwama, 1991; Jentoft *et al.*, 2005; Pasnik *et al.*, 2007; Branson, 2008) dos indivíduos. Como se pode ver na figura 12, na água de cada tanque, tanto na simulação, como no transporte, a concentração de cortisol aumentou gradualmente ao longo de 14h. O máximo de cortisol foi obtido na última amostragem, ao fim de 18h, como resultado do manejo e stress acumulado ao longo da simulação ou transporte efectivo, uma vez que a etapa de descarga é aquela que incute maior stress, devido ao efeito cumulativo das etapas anteriores (Branson, 2008; Pickering *et al.*, 1987). Em parte, este resultado é corroborado pela taxa de cortisol, apresentada na coluna da direita da figura 12. Seria de esperar uma concentração crescente, no entanto, em alguns intervalos (S₂, S₁₀, S₁₂, I₁₄, II₁₄ e III₈) tal não se sucedeu. Isto poder-se-á dever ao facto de, após uma etapa stressante na mudança dos tanques para o transporte, os indivíduos se tenham adaptado provisoriamente à situação de transporte, acabando por estabilizar os seus níveis de cortisol.

No transporte, as concentrações finais de cortisol obtidas na água de cada tanque foram, respectivamente, tanque I (98,82 ng/mL), tanque II (82,42 ng/mL) e tanque III (59,27 ng/mL). Uma vez que todos os tanques tinham o mesmo número de indivíduos, possuindo as mesmas características (mesma espécie, peso e comprimento aproximado e indivíduos do mesmo sexo), este aumento poderá dever-se a outros factores com influência directa no transporte. O facto de se adicionar AmQuel[®] aos tanques, sempre que a concentração de amónia atinge níveis mais elevados, não permite estabelecer uma comparação/relação entre as concentrações de cortisol e de amónia no transporte. A maior concentração de cortisol nos tanques I e II, poderá possivelmente dever-se à posição em que se encontravam estes tanques, relativamente ao veículo de transporte. Ou seja, os tanques I e II encontravam-se posicionados por cima das rodas do transporte rodoviário utilizado, enquanto o tanque III já se encontrava fora dessa área. Pesquisas efectuadas no transporte rodoviário de animais terrestres, demonstraram que a condução

tem um impacto directo no stress e bem-estar dos animais transportados (Cockram *et al.*, 1997; Branson, 2008). Num veículo rodoviário, a turbulência resultante do movimento das rodas poderá ter sido suficiente para provocar maior instabilidade nos tanques colocados nessa zona, do que nos tanques onde não existe movimento “activo” imediatamente abaixo destes, o que poderia explicar as concentrações mais elevadas, verificadas nos dois primeiros tanques.

A concentração final de cortisol obtida na simulação (9.5 ng/mL) foi inferior à registada nos três tanques, no final do transporte efectivo. Comparativamente, foi 10.4 vezes inferior à concentração final de cortisol obtida no tanque I; 8.7 vezes relativamente ao tanque II e 6.2 vezes em relação ao tanque III. Esta diferença nas concentrações finais de cortisol, entre transporte e simulação poderá dever-se a vários factores. Em primeiro lugar, ainda que a massa total de cada tanque não varie muito, entre simulação (30 Kg) e transporte efectivo (I – 34 Kg, II – 37 Kg e III – 31 Kg), o número de indivíduos em cada tanque poderá ser a razão das diferenças de concentração de cortisol, entre simulação e transporte. Na simulação apenas se utilizaram dois indivíduos, enquanto no transporte efectivo, cada tanque transportou três indivíduos. Mais indivíduos resultam em maiores taxas de excreção de amónia (Branson, 2008), que juntamente com a situação instável do transporte irá aumentar a propensão de haver stress ou elevar os níveis existentes de stress, resultando num aumento da concentração de cortisol na água do tanque.

Outra razão para o desnível da concentração de cortisol entre transporte e simulação poderá resultar do tipo de intervenção sobre os indivíduos. Na simulação, o procedimento incluiu apenas dois indivíduos, que foram rapidamente capturados do tanque principal e colocados no tanque de ensaio, não sendo movidos até final da simulação. No transporte efectivo, houve um manejo superior a 1h, para que todos os 32 indivíduos (incluindo os 9 monitorizados) fossem colocados nos respectivos tanques, o que segundo Pickering *et al.* (1987) irá induzir stress e consequente aumento dos níveis de cortisol. Ainda relativamente ao manejo extra efectuado antes do transporte, os indivíduos monitorizados foram pesados, medidos e marcados, antes de serem introduzidos nos respectivos tanques, enquanto na simulação não houve qualquer manejo extra, prévio à colocação dos indivíduos no tanque. Aliado a estas situações atrás descritas, o transporte em si e consequente instabilidade incutida nos tanques de transporte – inexistente no tanque da simulação – é passível de provocar stress nos indivíduos transportados, resultando numa maior concentração de cortisol.

Segundo Páscoa *et al.* (2010), o cortisol aumenta a excreção de amónia nos vertebrados, incluindo os peixes. Devido à adição de AmQuel[®] e consequente efeito quelante, não é possível inferir a existência de uma ligação entre cortisol e amónia, quer na simulação como no transporte efectivo de corvinas (figura 12). Todos os tanques foram tratados inicialmente com um *cocktail* de AmQuel[®], bicarbonato e carbonato de 30/80/40 ppm, respectivamente. No entanto, após 4h de transporte, os tanques (I e II) com concentrações de cortisol mais elevadas, registaram também uma concentração de amónia superior (I – 0.35 mg/L e II – 0,23 mg/L), relativamente ao tanque III (0,09 mg/L). De notar ainda, que enquanto na simulação o *cocktail* 30/77/38,5ppm conseguiu controlar a amónia até final da simulação, no transporte foi necessária uma segunda adição do *cocktail* 30/80/40ppm, idêntico ao inicialmente adicionado, para manter os níveis de amónia abaixo de 0.25mg/L. Este facto não se deverá apenas ao número de indivíduos no tanque, mas também ao stress consequente do transporte.

Na figura 13, compararam-se as concentrações iniciais e finais de cortisol, de cada indivíduo transportado, em função do respectivo peso. Seria de esperar uma concentração final de cortisol superior à inicial, no entanto isso apenas se verifica em 2 dos 9 indivíduos monitorizados. Este facto poderá resultar das condições de carga/descarga, diferentes à partida e à chegada, onde a eficácia, celeridade e mecanização dos processos poderão ter um impacto nas amostras recolhidas. Ou seja, o simples facto de se retirar sangue aos indivíduos é um factor stressante, onde uma diferença significativa no tempo de recolha de sangue e na metodologia de amostragem efectuada (ex: indivíduos amostrados dentro ou fora de água), poderão ter impacto nos resultados finais. Se aliarmos o facto de as amostras iniciais e finais terem sido recolhidas por diferentes sujeitos, juntamente com os diferentes processos de carga/descarga, poderão explicar o desfasamento encontrado entre as amostras recolhidas do sangue e da água dos indivíduos. Comparando a taxa de cortisol (figura 12), com as concentrações de cortisol registadas (figura 13), existe uma clara contradição, associada às razões anteriormente descritas e ao possível erro associado a cada metodologia. Estas diferenças poderão ainda ser relacionadas com o facto de a excreção de cortisol para a água ser diferente do cortisol existente no plasma de cada indivíduo, ainda que um aumento na concentração de cortisol, como resposta a estímulos stressantes, deveria fazer-se sentir tanto no cortisol libertado para a água, como no existente no plasma do indivíduo (Martínez-Porchas *et al.*, 2009).

Ao contrário dos resultados referidos anteriormente, na simulação de cavalas (*Scomber japonicus*) representada na figura 14 e 15, o facto de o tanque B não ser tratado com nenhum *cocktail*, poderá permitir a comparação entre concentrações de amónia e cortisol e, possivelmente, avaliar a influência do AmQuel[®]. No tanque A, devido à adição de *cocktail* (15/15/7.5ppm) ao longo da simulação (0h, 4h, 5h, 7h e 10h), torna-se difícil inferir uma relação entre concentração de cortisol e amónia. No tanque B (sem tratamento) obtiveram-se alguns resultados intermédios (8h, 11h, 12h e 14h), que registaram concentrações de amónia abaixo do esperado, uma vez que o efeito cumulativo de amónia deveria ter sido evidente, ao contrário do que sucedeu nestas amostragens, onde a concentração de amónia foi inferior à tendência demonstrada nas restantes amostragens deste tanque. Estes resultados poderão reflectir o erro associado à metodologia de quantificação de amónia, no campo, possivelmente devido a uma contaminação dos tubos de leitura.

Ambas as concentrações, cortisol e amónia, apresentaram comportamentos semelhantes, com tendência para um aumento inicial até às primeiras 4h de simulação, seguido de um período de possível estabilização, entre as 4h e as 13h, verificando-se um aumento significativo em ambos os parâmetros, nas últimas 5h de simulação. Este aumento nas últimas horas estará associado ao efeito cumulativo dos produtos de excreção dos indivíduos, que se foram acumulando no tanque, reflectindo-se na concentração final de amónia registada (2.5 mg/L). Neste tanque (B), a percentagem de oxigénio dissolvido foi sempre superior a 100% (Anexo II), no entanto nas amostragens após 13h, 14h e 16h do início da simulação, registaram níveis de saturação de oxigénio de 85%, 65% e 95%, respectivamente, o que aliado às elevadas concentrações de amónia, poderá ter contribuído para o aumento da concentração de cortisol nas três últimas amostragens.

No tanque B, apesar de a concentração de cortisol ter aumentado significativamente nas últimas horas da simulação, verificou-se uma estabilização nas duas últimas amostragens. Este período coincidiu com o início do período nocturno. Estudos efectuados em indivíduos *Sparus aurata* verificaram a existência de diferentes ritmos na concentração de cortisol, durante os diferentes períodos do dia, associados principalmente ao alimento (López-Olmeda *et al.*, 2010). Uma vez que os indivíduos foram mantidos em jejum, estes ritmos terão tido influencia. Considerando que a estabilidade se registou após um aumento da concentração de cortisol, ocorrida no início do período nocturno, poderia estar relacionado com possíveis mudanças na temperatura.

No entanto, não se verificou uma variação significativa na temperatura durante os diferentes períodos do dia (Anexo II). Estudos efectuados em perca europeia (*Perca fluviatilis*), demonstraram que os indivíduos expostos repetidamente a um estímulo stressante apresentaram níveis de cortisol, no plasma, inferiores relativamente aos indivíduos expostos a um único estímulo stressante (Jentoft *et al.*, 2005). Esta possível estabilização poderá estar relacionada com uma possível adaptação momentânea dos indivíduos, após uma exposição contínua a elevadas concentrações de amónia.

Embora não se tenha registado nenhuma mortalidade após as 20h de simulação, o comportamento evidenciado nos indivíduos do tanque B foi diferente do registado nos indivíduos do tanque A. Nas últimas horas de simulação, coincidente com o aumento de cortisol e amónia, os indivíduos do tanque B revelaram um comportamento indicativo de stress (Branson, 2008). Neste tanque, após 20h de simulação e devido à deterioração da água do tanque, resultante dos produtos de excreção, os indivíduos começaram a evidenciar um comportamento alterado, com excitabilidade crescente e movimentos na direcção da superfície, onde a difusão de oxigénio é maior. Isto provavelmente demonstra uma carência de oxigénio neste tanque, onde a deterioração da água, com libertação de CO₂, conseqüente diminuição de pH, e aumento da concentração de amónia, põe em risco o bem-estar e condição física e fisiológica de todos os indivíduos do tanque, ainda que a diferença na concentração final de cortisol na água, amostrada entre o tanque A (27.18 ng/mL) e B (35.33 ng/mL), não tenha registado uma diferença relevante.

Na simulação, ambos os tanques foram expostos aos mesmos estímulos, com excepção do tratamento efectuado em cada tanque, onde o controlo de amónia no tanque A poderá explicar a diferença no comportamento da concentração de cortisol. Comparativamente ao tanque B, os indivíduos deste tanque (A) encontravam-se num ambiente fisiologicamente mais acessível, não sofrendo do efeito cumulativo de amónia, e conseqüente influência na água do tanque, como se verificou em B. A amónia tem um efeito negativo a nível fisiológico nos peixes (Ip *et al.*, 2004; Barton & Iwama, 1991; Branson, 2008), contribuindo para o aumento do seu estado de stress (Pasnik *et al.*, 2007). A deterioração da água do tanque B, devido à elevada concentração de amónia, poderá ser a principal razão do aumento da concentração de cortisol neste tanque. Por outro lado, o método de amostragem de cortisol escolhido (na água), poderá ter induzido a erro, uma vez que o cortisol se deteriora na água. Isto implica que o cortisol excretado nas primeiras horas de experiência poderá ter sido degradado, na altura em

que se efectuaram as últimas amostragens. Esta situação dificulta a obtenção de uma curva cumulativa “perfeita”, perto do esperado, na teoria, interferindo ainda no cálculo das taxas de excreção e na concentração final de cortisol.

Como se pode ver na figura 15, onde se comparam directamente os dois tanques, relativamente às suas concentrações de cortisol e amónia, não existe grande diferença na concentração de cortisol, mas os níveis de amónia verificados no tanque B são 22 vezes superiores aos verificados no tanque A. Como era esperado, a concentração de amónia final no tanque B (2.5mg/L) foi superior à registada em A (0.11mg/L), sendo 10 vezes superior à concentração considerada limite para adição de AmQuel[®]. No tanque A, apesar de a amónia final ser inferior a 0.25 mg/L, demorou cerca de 10h e 5 adições de *cocktail*, para que a sua concentração baixasse para níveis inferiores a 0.25 mg/L. No entanto, após 4h de simulação, a diferença na concentração de amónia entre o tanque A (0.80 mg/L) e B (1.55 mg/L) já é bastante considerável. O único ponto de proximidade entre as concentrações de amónia, nos dois tanques, registou-se à passagem da segunda hora de simulação, onde a concentração de amónia no tanque A (1.07 mg/L) acabou por ser ligeiramente superior à obtida no tanque B (1.00 mg/L). Esta amostragem foi o único momento que a concentração de amónia no tanque A foi superior à registada em B. A partir das 4h de simulação, com a excepção da 12h (0.90 mg/L) e 14h (0.80 mg/L) de amostragem, a concentração de amónia no tanque B foi sempre superior a 1.35 mg/L até final da experiência. Estas concentrações de amónia registadas no tanque B aproximam-se e em três amostragens – 10h (3.05 mg/L), 16h (2.1 mg/L) e 17h (2.5 mg/L) – ultrapassam os níveis médios de toxicidade aguda por amónia (1.86 mg/L), testada em 17 espécies de teleósteos marinhos (Randall & Tsui, 2002; USEPA, 1989).

A maior concentração de amónia registada, tanto no tanque A (1.13 mg/L) como no tanque B (3.05), obteve-se à passagem das 9h e 10h, respectivamente. Este período coincide com a maior concentração de cortisol registada no tanque A, o que poderá indicar uma relação com a concentração de amónia, apesar do tratamento efectuado neste tanque.

Seria de esperar uma concentração de cortisol mais elevada em B, no entanto, como se pode ver na figura 15, entre as 4h e 12h de simulação, a concentração de cortisol foi mais elevada em A. Este período coincidiu com os tempos em que se adicionou o *cocktail* (4h, 5h, 7h e 10h). Após a décima hora de simulação não se adicionou mais o *cocktail*, o que poderá indicar uma possível influência do AmQuel[®] na concentração de cortisol excretado para a água. Vários transportes com sucesso

(Correia, 2001; Correia *et al.*, 2008; Correia *et al.*, 2010) foram efectuados utilizando AmQuel[®], sem nenhuma ocorrência prejudicial para os indivíduos, resultante do seu uso. Segundo a marca que comercializa AmQuel[®], este produto não terá qualquer efeito negativo para os peixes, tanto de água doce, como marinhos (Kordon[®] LLC, 2009). Um dos constituintes do AmQuel[®] é o *methanesulfonate*, um anião utilizado para estabilizar cátions por ser aparentemente inerte. O *methanesulfoneto* é um componente do *ms222* – também conhecido por *Tricaine methanesulfonate* – um anestésico para peixes, que no entanto já foi relacionado a possíveis efeitos nocivos, em humanos, devido a efeitos constritores (Aris *et al.*, 1990). Nos peixes, se este efeito se verificasse, levaria a uma menor capacidade respiratória, mas seria necessário comprová-lo, através da realização de novos estudos, específicos a este componente.

Ainda que aliado à elevada concentração de amónia, é visível que o período em que os *cocktails* foram adicionados, coincide precisamente com o aumento de cortisol verificado no tanque A, período este onde se registou a maior concentração de cortisol ao longo de toda a simulação, obtida à passagem da 10h, no tanque A (39.13 ng/mL). Seriam necessárias um maior número de repetições desta simulação, nas mesmas condições, para melhor se perceber a existência de um possível impacto entre o AmQuel[®] e a concentração de cortisol excretada para a água, para que estas hipóteses possam ser refutadas ou confirmadas.

4.2. Parte II: trabalho laboratorial

Na definição das experiências de laboratório a efectuar, diversos factores e dificuldades condicionaram o esboço dos ensaios. Uma das principais questões foi a decisão entre utilizar, ou não, peixes no decorrer das experiências, optando-se por efectuar este estudo sem a utilização de animais. A ausência de animais permite um maior controlo da real concentração de amónia no tanque, diminuindo a margem de erro nesse sentido. Como as concentrações de amónia são absolutas, servem de referência para qualquer espécie, uma vez que não foram obtidas para uma espécie em particular, sendo uma das principais vantagens de se realizar estas experiências sem animais.

Outra vantagem parte do pressuposto de não causar dano desnecessário aos indivíduos utilizados em ciência (Huntingford *et al.*, 2006; HSA, 2006; Iwama, 2007; Branson, 2008; OIE, 2009). Ou seja, antes de existir a noção do comportamento do AmQuel[®] *versus* amónia, a utilização de indivíduos será desnecessária, tendo uma maior relevância utilizá-los após várias manipulações de AmQuel[®], para testes mais

específicos, servindo também para comprovar ou refutar os resultados obtidos, sem animais.

Outro ponto relevante foi a escolha dos *cocktails* (AmQuel[®]/bicarbonato/carbonato) a utilizar. Para haver comparação entre experiências, optou-se pela escolha de 5 *cocktails*, com base nos utilizados pela empresa com a qual estávamos a trabalhar em parceria, e utilizá-los em todas as experiências, sem alterar a sua concentração. Para ter noção real do comportamento do AmQuel[®], que foi testado em situações críticas de elevadas concentrações de amónia, definiram-se doses extremas, em que o *cocktail* A (20/20/10ppm) e E (5/5/2.5ppm) delineiam os extremos, com concentrações intermédias compostas por B (15/15/7.5ppm), C (10/10/5ppm) e D (7.5/7.5/3.75ppm).

Considerou-se ainda uma concentração de amónia de 0.25 mg/L que é definida pela empresa *Flying Sharks*, como “limite” e que corresponde à concentração de amónia à qual se deverá adicionar AmQuel[®]. Esta concentração serve apenas como referência, sendo eficaz para as espécies transportadas por esta empresa, devendo ser ajustada às diferentes espécies transportadas, principalmente as mais sensíveis a amónia, como por exemplo, os salmonídeos, onde uma exposição prolongada a concentrações de amónia superiores a 0.20 mg/L poderão resultar na morte dos indivíduos (Arthur *et al.*, 1987; USEPA, 1999).

A experiência representada na figura 16 serviu para confirmar a velocidade do efeito quelante do AmQuel[®], que segundo o seu representante (Kordon[®] LLC, 2009) actuará nos primeiros 5 minutos. Para uma concentração inicial de amónia (2.5 mg/L) foram testados 5 *cocktails* (A, B, C, D e E). A maior acção quelante verifica-se nos primeiros 5 minutos, no entanto, apenas aos 7 minutos as concentrações de amónia baixaram consideravelmente para níveis inferiores. Em transportes de várias horas estes dois minutos não farão diferença, e na realidade, após os 15 minutos iniciais, depois da adição de Amquel[®], este tende a estabilizar a amónia, não se verificando alterações nos restantes 45 minutos da experiência. Nesta experiência a amónia foi adicionada apenas no início, no tempo 0, o que implica que esta estabilização após os 15 minutos resulta do facto de não ter ocorrido adições posteriores de amónia à água, durante os 60 minutos de ensaio.

Para estas concentrações de amónia (2.5 mg/L), apenas os *cocktails* mais fortes (A e B) garantiram uma concentração de amónia abaixo de 0.25 mg/L, ao fim de 7 minutos. Os *cocktails* mais fracos (D e E), apesar de reduzirem a concentração de

amónia, ao fim de 7 minutos, não conseguiram assegurar níveis inferiores ao limite pré-estabelecido, obtendo-se níveis finais de amónia perto de 1 mg/L. O *cocktail* C, obteve um comportamento intermédio, conseguindo baixar a concentração de amónia para níveis inferiores a 0.25 mg/L, após 10 minutos, mas obtendo uma concentração final de amónia no tanque de 0.50 mg/L.

A figura 17 complementa a figura anterior, sendo testadas mais duas concentrações iniciais de amónia (0.5 mg/L e 1.7 mg/L). Para concentrações de amónia superiores a 1.5 mg/L, apenas o *cocktail* A se mostra efectivo em baixar a concentração de amónia para níveis aceitáveis. Por outro lado, com concentrações de amónia na ordem dos 0.5 mg/L, após 15 minutos todos os *cocktails* se mostraram eficientes, quelando toda a amónia do tanque (A e B) ou obtendo concentrações de amónia abaixo de 0.25 mg/L (C, D e E).

Durante os ensaios de laboratório o AmQuel[®] reflectiu o comportamento esperado, para cada tipo de experiência efectuada. No entanto, na experiência representada na figura 18 – onde se testaram 3 *cocktails* para 5 concentrações iniciais de amónia – o AmQuel[®] não se mostrou tão efectivo como nas experiências anteriores. Visto que a repetição desta experiência foi a última a ser efectuada, estes resultados obtidos poderão ser uma reflexão do AmQuel[®] e do seu tempo/condição de armazenamento. O AmQuel[®] poderá ter diminuído alguma da sua capacidade quelante, justificando o porquê de a concentração de amónia não chegar a zero, nem mesmo com o *cocktail* mais concentrado (A). Considerando todas as experiências efectuadas, onde a concentração de amónia baixou para níveis perto do zero – mesmo com *cocktails* de concentração inferior – o tempo de armazenamento e consequente durabilidade do AmQuel[®] ou uma possível contaminação deste, poderão estar na origem destes resultados. O factor erro, associado ao método laboratorial de detecção de amónia, também deverá ser levado em conta, ainda que todas as curvas padrão obtidas terem garantido o funcionamento do método, na íntegra.

Nas tabelas IV e V, encontram-se os dados estatísticos das equações das curvas, escolhidas para representar os resultados das figuras 18 e 21, respectivamente. O tipo de ajuste escolhido para cada ensaio depende da reacção do AmQuel[®] com a amónia. Ou seja, se a saturação é imediata, após o gasto de AmQuel[®] vai haver um aumento linear da amónia, como o verificado na figura 21, para o *cocktail* C. Por outro lado, se o AmQuel[®] vai saturando gradualmente, a sua recta representativa vai assumir um comportamento exponencial, como o verificado na figura 21, para o *cocktail* B. As

rectas exponenciales foram efectuadas com três parâmetros, onde nem sempre o Y_0 foi idêntico ao real, uma vez que consoante o comportamento de cada recta, assim o seu ajuste relativamente a Y_0 . Ou seja, na prática nem sempre se consegue uma concentração precisa, relativamente ao pretendido na teoria, necessitando por isso de um ajuste para que os resultados daí inferidos se aproximem o mais possível da teoria, mantendo-se o seu valor real. Para cada figura onde se teve que optar entre vários tipos de recta, a escolha recaiu no melhor R^2 , para assegurar a recta mais próxima do real, mantendo a sua viabilidade estatística.

Após os resultados obtidos nos ensaios anteriores, optou-se por uma aproximação diferente, para se perceber o comportamento do AmQuel[®], quando exposto a diferentes *inputs* de amónia. Assim, simulou-se uma taxa de excreção de amónia (2 mg/h) (Anexo III), igual para cada tanque, sendo testados 5 *cocktails* (A, B, C, D e N – nulo, sem adição de AmQuel[®]) ao longo de 10h de experiência (figura 19). Com excepção da concentração mais baixa de AmQuel[®] (D) – e do nulo (N), ao qual não se adicionou AmQuel[®], para servir de controlo – os restantes *cocktails* (A, B e C) mantiveram a concentração de amónia abaixo de 0.25mg/L, ao longo das 10h de experiência.

Segundo o resultado obtido no tanque (N), onde se registou uma concentração de amónia final de 2.25 mg/L, os três *cocktails* testados (A, B e C) mostraram-se eficientes, conseguindo manter a concentração de amónia abaixo do limite, mesmo em situações extremas, como a verificada. Estes resultados vêm de encontro aos obtidos anteriormente (figura 16), em que estes 3 *cocktails* foram expostos a uma concentração inicial de amónia (2.5 mg/L) semelhante à verificada após 10h de experiência (2.25 mg/L), conseguindo manter a concentração de amónia abaixo do limite, em ambas as experiências. No entanto, seria de esperar uma maior facilidade em manter o nível de amónia, abaixo do limite, na ausência de um *input* de amónia – ainda que exista uma concentração inicial de amónia elevada (figura 16) – do que o verificado na figura 19. Nesta experiência, não só os 3 *cocktails* (A, B e C) foram 100% eficientes, como o comportamento de C foi mais eficaz numa situação cumulativa de amónia, relativamente a uma elevada concentração inicial de amónia. Este facto poderá ser relevante quanto à escolha da água de transporte, onde o AmQuel[®] parece ter maior eficácia numa situação onde o aumento de amónia é progressivo, que numa situação onde já existe uma elevada concentração inicial de amónia.

Este ensaio deixou ainda transparecer as diferenças entre as concentrações de AmQuel[®]. Ou seja, ainda que o *cocktail* A tenha o dobro da concentração do *cocktail* C, nesta experiência ambos se mostraram igualmente eficazes. Por outro lado, o *cocktail* D (7.5/7.5/3.75 ppm) apresenta uma concentração próxima de C (10/10/5 ppm), mas registou um comportamento bem menos eficaz. Após 3h de experiência a concentração de amónia neste tanque (D) foi superior a 0.25 mg/L, obtendo uma concentração final de amónia (aproximadamente 1.0 mg/L) 5 vezes superior à registada, na mesma hora (10h), no tanque C (aproximadamente 0.2 mg/L). Estes resultados tornam-se relevantes na escolha do *cocktail* a utilizar, onde uma concentração excessiva será desnecessária perante concentrações semelhantes, mas dever-se-á escolher pelo seguro, pois pequenas diferenças nas concentrações inferiores, poderão levar a um resultado catastrófico.

Com o intuito de melhor aprofundar esta relação entre os diferentes *cocktails*, escolheram-se dois *cocktails* intermédios, para os testar em diferentes situações de amónia. De entre os 5 *cocktails*, a escolha recaiu no B (15/15/7.5 ppm) e C (10/10/5 ppm), que segundo os resultados obtidos, nas experiências anteriores, seria um interessante ponto a explorar. Assim, estes dois *cocktails* foram expostos a diferentes taxas de excreção de amónia (0.25, 1.0, 2.5 e 5.0) (mg/h), com efeito cumulativo ao longo de 8h de experiência.

Apesar de a sua concentração não ser muito distinta, a verdade é que as diferenças entre um e outro foram notórias ao fim das 8h de ensaio. Mesmo para taxas de excreção inferiores a 1 mg/h, onde ambos os *cocktails* se mostraram efectivos na redução de amónia, ao longo das 8h de experiência, o *cocktail* B assegurou sempre concentrações de amónia, no tanque, inferiores às registadas pelo *cocktail* C. Quando testados com taxas de excreção mais elevadas, a diferença de eficácia torna-se mais expressiva. Com uma taxa de excreção 2.5 mg/h, o *cocktail* C apenas manteve a concentração de amónia abaixo dos 0.25mg/L nas duas primeiras horas de experiência, enquanto o *cocktail* B mantém a concentração de amónia abaixo deste nível durante as primeiras 5 horas, altura em que a amónia começa a saturar o AmQuel[®]. Para a taxa de excreção de amónia mais elevada (5 mg/h), o *cocktail* B mantém a amónia controlada por 3 h, mantendo a concentração de amónia no tanque inferior a 1 mg/L, durante 7 h de ensaio. Por outro lado, o *cocktail* C apenas manteve a concentração de amónia, no tanque, inferior a 0.25 mg/L durante a primeira hora, atingindo concentrações de 1 mg/L passado 5 h desde o início da experiência.

Estas diferenças entre o *cocktail* B e C estão representadas na figura 21, onde se torna claro a eficácia de cada *cocktail*, na presença de diferentes taxas de excreção de amónia, verificando-se ainda a existência de uma relação linear entre AmQuel[®] e amónia. No *cocktail* B, para uma taxa de excreção de amónia de 2.5mg/h, demora 5h até a concentração de amónia atingir os 0.25mg/L. Se duplicarmos a taxa de excreção (5 mg/h), o tempo em que a concentração de amónia leva a atingir este valor, reduz para metade (2,5h). O mesmo acontece para o *cocktail* C, onde a principal diferença reside no tempo que a concentração de amónia demora a atingir 0.25mg/L, até já não existirem moléculas de AmQuel[®] no tanque. Ou seja, para uma taxa de excreção de amónia de 2.5mg/h, o *cocktail* C inutiliza a amónia durante 3h, mantendo-a a níveis toleráveis. Se duplicarmos esta taxa (5 mg/h), o tempo que o AmQuel[®] se mantém eficaz na sua acção quelante, diminui para metade (1,5h). Isto significa que, enquanto houver AmQuel[®] na água, cada molécula de AmQuel[®] vai ligar-se a uma molécula de amónia, registando-se uma relação de linearidade.

De notar ainda, que para taxas de excreção inferiores a 1mg/h, tanto o *cocktail* B, como o C, garantem uma concentração de amónia abaixo dos 0.25mg/L, durante as 8h de experiência. Para uma taxa de excreção de 2.5mg/h, aconselha-se o *cocktail* B (até 5h abaixo de 0.25mg/L), uma vez que o *cocktail* C à passagem da segunda hora de ensaio já não tem capacidade para quelar a amónia, que continua a entrar continuamente no tanque, obtendo um comportamento linear, o que implica uma saturação imediata. Para concentrações elevadas (5mg/h), o *cocktail* B apenas quela à amónia na primeira hora, sendo depois totalmente saturado. Neste caso, e apesar de o *cocktail* B neutralizar a amónia durante 3h, para concentrações deste nível é aconselhado a utilização de um *cocktail* mais forte.

Estes resultados tornam-se relevantes na escolha do *cocktail* a utilizar, mediante o seu preço e eficácia. No mercado, uma solução líquida de AmQuel[®] (4 L) custa aproximadamente 30€, onde 5 mL de produto tratam 40 L de água. A um nível profissional, onde se manipula o AmQuel[®] em pó, 5 kg custam 110€, onde 1kg tratará 30 m³ de água (Kordon[®] LLC, 2009). Ainda que para empresas de transporte de peixe vivo, o preço do AmQuel[®] se possa tornar irrelevante, para pequenas empresas, grupos de investigação ou mesmo particulares, o preço do AmQuel[®] poderá ser relevante na altura de escolha do método de remoção de amónia, ou da quantidade de AmQuel[®] adicionada ao tanque.

Estas duas experiências (figura 20 e 21) permitem tirar uma ideia geral das doses de AmQuel[®] a utilizar, e a durabilidade do seu efeito em condições cumulativas de amónia. Mesmo em situações onde o preço de AmQuel[®] não seja um factor relevante na hora de ser adicionado ao tanque, a verdade é que não se sabe o impacto fisiológico que poderá ter, particularmente em indivíduos já de si stressados e fisiologicamente debilitados. Assim, se uma dose inferior de AmQuel[®] assegurar o mesmo resultado relativamente a uma dose mais elevada, será preferível usar a menor dose, uma vez que garante igual eficácia e é menos essa quantidade de químicos adicionada à água, já de si muito alterada.

Na última experiência efectuada (figura 22 e 23), juntou-se duas situações já testadas, criando uma nova situação a explorar. Apesar da tendência evidenciada pelas rectas B e C, de se aproximarem na presença de taxas de excreção mais elevadas, para 0.25 mg/h, a diferença entre B e C é ainda mais díspar que a verificada no ensaio anterior (figura 20 e 21). Isto deve-se ao facto de a amónia estar a ser excretada para uma água já contaminada de amónia. Ou seja, o AmQuel[®] vai quelar primeiro a amónia existente no tanque e quando a taxa de excreção é iniciada, o AmQuel[®] existente no tanque já não vai ser suficiente para contrabalançar o efeito da amónia que está a ser excretada. Ainda assim, para taxas de excreção de 0.5mg/h, o *cocktail* B consegue manter a concentração de amónia abaixo de 0.25mg/L, durante todo o ensaio (8h). No entanto, ao contrário do verificado na experiência anterior, e vindo de encontro ao que seria esperado, nenhum destes *cocktails* conseguiu manter a concentração de amónia inferior a 0.25mg/L, por mais que 2h, para as taxas de excreção superiores a 1mg/h, inclusive. Esta situação torna-se mais evidente na figura 23, onde se nota claramente o acréscimo de amónia para concentrações fisiologicamente insuportáveis para a maioria das espécies (Randall & Tsui, 2002; USEPA, 1989; USEPA, 1999).

Este tipo de experiência permite juntar dados a questões do transporte de peixe vivo ainda por compreender a 100%. Um exemplo é a situação da água de transporte ser, ou não, a mesma que a utilizada nos tanques de espera, previamente ao transporte. A bibliografia (Berka, 1986; HSA, 2006; Branson, 2008) recomenda, particularmente em transportes de espécies de água doce, pelo menos 25% da água de espera para a água de transporte. A razão pela qual se deverá adicionar uma percentagem da água de espera aos tanques de transportes reside nas propriedades da água, tanto a nível dos seus principais parâmetros, como a um nível hormonal. Ou seja, ainda que muitas vezes a água utilizada nos tanques de espera seja idêntica nas suas propriedades, à água

utilizada no transporte, existem propriedades – como pH, temperatura ou alcalinidade – susceptíveis a mudanças. Estas alterações são mais passíveis de acontecer em água doce, uma vez que a menor quantidade de iões, comparativamente à água salgada, lhe confere uma menor capacidade de tamponização. Por outro lado, o simples facto de se adicionar água “nova”, misturada com a água de espera, irá sempre alterar as propriedades existentes na água de espera. A principal razão para se optar por utilizar um volume parcial da água de espera dever-se-á essencialmente às hormonas libertadas para a água, pelos indivíduos, particularmente feromonas, que ao serem transferidas na água, para o tanque de transporte, serão posteriormente reconhecidas pelos indivíduos, facilitando a sua adaptação (HSA, 2006; Branson, 2008; OIE, 2009). No entanto, não se conhece o limite em que os produtos de excreção, particularmente a amónia, serão mais decisivos negativamente, relativamente ao possível benefício da presença hormonal.

A diferença entre adicionar AmQuel[®] a uma água contaminada de amónia ou a uma água completamente desprovida de amónia é enorme. Comparando os resultados obtidos, entre a figura 23 relativamente à figura 21, até mesmo o *cocktail* B, que numa situação idêntica ao nível de taxas de excreção (mas sem a concentração inicial de amónia – figura 21) consegue manter a amónia abaixo de 0.25mg/L durante 5h, mesmo para taxas de excreção elevadas (5 mg/h); com uma concentração inicial de amónia de 0.25mg/L, este mesmo *cocktail* não controla a amónia por mais de 1h (figura 23). Se compararmos estes dois ensaios, para o *cocktail* C, estas diferenças são ainda mais significativas. Para igual taxa de excreção de amónia, o tempo que o *cocktail* C mantém a concentração de amónia inferior a 0.25 mg/L, numa situação de amónia inicial no tanque (figura 23), é reduzido significativamente quando comparada a uma situação onde a concentração inicial de amónia é nula (21). Ou seja, para uma taxa de excreção de 0.25 mg/h, 1 mg/h, 2.5 mg/h e 5 mg/h, o cocktail C assegura uma concentração de amónia inferior a 0.25 mg/L durante 8h, 5h, 3h e 1h30, respectivamente. Quando adicionado a uma água contendo amónia (0.25 mg/L), este mesmo *cocktail* não garante uma concentração de amónia inferior a 0.25 mg/L por mais de 1h, mesmo para a taxa de excreção mais baixa (0.25 mg/h), atingindo concentrações de amónia entre 1.0 mg/L e 1.5 mg/L, ao fim de 2h, para a taxa de excreção mais elevada.

Esta situação implica uma maior ponderação na hora de escolher a água de transporte. Entre usar uma água completamente desprovida de amónia, arriscando o erro hormonal, uma vez que os indivíduos acabam por ser transportados para uma água completamente desprovida das suas próprias feromonas, e descaracterizada ao nível das

propriedades da água a que os indivíduos se teriam já adaptado, arriscando-se uma transferência entre tanques mais complicada, podendo comprometer o transporte. Por outro lado, se se optar pelo uso da água dos tanques de espera, prévios ao transporte, terá de se ter em conta que para compensar a existência de amónia inicial no tanque de transporte, se estará a adicionar uma maior quantidade de químicos à água. Tendo em conta as propriedades químicas do AmQuel® e conseqüente influência no pH da água, tornando-o mais ácido, é preciso ponderação na escolha do *cocktail* a utilizar, garantindo a diminuição da concentração de amónia, sem baixar o pH drasticamente, uma vez que elevadas concentrações de AmQuel® tendem a criar descidas súbitas no pH (Correia *et al.*, 2010; Kordon[®] LLC, 2009). Um meio-termo entre os dois casos, conjugando as propriedades físico-químicas da água e um *cocktail* de Amquel® suficiente para quelar a amónia, sem comprometer o pH da água, seria o ideal.

4.3. Conclusão

O transporte de peixe vivo é uma etapa relevante e com impacto directo em diferentes áreas, desde aquacultura, aquariofilia, repovoação de habitats aquáticos ou mesmo na indústria alimentar de peixe vivo. A principal dificuldade encontrada na exploração do transporte de peixe vivo é a falta de dados existentes. Ou seja, ainda que relacionado e com impacto directo em diversas áreas, as publicações e dados disponíveis acabam por ser demasiado específicos para cada área e não necessariamente na etapa do transporte em si. O principal exemplo a este nível é a comparação entre concentrações de cortisol – tanto na água como no plasma – e de amónia entre as diversas espécies transportadas, particularmente entre espécie marinhas. Até ao presente, os limites testados relativamente aos níveis médios de toxicidade aguda de amónia, tolerada pelos indivíduos, resumem-se a 32 espécies de água doce (2.79 mg/L) e 17 de espécies marinhas (1.86 mg/L) (USEPA, 2010). A diferença de interesse entre espécies marinhas e de água doce é notória, onde a importância das espécies de água doce, principalmente em aquacultura, é reflectida a vários níveis. Por exemplo, os dados obtidos nestas 17 espécies marinhas remontam a 1989, ainda que a USEPA tenha reformulado estes índices para toxicidade de amónia em 1999, mas apenas para espécies dulcícolas (Randall & Tsui, 2002; USEPA, 2010). Existem ainda estudos efectuados em espécies com características particulares, como uma elevada tolerância ou sensibilidade a amónia (Wang & Walsh, 2000; Arthur *et al.*, 1987; Ruyet *et al.*, 1995; Ruffier *et al.*, 1981). Espera-se que os resultados obtidos, tanto a nível de cortisol, como de amónia,

tenham contribuído no acréscimo de resultados nesta área, particularmente para a espécie *Argyrosomus regius*, cada vez mais uma espécie candidata ao sucesso de produção em cativeiro.

Os problemas de replicação destes ensaios em situação de transporte são outras das dificuldades sentidas, que levaram à opção de uma primeira abordagem, sem indivíduos. O tempo de carregamento prévio ao transporte, não permite experiências nem demoras conseqüentes destas. Os animais transportados apresentam um alto valor comercial, o que resulta na protecção da sua integridade física, evitando-se qualquer perturbação prévia ao transporte, susceptível de causar e/ou aumentar o stress existente, como por exemplo, a recolha de sangue ou a inserção de uma marca individual. Aliado a estes factores, o planeamento de uma experiência durante um transporte é totalmente diferente, a nível logístico e metodológico, que um ensaio em laboratório. Mesmo com um planeamento exemplar, as paragens efectuadas durante um transporte condicionam os tempos de amostragem, que em laboratório são totalmente controlados e igualmente espaçados, sem qualquer entrave. Ou seja, é possível planear quando e onde se vão efectuar as paragens, durante um transporte. No entanto, e excluindo qualquer imprevisto, se um transporte aéreo demora 4h, são 4h onde não existe qualquer tipo de controlo ou qualquer hipótese de amostragem, nos tanques, durante este intervalo de tempo. Isto implica que se algo inesperado, a nível experimental, acontecer, não só não se terá acesso ao tanque para amostrar e controlar os parâmetros principais, como se arriscará a perder toda a carga, devido a um erro ou um acontecimento inesperado. Torna-se assim importante conhecer a acção do AmQuel[®] em situações extremas, com elevadas concentrações de amónia, e o seu tempo de reacção, não só à amónia existente num intervalo de tempo, como também numa situação cumulativa, prevendo o *cocktail* certo de AmQuel[®], suficiente para controlar a amónia, e sem alteração das propriedades químicas da água, para determinado tempo de transporte.

Os resultados obtidos, particularmente nas figuras 21 e 23 – resultando na construção da tabela VII (Anexo V) – vão de encontro às necessidades de estudos experimentais mais sistemáticos das condições de transporte, sentidos pela *Flying Sharks*, empresa em cooperação que originou o objectivo desta tese. A necessidade de acesso a resultados provenientes de manipulações de situações de elevadas concentrações de amónia, nomeadamente na utilização de químicos para controlo de amónia – de forma a poder responder mais eficientemente às exigências e condicionalismos dos transportes de peixes realizados – levou à realização desta tese.

Estes resultados permitem uma planificação mais precisa, onde através de uma estimacão da taxa de excreção de amónia, se poderá inferir quanto tempo determinado *cocktail* controla a amónia a níveis aceitáveis para cada espécie. Para além da escolha do melhor *cocktail*, consoante a amónia existente no tanque, estes resultados permitem planear com precisão os tempos de adicão de AmQuel[®], relativamente aos tempos de paragem permitidos durante um transporte. No caso de um transporte aéreo, sem acesso aos tanques, ou de um transporte rodoviário com paragens obrigatórias de 2h em 2h, saber quanto tempo de controlo se tem sobre determinado tanque, poderá ser essencial, prevenindo-se doses excessivas de AmQuel[®] e evitando-se concentrações de amónia superiores ao desejável.

Pequenas diferenças nas concentrações de cada *cocktail* escolhido poderão ter resultados distintos no controlo de amónia (Anexo V). Assim sendo, o *Cocktail B* (15/15/7.5 ppm) demonstrou ser eficaz no controlo de amónia, para taxas de excreção inferiores a 5mg/h, mesmo com concentração inicial (0.25mg/L) de amónia no tanque. *Cocktails* inferiores a 15/15/7.5 ppm mostraram-se ineficazes no controlo de amónia, para taxas de excreção superiores a 1mg/h.

Seguindo estes resultados, seria interessante ensaiar diferentes aproximações com o intuito de melhorar o transporte de peixe vivo. Seria interessante aprofundar o impacto de um *cocktail* elevado experienciando os mesmos níveis de amónia, em duas situações, inicial ou cumulativa, para perceber se realmente o AmQuel[®] é, ou não, mais efectivo numa situação cumulativa do que numa concentraçãoinicial elevada de amónia.

Para replicar um ensaio laboratorial numa situaçãode transporte, será necessária uma metodologia de amostragem idêntica, para que o stress imposto pela metodologia em si não influencie o resultado final. Neste grupo, inserem-se diferentes ensaios que seriam interessantes explorar. Diferentes aproximações de manejoamento quando se está a carregar/descarregar, como por exemplo, um menor número de pessoas – implicando menos alvoroço e confusão – *versus* um maior número de mão-de-obra, significando muitas vezes maiores níveis de ruído e agitaçãoo, mas podendo garantir uma maior celeridade de processos. Outro ponto de interesse seria explorar o manejoamento prévio ao transporte, que os indivíduos são sujeitos. Ou seja, até que ponto os últimos indivíduos a serem carregados se tornarãomais susceptíveis ao stress? Haverá influênciana sua adaptaçãoo à água de transporte?

Com base nos resultados obtidos na última experiência (figura 22 e 23), e tendo em conta estas e muitas outras questões por resolver, seria interessante averiguar o impacto da qualidade da água, no início do transporte. Para isso seria necessário efectuar um transporte, exclusivamente para fins científicos, uma vez que se poria em causa a integridade física e fisiológica desses mesmos indivíduos. Colocando o mesmo número de indivíduos, da mesma espécie, com peso, tamanho e estado de maturação idênticos, em 5 tanques distintos, efectuando-se amostragens periódicas de cortisol excretado para a água, níveis de amónia e principais parâmetros da água, durante o mesmo transporte, poder-se-ia inferir e, talvez, interligar estes factores. Assim sendo, a diferença entre os 5 tanques residiria na percentagem de água de espera *versus* água desprovida de amónia (ex: 100%, 75%, 50%, 25% e 0% água de espera) utilizando diferentes *cocktails* de AmQuel® (do mais concentrado, para o menos concentrado) para cada repetição de transporte, registando qualquer alteração a nível comportamental e fisiológico.

Os registos fisiológicos e comportamentais tornam-se de enorme relevância na percepção de stress e bem-estar dos indivíduos. Nem sempre 100% de sobrevivência é indicador de bem-estar animal, e mesmo o transporte que é efectuado dentro de todas as directivas legais, científicas e profissionais, é susceptível de causar danos nos indivíduos transportados. No transporte de corvinas (*Argyrosomus regius*) efectuado, todos os indivíduos sobreviveram a um transporte de 20h, onde a concentração de amónia não ultrapassou os 0.25 mg/L, com níveis de oxigénio dissolvido superiores a 200%, onde o pH foi superior a 7.5 e a temperatura se manteve entre 14.5°C - 16°C, ao longo de todo o transporte, sendo cumpridos os requisitos aliados ao bem-estar dos indivíduos transportados, com 100% de sobrevivência. Ainda que todos os requisitos tenham sido cumpridos, na realidade, todos os indivíduos transportados foram desparasitados à chegada, devido a uma infecção provocada por duas espécies de *Calceostoma sp.* (Duncan *et al.*, 2008). No entanto, este transporte foi de facto um sucesso, não só porque após desparasitação estes indivíduos não registaram mais problemas infecciosos, como após seis meses de cativeiro, demonstraram uma capacidade de adaptação, crescimento e maturação, permitindo uma indução de protocolos de reprodução, com sucesso (Duncan *et al.*, 2008).

Este resultado poderá significar que, para esta espécie, o AmQuel® não terá influência directa nas principais funções fisiológicas dos indivíduos. De facto, de todas as espécies transportadas pela empresa *Flying Sharks*, não houve problemas

relacionados ao uso do AmQuel[®] (comunicação pessoal). Noutra área, diversos aquarífilas garantem o sucesso e mais-valia deste produto (comunicação pessoal). No entanto, não se sabe ao certo qual o efeito a nível fisiológico, e devido à interligação constante entre todos os parâmetros associados ao transporte de peixe vivo, a menos que se efectuem estudos específicos do efeito do AmQuel[®] a nível fisiológico, não se pode garantir uma acção 100% inofensiva deste agente químico, ainda que se reconheça, até ao momento, o seu valor e eficácia no controlo de amónia, permitindo transportes mais seguros e em melhores condições. No entanto, e à semelhança de outros químicos utilizados, e entretanto substituídos, em mais de 2séc. de evolução no transporte de peixe vivo, assim que a eficácia é garantida, quanto menor a quantidade de químicos adicionada, menor o risco associado ao desconhecido.

O transporte de reprodutores para aquacultura, como também de espécies raras e em risco de extinção, torna-se numa missão crucial para o futuro das espécies aquáticas, sendo importante a evolução deste campo, com o investimento em novas experiências incidindo no carácter fisiológico dos indivíduos e da influência que a metodologia utilizada representa. Assim, e ainda que cada transporte de peixe vivo se baseie nos mesmos princípios e prioridades, continua a ser único, diferente e imprevisível, onde o maior desafio reside em torná-lo cada vez mais previsível.

5.BIBLIOGRAFIA

Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF (1995) *The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats*. Pain **60** (1): 91–102.

©Abbott Laboratories (2008) *Learning Guides from Abbott Laboratories on Immunoassay -2*. Printed in USA;

©Abbott Laboratories (2008) *Learning Guides from Abbott Laboratories on Immunoassay -3*. Printed in USA;

Alabaster JS, Lloyd R (1982) *Water Quality Criteria for Freshwater Fish* (2nd edn). Butterworth Scientific, London;

Allen C (1998) *Assessing animal cognition: ethological and philosophical perspectives*. J. Anim. Sci. **76** (1): 42-7;

Allen PJ, Cech JJ Jr. (2007) *Age/size effects on juvenile green sturgeon, *Acipenser medirostris*, oxygen consumption, growth, and osmoregulation in saline environments*. Environ Biol Fish, **79**: 211–229;

Alves RN, Cordeiro O, Silva TS, Richard N, Vareilles M, Marino G, Marco P, Rodrigues PM, Conceição LEC (2010) *Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics*; Aquaculture **299**: 57-66. Elsevier;

Amend DF (1982) *Transportation of fish in closed system; methods to control ammonia, carbon dioxide, pH and bacterial growth*. Trans.Am.Fish.Soc., **111**(5): 603-11;

Andrade A (2006) *Metodologías En El Laboratorio Clínico: El Inmunoensayo; Endocrinología* **53**. Editorial Univ Santiago de Compostela;

Antunes MIPP, Spurio RS, Godoi DA, Grumadas CES, Rocha MA (2008) *Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (Cyprinus carpio)*. Ciências Agrárias, Londrina, **29** (1): 151-156;

APEC Fisheries Working Group (1999) *Air shipment of live and fresh fish & seafood guidelines*. First Coastal Corporation;

Aris R, Christian D, Sheppard D, Balmes JR (1990) *Acid fog-induced bronchoconstriction. The role of hydroxymethanesulfonic acid*. Am Rev Respir Dis., **141** (3): 546-51;

Arthur JW, West CW, Allen KN, Hedtke SF (1987) *Seasonal Toxicity of Ammonia to Five Fish and Nine Invertebrate Species*. Bull. Environ. Contain. Toxicol., **38**:324-331, Springer-Verlag New York Inc.;

Ashley PJ (2007) *Fish welfare: Current issues in aquaculture*. Applied Animal behaviour Science **104**: 199-235. Elsevier©;

Bailey M, Dakin N (2001) *The Aquarium Fish Handbook*. New Holland Publishers, pp. 26.

Barton BA, Iwama GK (1991) *Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids*. Annual Review of Fish Diseases, **1**: 3-26;

Barton BA, Schreck CB, Ewing RD, Hemmingsen AR, Patiño R (1985) *Changes in Plasma Cortisol during Stress and Smoltification in Coho Salmon, Oncorhynchus kisutch*. General and Comparative Endocrinology **59**: 468-471. Academic Press, Inc.;

Berka R (1986) *The transport of live fish: A review*. FAO©;

Bocek A (2009) *Water Harvesting And Aquaculture For Rural Development*. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments;

Boeuf G, Payan P (2001) *How should salinity influence fish growth?* Comparative Biochemistry and Physiology Part C **130**: 411-423. Elsevier©;

Bonga WSE (1997) *The stress response in fish*. Physiol. Rev., **77**: 591–625;

Bower CE, Turner DT (1982) *Ammonia removal by clinoptilolite in the transport of ornamental fresh-water fishes*. Progr.Fish.Cult., **44**(1): 19-23;

Branson EJ (2008) *Fish Welfare*. Blackwell Publishing Ltd;

Broom, DM (1991) *Animal welfare, concepts and measurements*. Journal of Animal Science **69**: 4167–75;

Broom, DM (1998) *Welfare, stress and the evolution of feelings*. Advances in the Study of Behavior, **27**: 371–403;

Carmichael GJ (1984) *Long-distance truck transport of intensively reared largemouth bass*. Progr.Fish. Cult., **46**(2): 111-5;

Carmichael GJ, Tomasso JR, Simco BA, Davis KB (1984) *Confinement and water quality induced stress in largemouth bass*. Transactions of the American Fisheries Society, **113**: 767-777;

Carneiro PCF, Urbinati EC (1998) *Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatória do matrinxã Brycon cephalus causados pelo estresse de transporte*. In: “Aquicultura Brasil'98”, Anais da Aqüicultura, **2**: 609-620;

Chandroo KP, Duncan IJH, Moccia RD (2004) *Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress*. Applied Animal Behaviour Science, **86**: 225–250;

Chard T (1978) *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, pp. 293-534;

Chow PS, Chen TW, Teo LH (1994) *Physiological responses of the common clownfish Amphiprion ocellaris (Cuvier), to factors related to packaging and long-distance transport by air*. *Aquaculture*, **127**: 347-361;

Clark, TD, Hinch, SG, Farrell AP (2010) *Sex-Specific Differences In Cardiorespiratory Physiology, Haematology And Behaviour Of Wild Pacific Salmonids During Freshwater Migration And Spawning*. In “Fish Biology Congress Abstracts 2010” (Compiled by Don Mackinlay);

Cockram MS, Kent JE, Jackson RE, Goddard PJ, Docherty OM, McGilp IM, Fox A, Studdert-Kennedy TC, McConnell TI, O’Riorden T (1997) *Effect of lairage during 24 hour transport on the behavioural and physiological responses of sheep*. *Animal Science*, **65**: 391–402;

Conte FS (2004) *Stress and the welfare of cultured fish*. *Applied Animal Behaviour Science* **86**: 205-223. Elsevier ©;

Correia J (2001) *Long-Term Transportation of Ratfish, Hydrolagus colliei, and Tiger Rockfish, Sebastes nigrocinctus*. *Zoo Biology* **20**: 435-441. Wiley-Liss, Inc;

Correia J, Graça J, Morikawa H (2008) *Long-Term Transportation, by Road and Air, of Devil-Ray (Mobula mobular), Meagre (Argyrosomus regius), and Ocean Sunfish (Mola mola)*. *Zoo Biology* **27** : 1–17. Wiley-Liss, Inc;

Correia J, Graça J, Morikawa H, Kube N (2010) *Long-term transportation, by road and air, of Chub mackerel (Scomber japonicus) and Atlantic bonito (Sarda sarda)*. John Wiley & Sons. (*in press*);

Coward WA, Lunn PG (1981) *Biochemistry And Physiology Of Kwashiorkor And Marasmus*. *British Medical Bulletin*, **37**(1): 19-24;

Duncan N, Estevez A, Padros F, Aguilera C, Montero F, Norambuena F, Carazo R, Mylonas C (2009) *Domestication and GnRHa-induced spawning of meagre (Agyrosomus regius)*. IRTA;

Dupree HK, Huner JV (1984) *The status of warmwater fish farming and progress in fish farming research*. Washington, D.C., U.S. Fish and Wildlife Service, pp. 165-76;

Ellis T, James JD, Stewart C, Scott AP (2004) *A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout*. *Journal of Fish Biology*, **65**: 1233-1252. Crown copyright;

Ellis T, James JD, Scott AP (2005) *Branchial release of free cortisol and melatonin by rainbow trout*. *Journal of Fish Biology*, **67**: 535–40;

Ellis T, Scott AP (2007) *Measurement of fish steroids in water—a review*. *General and Comparative Endocrinology* **153**: 392-400. Elsevier©;

Estudillo CB, Duray MN (2002) *Transport of hatchery-reared and wild grouper larvae, *Epinephelus sp.** *Aquaculture* **219**: 279–290;

Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) *The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste*. *Physiological Reviews*, **85**: 97–177;

FAO (2008) *The state of world fisheries and aquaculture*; FAO©

Froese R (1988) *Relationship between body weight and loading densities in fish transport using the plastic bag method*. *Aquaculture and Fisheries Management*. **19**:275-281;

Goede RW, Barton BA (1990) *Organismic indices and an autopsy-based assessment of indicators of health and condition of fish*. *American Fisheries Society Symposium*, **8**: 93–108;

Gomes LC, Roubach R, Cavero BAS, Pereira M, Urbinati EC (2003) *Transport of pirarucu arapaima gigas juveniles in plastic bag*. Amazonica **33** (3);

Gornati R, Gualdoni S, Cavaliere R, Terova G, Saoglia M, Bernardini (2005) *Molecular biology and fish welfare: A winning combination*. Aquaculture International, **13**: 51-55. Springer©;

Guerreiro PM, Rotllant J, Fuentes J, Power DM, Canário AVM (2006) *Cortisol and parathyroid hormone-related peptide are reciprocally modulated by negative feedback*. General and Comparative Endocrinology **148**: 227-235;

Handy RD, Poxton MG (1993) *Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, **3**: 205-241;

Hatting J (1975) *The transport of freshwater fish*. J.Fish.Biol., **7**(4): 447-9;

Haywood GP (1983) *Ammonia Toxicity in Teleost Fishes: a Review*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, **1177**;

Hosoya S, Johnson SC, Iwama GK, Gamperl AK, Afonso LO (2007) *Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. **146**(1):78-86;

Humane Slaughter Association (HSA) (2006) *Fish Welfare During Transport*;

Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottingers TG, Sandoe P, Turnbull JF (2006) *Current issues in fish welfare*. Journal of Fish Biology, **68**: 332-372;

Ip YK, Chew SF, Randall DJ (2001) *Ammonia toxicity, tolerance, and excretion*. Fish Physiology, **20**: 109-148;

Ismiño-Orbe RA, Araujo-Lima CAM, Gomes LC (2003) *Excreção de amônia por tambaqui (Colossoma macropomum) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe*. Pesq. agropec. bras., Brasília, **38**(10): 1243-1247;

Iversen M, Finstad B, Nilssen KJ (1998) *Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts*. Aquaculture, **68**: 387–94;

Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA, Carlsen KT, Evjen T (2005) *Stress responses in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea*. Aquaculture, **243**: 373–82;

Iwama GK, Afonso LOB, Vijayan MM (2004) *Stress in Fish*. AquaNet Workshop on Fish Welfare, Canada;

Iwama GK (2007) *The welfare of fish*. Dis Aquat Org, **75**: 155-158. Inter-Research©;

Jentoft S, Aastveit AH, Torjesen PA, Andersen O (2005) *Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (Perca fluviatilis) and domesticated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. **141**(3): 353-358;

Johnson SK (1979) *Transport of live fish*. Aquacult.Mag., **5**(6): 20–4;

Johnson CW (2004) *Twelve uses of salt on a trout farm*. Aquaculture Newsletter of the North Carolina Cooperative Extension Service;

Kindschi GA, Shaw HT, Bruhn DS (1991b) *Effects of baffles and isolation on dorsal fin erosion in steelhead trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. Aquaculture and Fisheries Management, **22**: 343–50;

Kordon[®] LLC (2009) *AmQuel[®], How it Works?* <http://www.novalek.com/>;

Koroleff F (1976) *Determination of Ammonia*. In: “Methods of Seawater Analysis” (Grasshoff K, ed.). Verlag Chemie, pp. 126-133;

Larmoyeux JD, Piper RG (1973) *Effects of water reuse on rainbow trout in hatcheries*. Progressive Fish-Culturist, **36**: 2–8;

Lavery B (1988) *The Colonial Merchantman Susan Constant 1605*. Conway Maritime Press;

Lee C, Sadovy Y (1998) *A Taste for Live Fish: Hong Kong's Live Reef Fish Market*. Naga, The ICLARM Quarterly;

Leonard JR (1979) *The Fish Car Era*. U.S. Fish & Wildlife Service. U.S. Government Printing Office;

Lopéz-Olmeda JF, Montoya A, Yúfera M, Sánchez-Muros MJ, Garayzar ABS, Sánchez-Vázquez FJ (2010) *Daily Rhythms Of Behavioural, Hormonal And Digestive Activity In The Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*): Influence Of Feeding Schedules*. In “Fish Biology Congress Abstracts 2010” (Compiled by Don Mackinlay);

Makkar HPS (2008) *A review of the use of isotopic and nuclear techniques in animal production*. Animal Feed Science and Technology **140**:418-443;

Marecaux EN (2006) *Effects Of Potassium Permanganate On The Sailfin Molly, Poecilia Latippinna, At Varying Salinity Levels*. University Of Florida;

Martinez CBR, Azevedo F, Winkaler EU (2006) *Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais*. In “Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura” (Cyrino JEP & Urbinati EC). Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, p. 81-95;

Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova LR, Ramos-Enriquez R (2009) *Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress?*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences **4** (2): 158-178;

McCormick SD, Shrimpton JM, Carey JB, O’Dea MF, Sloan KE, Moriyama S, Bjornsson BT (1998) *Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol*. *Aquaculture*, **168**: 221–35;

Meinertz IR (1999) *Metabolism, elimination, and pharmacokinetics of the fish anesthetic benzocaine*. In: Smith DJ, Gingerich WH, Beconi-Barker MG “Xenobiotics in fish”. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, pp. 189-200;

Mid-Continent Railway Historical Society (MCRHS), Inc. ©2009 <http://www.midcontinent.org/>, (acedido em Agosto 2009);

Mid-Continent Railway Gazette (2006) *Badger #2 and the Fish Car Era*. Mid-Continent Railway Historical Society, Inc. **39** (4);

Moberg G (2000) *Biological response to stress: implications for animal welfare*. Oxford: CAB International, pp 1–21;

Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) *Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation*. *Rev. Fish Biol. Fish*, **9**: 211–268;

Moyle PB, Cech JJ Jr. (1998) *Fishes: An introduction to ichthyology*. 2ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA, pp. 559;

Nesse RM, Young EA (2000) *Evolutionary origins and functions of the stress response*. In: G. Fink (Ed.) “Encyclopedia of Stress” **2**: 79–84;

North BP, Turnbull JF, Ellis T, Porter MJ, Migaud H, Bron J, Bromage NR (2006) *The impact of stocking density on the welfare of farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Aquaculture*, **255**: 466–79;

OATA (2008) *Water quality criteria*. Ornamental Aquatic Trade Association (OATA) Ltd.;

OATA (2008) *Code of Conduct*. Ornamental Aquatic Trade Association (OATA) Ltd.;

OIE (2009) *Aquatic Animal Health Code: Welfare of farmed fish during transport*. OIE ©;

Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (1993) *Anesthetic and sedative drug dosage-fishes*. In: “Guide to the care and use of experimental animals”, 2.ed., Ottawa: Canadian Council on Animal Care, pp. 192;

Oliveira AMS, Cyrino JEP (1998) *Estresse Dos Peixes Em Piscicultura Intensiva*.

Oliveira SR, Souza RT, Nunes ESS, Carvalho CSM, Menezes GC, Marcon JL, Roubach R, Akifumi EO, Affonso EG (2008) *Tolerance to temperature, pH, ammonia and nitrite in cardinal tetra, Paracheirodon axelrodi, an amazonian ornamental fish*. Acta Amazonica, **38**(4) 773-780;

Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (2008) *Transportation of fish within a closed system*. Norwegian Scientific Committee for Food Safety;

Páscoa I, Fontainhas-Fernandes A, Castro LFC, Wilson JM (2010) *Effects Of Prolactin And Cortisol On Branchial Ammonia Transporter Expression In Zebrafish*. In “Fish Biology Congress Abstracts 2010” (Compiled by Don Mackinlay);

Pasnik DJ, Evans JJ, Klesius PH, Welker TL (2007) *Stress in Public Displayed, Cultured, and Pet Fish*. Proceedings of the Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association. 144th AVMA Annual Convention July 14-18, 2007 Washington, DC;

Pedrazzani AS, Castilho MF, Carneiro PCF, Molento CFM (2007) *Fish welfare and the problem of sentience*. Archives of Veterinary Science , **11**(3): 60-70;

Pickering AD (1993) *Growth and stress in fish production*. Aquaculture, **111**: 51-63;

Pickering AD, Pottinger TG (1989) *Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol*. Fish Physiology and Biochemistry, **7**(1-4) 253-258. Kugler Publications;

Pickering AD, Pottinger TG, Carraghera J, Sumptera JP (1987) *The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, Salmo trutta L.* General and Comparative Endocrinology, **68**(2): 249-259

Piper RG (1982) *Fish hatchery management*. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildl. Service, pp. 348–71;

Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G (2005) *Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management*. Aquaculture International, **13**: 29-49. Springer ©;

Porchas MM, Córdova LRM, Enriquez RR (2009) *Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress?* Pan-American Journal of Aquatic Sciences, **4**(2): 158-178;

Pottinger TG (2008) *The stress response in fish — mechanisms, effects and measurement*. In: Branson EJ (Ed.), “Fish Welfare”, Blackwell Publishing, pp. 32–48;

Powell NA (1970) *Striped bass in air shipment*. Progr. Fish-Cult., **32**(1): 18;

Randall DJ, Wright P (1987) *Ammonia distribution and excretion in fish*. Fish Physiology and Biochemistry, **3**(3): 107-120. Kugler Publications;

Randall DJ, Tsui TKN (2002) *Ammonia toxicity in fish*. Marine Pollution Bulletin, **45**: 17-23;

Robertson L, Thomas P, Arnold CR, Trant JM (1987) *Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and disease outbreak*. Progressive Fish Culturist, **49**: 1-12;

Roncarati A, Melotti P (2007) *State of the art of Italian aquaculture*. Ital.J.Anim.Sci. **6**(1): 783-787;

Rubec PJ, Cruz FP (2005) *Monitoring the chain of custody to reduce delayed mortality of net-caught fish in the aquarium trade*. SPC Live Reef Fish Information, **13**;

Ruffier PJ, Boyle WC, Kleinschmidt JK (1981) *Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards*. Journal Water Pollution Contz. Fed., **53**: 367-377;

Ruyet JP, Chartois H, Quemener L (1995) *Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response*. Aquaculture **136**: 181-194;

Ryan SN (1995) *The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the antarctic fish Pagothenia borchgrevinki*. Cellular and Molecular Life Sciences **51** (8): 768-774;

Scahaw (2004) *The Welfare of Animals During Transport (broilers and hens; turkeys; ducks, geese, pigeons and quail; ostrich & other ratites; deer; reindeer; rabbits; dogs & cats; rodents & primates; fish; exotics)*. European Food Safety Authority, European Commission;

Scales H, Balmford A, Manica A (2007) *Impacts of the live reef fish trade on populations of coral reef fish off northern Borneo*. Proc. R. Soc. B. **274**, 989–994;

Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS (2001) *Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny*. Aquaculture, **197**: 3–24;

Scott AP, Ellis T (2007) *Measurement of fish steroids in water—a review*. General and Comparative Endocrinology, **153**: 392–400;

Scott AP, Hirschenhauser K, Bender N, Oliveira R, Early RL, Sebire M, Ellis T, Pavlidis M, Hubbard PC, Huertas M, Canário A (2008) *Non-invasive measurement of steroids in fish-holding water: important considerations when applying the procedure to behaviour studies*. Behaviour **145**: 1307-1328;

Singer P (1995) *Animal liberation*. London: Pimlico. p. xvi;

Smart G (1976) *The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (Salmo gairdneri)*. Journal of Fish Biology, **8**: 471–5;

Smith CE, Piper RG (1975) *Lesions associated with chronic exposure to ammonia*. In: Ribelin WE, Migaki G (Eds) “The Pathology of Fishes”, pp. 497–514. University of Wisconsin Press, Wisconsin;

Smith HW (1929) *The Excretion Of Ammonia And Urea By The Gills Of Fish*. Department of Physiology, University and Bellevue Hospital Medical College, New York;

Smith MFL, Marshall A, Correia JP, Rupp J (2004) *Elasmobranch Transport Techniques and Equipment*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives, pp. 105-131;

Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ (2003a) *Do fish have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system*. Proceedings of the Royal Society of London Series B, **270**: 1115–21;

Soares AA (1990) *Técnica de transporte de peixe vivo*. Museu Nacional de História Natural. Silvas, cri-R;

Staurnes M, Sigholt T, Pedersen HP, Rustad T (1994) *Physiological effects of simulated highdensity transport of atlantic cod (Gadus morhua)*. Aquaculture, **119**: 381-391;

Strange R, Schreck CB, Golden JT (1977) *Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids*. Transactions of the American Fisheries Society, **106**: 213-218;

Swann L (1914) *Transport of Fish in Bags*. Aquaculture Extension. Illinois - Indiana Sea Grant Program;

Tanis EA (1987) *Statistics I. Descriptive Statistics and Probability*. Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, pp. 617;

Tomasso JR (1994) *Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals*. *Reviews in Fisheries Science*, **2**: 291–314;

Thurston RV, Russo RC, Luedtke RJ, Smith CE, Meyn EL, Chakoumakos C, Wang KC, Brown CJD (1984) *Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout*. *Transactions of the American Fisheries Society*, **113**: 56–73;

Turnbull JF, Bell A, Adams C, Bron J, Huntingford F (2005) *Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis*. *Aquaculture*, **243**: 121–32;

Twitchen ID, Eddy FB (1994) *Effects of ammonia on sodium balance in juvenile rainbow trout Oncorhynchus mykiss Walbaum*. *Aquatic Toxicology*, **30**: 27–45;

Udomkunsri P, Noga EJ, Monbteriro-Riviere NA (2004) *Pathogenesis of acute ulceration response (AUR) in hybrid striped bass*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **61**: 199–213;

U.S. Environmental Protection Agency – EPA (1989) *Ambient Water Quality Criteria for Ammonia (Saltwater)*. EPA 440/5-88-004;

U.S. Environmental Protection Agency – EPA (1999) *Ambient Water Quality Criteria for Ammonia*. EPA 822-R-98-008;

U.S. Fish & Wildlife Service – FWS (2009) *The Fish Car Era*. National Conservation Training Center **1**(166), <http://www.fws.gov> ©2009;

Varsamos S, Flik G, Pepin JF, Bonga WSE, Breuil G (2006) *Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 83–96;

Vermeirssen ELM, Scott AP (1996) *Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): evidence for branchial excretion of the maturationinducing steroid, 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one*. General and Comparative Endocrinology, **101**: 180–94;

Visser J (1996) *The capture and transport of large sharks for Lisbon Zoo*. Int Zoo News **43**(3): 147-151;

Vollmann-Schipper F (1975) *Transporte de peces vivos*. Verlag Paul Parey© (tradução espanhola Editorial Acribia©);

Volpato GL, Freitas EG, Castilho MF (2007) *Insights into the concept of fish welfare*. Dis Aquat Org, **75**: 165-171. Inter-Research©;

Walsh PJ, Milligan CL (1995) *Effects of feeding and confinement on nitrogen metabolism and excretion in the gulf toadfish opsanus beta*. The Journal of Experimental Biology **198**: 1559–1566;

Wang Y, Walsh PJ (2000) *High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen)*. Aquatic Toxicology **50** (3): 205-219;

Weiss JM (1972) *Psychological factors in stress and disease*. Scientific American, **226**: 104–113;

Wedemeyer GA (1996) *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Chapman&Hall, London;

Westers H (2001) *Production*. In: Wedemeyer GA (Ed.) “Fish Hatchery Management” (2nd edn). American Fisheries Society, Maryland, pp. 31–89;

Wilkie MP (1997) *Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills*. Comp. Biochem. Physiol, **118**(1): 39-50. Elsevier Science Inc.;

Wilkie MP (2002) *Ammonia excretion and urea handling by fish gills: Present understanding and future research challenges*. Journal of Experimental Zoology, **293**: 284-301;

Withers PC (1998) *Urea: Diverse functions of a 'waste' product*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, **25**: 722-727;

Wright PA, Randall DJ, Perry SF (1989) *Fish gill water boundary layer: a site of linkage between carbon dioxide and ammonia excretion*. J Comp Physiol B, **158**:627-635;

Wright PA, Iwama GK, Wood CM (1993) *Ammonia and urea excretion in lahontan cutthroat trout (oncorhynchus clarki henshawi) adapted to the highly alkaline pyramid lake (pH 9.4)*. J. exp. Biol. **175**: 153–172, The Company of Biologists Limited;

Wurts WA (1995) *Using salt to reduce handling stress in channel catfish*. World Aquaculture, **26**(3): 80-81;

Yigit M, Ergun S, Turker A, Karaali B, Bilgin S (2005) *Using Ammonia Nitrogen Excretion Rates as an Index for Evaluating Protein Quality of Prawns in Turbot (Psetta maeotica) Nutrition*.

Young FA, Kajiura SM, Visser GJ, Correia JP, Smith MFL (2002) *Notes on the Long-term Transport of the Scalloped Hammerhead Shark (Sphyrna lewini)*. Zoo Biology **21**: 243–251;

Zakes Z, Demska-Zakes K, Kata K (2003) *Rates of oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile Eurasian perch Perca fluviatilis L*. Aquaculture International **11**: 277–288, Kluwer Academic Publishers.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela I: Principais parâmetros – Oxigênio Dissolvido (OD), Temperatura (T) e pH – obtidos durante o transporte de corvinas (*Argyrosomus regius* Asso, 1801).

# Tanque	Tempo (h)	O.D. (%)	T (°C)	pH
I	T ₀	278	15,8	7,83
	T ₄	253	15,8	8,10
	T ₈	244	15,5	8,02
	T ₁₄	263	15,0	8,12
	T ₁₈	248	15,0	8,04
II	T ₀	307	15,8	7,83
	T ₄	278	15,9	8,00
	T ₈	262	15,6	7,88
	T ₁₄	273	15,1	8,00
	T ₁₈	271	15,0	7,97
III	T ₀	272	15,8	7,91
	T ₄	237	15,8	8,14
	T ₈	230	15,6	8,04
	T ₁₄	258	15,1	8,17
	T ₁₈	257	14,9	8,10

Tabela II: Principais parâmetros – Oxigênio Dissolvido (OD), Temperatura (T) e pH – obtidos durante uma simulação de corvinas (*Argyrosomus regius* Asso, 1801).

Tempo (h)	O.D. (%)	T (°C)	pH
T ₀	144	16,9	7,98
T ₂	254	17,1	7,57
T ₄	313	16,8	8,07
T ₆	368	16,5	8,08
T ₈	362	16,2	7,96
T ₁₀	395	16,0	7,89
T ₁₂	373	15,7	7,81
T ₁₄	373	15,4	7,75
T ₁₆	353	15,1	7,69
T ₁₈	347	15,1	7,69
T ₂₀	347	15,8	7,53

ANEXO II

Tabela III: Principais parâmetros obtidos durante uma simulação de cavalas (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) – Tanque A: Com tratamento.

Tempo (h)	pH	T (°C)	OD (%)
T _i	7,83	17,3	132
T ₀	7,72	17,8	104
T ₂	7,32	19,6	198
T ₄	7,22	20,6	181
T ₆	7,3	20,4	208
T ₈	7,15	21,4	238
T ₉	7,17	22,4	248
T ₁₀	7,09	21,7	251
T ₁₁	7,11	22,2	235
T ₁₂	7,14	21,8	154
T ₁₃	7,16	21,1	113
T ₁₄	7,19	21,1	98
T ₁₆	7,20	20,3	90
T ₁₇	7,23	20,4	84

Tabela IV: Principais parâmetros obtidos durante uma simulação de cavalas (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) – Tanque B: Sem tratamento.

Tempo (h)	pH	T (°C)	OD (%)
T _i	7,83	17,3	132
T ₀	7,80	18,0	118
T ₂	7,23	18,8	125
T ₄	7,12	19,7	100
T ₆	7,08	20,3	138
T ₈	6,99	21,2	160
T ₉	6,88	21,6	180
T ₁₀	6,81	21,7	161
T ₁₁	6,74	21,8	153
T ₁₂	6,78	21,7	138
T ₁₃	6,82	21,4	85
T ₁₄	6,84	21,2	65
T ₁₆	6,87	20,8	95
T ₁₇	6,86	20,7	137

ANEXO III

Tabela V: Diversas taxas de excreção de amónia, para diferentes espécies. O peso, temperatura (T) e a presença/ausência de alimento encontram-se também esquematizados.

Alimento	Amónia	Peso (g)	T (°C)	Espécie	Autor	Ano
	0,35 mg/dia	90	27	<i>Colossoma macropomum</i>	Ismiño-Orbe <i>et al.</i>	2003
	0,52 mg/dia	90	24	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Guerin-Ancey	1976
	0,42 mg/dia	90	24	<i>Sparus aurata</i>	Porter <i>et al.</i>	1987
	0,3 mM/L	1000		"general fishes"	Randall & Wright	1987
Não	4.2/3.3/2.0/1.6 mg TAN/Kg/h	20/30/45/55	23	<i>Perca fluviatilis</i>	Zakes <i>et al.</i>	2003
Sim	41,19 mg TAN/Kg/h			<i>Gadus morhua</i>	Handy & Poxton	1993
	140 mg TAN/Kg/h			<i>Anguilla rostrata</i>	Handy & Poxton	1993
Não	17,23 mM/Kg/h	100 a 281	8 a 12	<i>Oncorhynchus clarki</i>	Wright <i>et al.</i>	1993
Não	2,46 mM/Kg/h			<i>Rainbow trout</i>	Curtis & Wood	1991

ANEXO IV

Tabela VI: Concentrações de cortisol no plasma de diferentes espécies de peixe, antes (*Prestress*) e após (*Poststress*) um estímulo stressante. (Adaptado de Martínez-Porchas *et al.*, 2009)

Species	Stressor	Cortisol (nmol/l)		Exposure	References
		Prestress	Poststress		
Atlantic char <i>Salvelinus alpinus</i>	Handling	5	449	Acute	Lyytikäinen <i>et al.</i> (2002)
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	Sea lice challenge	99	339	Chronic	Bowers <i>et al.</i> (2000)
Atlantic salmon (diploid) <i>Salmo salar</i>	Confinement	27	151	Acute	Sadler <i>et al.</i> (2000b)
Atlantic salmon (triploid) <i>Salmo salar</i>	Confinement	27	124	Acute	Sadler <i>et al.</i> (2000b)
Brook trout (diploid) <i>Salvelinus fontinalis</i>	Handling and confinement	19	242	Acute	Benfey & Biron (2000)
Brook trout (triploid) <i>Salvelinus fontinalis</i>	Handling and confinement	2	146	Acute	Benfey & Biron (2000)
Common carp <i>Cyprinus carpio</i>	Density	19	206	Acute	Ruane <i>et al.</i> (2002)
Pallid sturgeon	Confinement	5	16	Acute	Barton <i>et al.</i> (2000)
Scaphirhynchus albus					
Pallid sturgeon <i>Scaphirhynchus albus</i>	Handling	5	8	Acute	Barton <i>et al.</i> (2000)
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Chemical exposure	49	110	Chronic	Benguira <i>et al.</i> (2002)
Rainbow trout (diploid) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Handling and confinement	77	698	Acute	Benfey & Biron (2000)
Rainbow trout male <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trapping	16	380	Acute	Clements <i>et al.</i> (2002)
Rainbow trout female <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trapping	57	764	Acute	Clements <i>et al.</i> (2002)
Sea bream <i>Sparus aurata</i>	Crowding	13	358	Chronic	Ortuño <i>et al.</i> (2001)
Walleyes <i>Stizostedion vitreum</i>	Capture and transport	33-315	380-480	Acute	Barton <i>et al.</i> (2003)

Martínez-Porchas *et al.* (2009)

ANEXO V

Tabela VII: Tempo que a concentração de amónia no tanque demora a atingir 0.25 mg/L, para 4 taxas de excreção de amónia (0.25, 1, 2.5 e 5) (mg/h), em duas situações de concentração de amónia inicial (0 mg/L e 0.25 mg/L), utilizando-se dois *cocktails* de AmQuel®: B (15/15/7.5 ppm) e C (10/10/5).

Amónia Inicial: 0 mg/L			Amónia Inicial: 0.25 mg/L	
Tempo atinge 0.25 mg/L			Tempo atinge 0.25 mg/L	
Taxa Excreção Amónia (mg/h)	<i>Cocktail B</i> (15/15/7.5 ppm)	<i>Cocktail C</i> (10/10/5 ppm)	<i>Cocktail B</i> (15/15/7.5 ppm)	<i>Cocktail C</i> (10/10/5 ppm)
0.25	8h (mínimo)	8h (mínimo)	8h	1h
1	8h (mínimo)	5h	2h	1h
2.5	5h	3h	1h	0h
5	2h30	1h30	0.5h	0.5h