

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA DUARTE FERRAZ SAMPAIO

ESTRESSE DO TRANSPORTE EM PEIXES ORNAMENTAIS MARINHOS:
ASPECTOS POLÍTICOS PARA A CONSERVAÇÃO, APLICAÇÃO
COMERCIAL E AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL

CURITIBA

2014

FLÁVIA DUARTE FERRAZ SAMPAIO

ESTRESSE DO TRANSPORTE EM PEIXES ORNAMENTAIS MARINHOS:
ASPECTOS POLÍTICOS PARA A CONSERVAÇÃO, APLICAÇÃO
COMERCIAL E AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Zoologia, no Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro

Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina A. Freire

CURITIBA

2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Zoologia



TERMO DE APROVAÇÃO

Flavia Duarte Ferraz Sampaio

“Estresse do transporte em peixes ornamentais marinhos: aspectos políticos para a conservação, aplicação comercial e avaliação experimental”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Comissão Examinadora:

Dr. Luís Fernando Fávaro
Orientador

Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martínez
Membro Externo – UEL

Dra. Marta Marques de Souza
Membro Externo – FURG

Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Membro Interno - UFPR

Dr. Jean Ricardo Simões Vitule
Membro Interno - UFPR

Curitiba, 12 de dezembro de 2014.

Programa de Pós-Graduação em Zoologia/UFPR
Setor de Ciências Biológicas
Caixa Postal 19020 - CEP 81531-980 - Curitiba - Paraná
Telefone/FAX +55 (041) 3361-1641**

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu marido e aos meus filhos. À minha mãe, Rosalba (in memoriam), a quem devo toda a minha vida no seu sentido mais amplo possível, e ao meu pai, Guilherme, porque juntamente com minha mãe me ensinou a valorizar as coisas mais importantes nesta vida. Ao meu marido, Tony Vinícius, por dividir sua vida comigo e por me ajudar a alcançar os meus sonhos. E aos meus filhos, Marina, Guilherme, Antônio e Davi, porque tenho a esperança de que vocês e/ou seus filhos e netos possam contemplar um fundo do mar mais parecido com aquele descrito pelo vovô Gui. Esta conquista é nossa.

Agradecimentos:

A Deus por me fazer sentir Sua presença constante.

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Fernando Fávaro, por aceitar o desafio desta orientação e por me proporcionar o trabalho em equipe, tornando os resultados desta tese muito mais produtivos.

À minha co-orientadora, professora Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire, por personificar para mim o significado da palavra Mestre. Obrigada por me acolher e por me dedicar seu carinho, sua atenção e seu precioso tempo. Seu exemplo de mãe, esposa, profissional e pesquisadora irão me inspirar para sempre. Foi uma grande honra ter sido sua aluna.

À professora Dra. Helena de Assis pela acolhida em seu laboratório e por possibilitar a geração e discussão dos dados relativos ao estresse oxidativo; agradeço ainda à aluna Franciele Lima Bettim pelo acompanhamento durante todo o trabalho no laboratório.

Ao professor Dr. Tony Vinícius Moreira Sampaio por viabilizar a coleta dos peixes e por desenvolver a metodologia para tal, pelo empréstimo dos equipamentos de campo, pelo auxílio em relação à estatística e a parte gráfica do texto; agradeço também ao seu aluno Carlos Henrique Sopchaki pelo apoio durante as coletas.

Aos professores do PPGZoo pelos ensinamentos transmitidos, em especial ao professor Emygdio pelo apoio solidário que possibilitou a conclusão deste doutorado, a CAPES pela bolsa durante o primeiro ano e à secretária Vanessa Peres pela presteza e disponibilidade.

Aos companheiros de laboratório por todo auxílio durante os experimentos e pela acolhida, solicitude e amizade: Thayzi, Luciana, Giovanna, Natascha, Leonardo, Juliane, Wanessa, Diogo, Burda e Bianca.

À amiga Gislaine de Fátima Filla por todo o carinho, apoio e incentivo, e aos demais colegas do IFPR, *Campus* Curitiba, em especial Daniel Bussolaro, Renato Dutra e Adriano William da Silva, pela compreensão e ajuda operacional.

A Dilzete Fernandes, pela ajuda e apoio durante todo o tempo em que esteve trabalhando conosco.

Aos meus pais pelo apoio em tudo e pelos valores transmitidos; ao meu pai pelo exemplo de fé, retidão e superação e por me passar a paixão e o respeito pelo mar, me ensinando a mergulhar; e a minha mãe (*in memoriam*) modelo de doação, plenitude e alegria, que sempre me incentivou e apoiou.

À minha irmã, Martha, pela amizade, amor e apoio incondicionais durante toda a minha vida, a minha sobrinha, Rafaela, por ter trazido tanta luz com sua chegada e ao meu cunhado, Rafael, por cuidar das duas e de papai.

Aos meus filhos Marina, Guilherme, Antônio e Davi, verdadeiros anjos de luz, que com sua existência me ensinaram o que realmente vale a pena nesta vida. Obrigada por suportarem bravamente este doutorado e por me darem tanto afeto.

Ao meu marido Tony Vinícius por co-orientar informalmente toda minha vida acadêmica, por me dedicar sua paciência e compreensão e por se desdobrar

cuidando dos nossos pequenos. Sem seu exemplo, incentivo e apoio eu não teria começado este doutorado e muito menos terminado. Agradeço de forma muito especial por tanta cumplicidade ao longo destes 23 anos de jornada.

“Negar nossa posição única e especial no mundo natural pode parecer uma atitude convenientemente modesta aos olhos da eternidade. Mas essa mesma negativa poderia ser usada como uma desculpa para fugir às nossas responsabilidades. A verdade é que nenhuma outra espécie, em tempo algum, teve um controle tão completo e absoluto sobre tudo o que existe na Terra, vivo ou morto, como nós temos hoje. Esse poder nos lega, independentemente da nossa vontade, uma responsabilidade terrível. Em nossas mãos se encontra não apenas nosso próprio futuro mas o de todos os outros seres vivos com os quais compartilhamos a Terra.”

David Attenborough

in A Vida na Terra

RESUMO

O objetivo geral de trabalho nesta Tese foi o de avaliar o transporte de peixes ornamentais marinhos (POM) sob duas ópticas: A) o da política comercial (Capítulo 1), e B) o dos desafios fisiológicos. Nesta segunda óptica, foi utilizada abordagem teórica de revisão da literatura (Capítulo 2) e abordagem experimental com a espécie *Abudefduf saxatilis* (peixe sargento) como modelo (Capítulo 3). No Capítulo 1 foi feita uma análise dos aspectos políticos no Brasil da comercialização internacional de peixes ornamentais marinhos (POM). Foi aplicado o princípio da precaução na análise de risco de importação (ARI) e quarentena em relação ao comércio destes peixes. A coleta de POM no ambiente natural pode causar estresse nos peixes, levando ao desenvolvimento de doenças. A legislação que regula a ARI e quarentena é derivada dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Pesca e Aquicultura. A quarentena de POM no Brasil não é feita por agências do governo, mas por estabelecimentos comerciais que são credenciados junto aos Ministérios, sendo feita em um tempo muito reduzido. De acordo com os dados obtidos, a abordagem de precaução não é realmente aplicada no Brasil, pois a informação científica não é contemplada pela legislação. O Capítulo 2 apresenta análise da literatura sobre o estresse do transporte em peixes, com abordagem ecofisiológica e proposta de aplicação comercial. Foi feita caracterização de: 1) processos de transporte mais utilizados, 2) visão ecofisiológica das respostas dos peixes, analisando a água de transporte e os desafios fisiológicos que sua deterioração impõe aos peixes, 3) alterações fisiológicas decorrentes do transporte e associação à classificação das respostas primárias, secundárias e terciárias ao estresse, e 4) sugestões de aplicação comercial deste conhecimento. O transporte foi classificado em transporte curto (até 8 horas) ou transporte longo (acima de 8 horas). As alterações ambientais e em consequência, fisiológicas, durante o transporte foram relacionadas aos conceitos de homeostase e alostase (carga e sobrecarga alostática). As principais medidas no sentido de minimização do estresse do transporte de peixes vivos se relacionam com as tentativas de redução no consumo de oxigênio ou prevenção da hipóxia ambiental, e/ou da geração de amônia, e/ou da acidificação da água: 1) adição de atmosfera de O₂ puro, 2) jejum pré-transporte, 3) salinidade isosmótica, 4) redução na temperatura, 5) utilização de anestésicos. Para alcançar este conjunto de dados necessários, deve-se levar em conta que à medida em que forem utilizadas metodologias com menores custos e maior praticidade mais valores de referência serão disponibilizados em relação aos marcadores ambientais (amônia, pH e OD) e fisiológicos, para o maior número de espécies relevantes comercialmente. O Capítulo 3 apresenta uma simulação de tempos diferentes de transporte do peixe sargento, *Abudefduf saxatilis*, por três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h. Os parâmetros fisiológicos foram: osmolalidade, teor hídrico muscular e glicemia. Quanto aos bioquímicos foi medida a atividade das enzimas Anidrase Carbônica branquial e anti-oxidante S-glutationa S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) hepáticas. Também foram avaliados os seguintes parâmetros da água: oxigênio dissolvido, amônia e pH. A mortalidade dos peixes foi de 20,9% e ocorreu para indivíduos com maior comprimento. Peixes com comprimento total inferior a 6 cm não morreram até o tempo máximo avaliado de 72 h. O parâmetro da água que mais apresentou relação com a mortalidade foi o pH. Não houve diferença significativa para os parâmetros fisiológicos comparando-se o grupo referência e os grupos experimentais. Apenas a enzima SOD apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo referência. Recomenda-se que o transporte para esta espécie seja realizado dentro de 24 horas e para espécimes de no máximo 6 cm de comprimento total. Conclui-se de forma geral, para a preservação da nossa biodiversidade e maior rentabilidade do comércio de POM, que 1) a legislação brasileira deveria ser modernizada e considerar o princípio da precaução, 2) a abordagem ecofisiológica é crucial para se entender os desafios do

transporte destes peixes, e 3) é importante caracterizar para cada espécie de interesse o efeito das alterações ambientais na água de transporte sobre sua sobrevivência e manutenção ou recuperação da homeostasia após o transporte.

ABSTRACT

The overall objective of this thesis was to evaluate the transport of marine ornamental fish (POM) under two approaches: A) trade policy (Chapter 1), and B) physiological challenges. In this second view, both a theoretical approach to the literature (Chapter 2) and an experimental approach using the species *Abudefduf saxatilis* (sergeant fish) as a model (Chapter 3) were employed. In Chapter 1, an analysis of the political aspects was made for the Brazilian approach on the international marketing of marine ornamental fish (POM). The precautionary principle was applied to the import risk analysis (IRA) and quarantine in relation to trade in these fishes. The collection of POM in the natural environment can cause stress in fish, leading to the development of diseases. The legislation governing the ARI and quarantine is derived from the Ministries of Agriculture, Livestock and Food Supply and Fisheries and Aquaculture. The quarantine of POM in Brazil is not made by government agencies but by commercial establishments that are accredited with the Ministry, being done in a very short time. According to the data obtained, the precautionary approach is not really enforced in Brazil, because scientific information is not contemplated by the legislation. Chapter 2 presents the literature review on the stress of transport in fish, with an ecophysiological approach and proposed commercial application: 1) the most widely used transport processes were summarized, 2) an ecophysiological view on the responses of fish was employed, analyzing the transport water and the physiological challenges that its deterioration imposes on the fish, 3) physiological changes associated with the transport were associated to the classic stress responses defined as primary, secondary and tertiary, and 4) suggestions were posed, for commercial application of this knowledge. The transport was classified as short (8 hours) or long (over 8 hours). Environmental change, and consequently, physiological challenges during transport were related to the concepts of homeostasis and allostasis (allostatic load and overload). The main steps to minimize the stress of live fish transport relate to attempts to reduce oxygen consumption and prevent environmental hypoxia, and / or the generation of ammonia and / or water acidification: 1) adding atmosphere of pure O₂, 2) pre-transport fasting, 3) isosmotic salinity, 4) reduction in temperature, 5) use of anesthetics. To achieve this set of data needed, one should take into account that the extent to which methodologies with lower costs and greater convenience are used, it is crucial to relate environmental (ammonia, pH e DO) and physiological markers for the largest number of commercially important species. Chapter 3 presents a simulation of different transport times using the sergeant fish, *Abudefduf saxatilis*, for 24, 48 and 72 hours. Physiological parameters evaluated were: osmolality, muscle water content and glucose. Enzymes assayed were: gill Carbonic Anhydrase enzymes and antioxidants glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in liver. The following water parameters were also evaluated: dissolved oxygen, pH and ammonia. Fish mortality was of 20.9% and occurred for individuals with greater length. Fish less than 6 cm total length did not die until the maximum time of 72 h assessed here. The water parameter that mostly related to mortality was water pH. There was no significant difference in physiological parameters comparing the reference group and the experimental groups. Just SOD enzyme showed significant differences when compared to the reference group. It is recommended that the transport to this species is carried out within 24 hours and specimens of up to 6 cm in total length. We conclude in general, in order to preserve our biodiversity and increase profitability of the POM trade, that: 1) Brazilian laws should be modernized and consider the precautionary principle, 2) the ecophysiological approach is crucial to understanding the challenges of transport of these fish, and 3) it is important to characterize each species of interest the effect of environmental change on water transport on survival and maintenance or restoration of homeostasis after shipping.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS MARINHOS E A ESPÉCIE <i>Abudefduf saxatilis</i>	19
TRANSPORTE DE PEIXES PARA COMERCIALIZAÇÃO E ESTRESSE....	21
OBJETIVO GERAL E ESTRUTURA DA TESE	24
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 1: O PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO E SUA ABORDAGEM NA ANÁLISE DE RISCO E NA QUARENTENA RELACIONADOS À COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS NO BRASIL.	30
ABSTRACT	32
1.1 INTRODUÇÃO	33
1.2 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE RISCO DE IMPORTAÇÃO (ARI) E DA QUARENTENA PARA A COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS	35
1.3 PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO NA CONSTITUIÇÃO FEDERAL DO BRASIL E SEUS REFLEXOS NA LEGISLAÇÃO QUE REGULAMENTA A ARI E A QUARENTENA PARA PEIXES ORNAMENTAIS.	39
1.4 ESTRUTURA GOVERNAMENTAL BRASILEIRA PARA CONTROLE DA COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS E A APLICABILIDADE DO PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO.	42
1.5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS (CAPÍTULO 1)	46
CAPÍTULO 2: ESTRESSE DO TRANSPORTE EM PEIXES: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E APLICAÇÃO COMERCIAL.....	52
2.1 INTRODUÇÃO.....	54
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE NOS PROCESSOS DE TRANSPORTE DE TELEÓSTEOS VIVOS	55
2.2.1 TRANSPORTES CURTOS	58
2.2.2 TRANSPORTES LONGOS	58
2.3 ECOFISIOLOGIA: A ÁGUA DE TRANSPORTE E OS DESAFIOS FISIOLÓGICOS AOS PEIXES	59
2.3.1 O CONCEITO DA ALOSTASE E A FISILOGIA DOS PEIXES.....	66
2.3.2 TRANSPORTE, ALOSTASE E QUALIDADE DE ÁGUA	68
2.4 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DECORRENTES DO TRANSPORTE....	70
2.4.1 RESPOSTAS PRIMÁRIAS.....	72
CORTISOL E CATECOLAMINAS.....	72
2.4.2 RESPOSTAS SECUNDÁRIAS	73

GLICOSE E GLICOGÊNIO.....	73
OSMOLALIDADE E A ALTERAÇÃO DE ÍONS NO PLASMA	73
MARCADORES HEMATOLÓGICOS.....	75
OUTROS MARCADORES.....	75
2.5 MEDIDAS PARA DIMINUIR AS ALTERAÇÕES NO AMBIENTE DE TRANSPORTE E O ESTRESSE ASSOCIADO: APLICAÇÃO COMERCIAL ..	76
COMBATER A HIPÓXIA E A ACIDIFICAÇÃO PELO CO ₂ : AERAÇÃO E/OU ADIÇÃO DE OXIGÊNIO PURO À EMBALAGEM, OU ADIÇÃO DE TAMPÃO À ÁGUA.....	76
MINIMIZAR AUMENTO NA AMÔNIA: PERÍODO DE JEJUM PRÉ- TRANSPORTE	77
MINIMIZAR O CUSTO METABÓLICO DA OSMORREGULAÇÃO, DIMINUINDO O CONSUMO DE OXIGÊNIO E GERAÇÃO DE AMÔNIA: ALTERAÇÃO DA SALINIDADE DA ÁGUA DO TRANSPORTE.....	77
REDUZIR A TAXA METABÓLICA: RESFRIAMENTO DA ÁGUA DO TRANSPORTE	78
REDUZIR A TAXA METABÓLICA: UTILIZAÇÃO DE ANESTÉSICOS	78
REDUZIR A AMÔNIA NA ÁGUA: ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS À ÁGUA DO TRANSPORTE	79
2.6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS (CAPÍTULO 2)	81
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO ESTRESSE DE TRANSPORTE DE PEIXE MARINHO DE INTERESSE PARA A AQUARIOFILIA: <i>ABUDEFDUF SAXATILIS</i> (LINNAEUS, 1758).....	93
3.1 INTRODUÇÃO	95
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	96
3.2.1 ESCOLHA E OBTENÇÃO DOS PEIXES	96
3.2.2 VERIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA	99
3.2.3 PROCESSAMENTO DOS PEIXES.....	99
3.2.4 GRUPO REFERÊNCIA.....	100
3.2.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	101
3.2.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	102
3.2.6.1 DOSAGENS PLASMÁTICAS.....	102
3.2.6.2 TEOR HÍDRICO MUSCULAR	102
3.2.6.2 GLICEMIA	102
3.2.6.3 DOSAGENS ENZIMÁTICAS.....	102
3.2.6.3.1 ANIDRASE CARBÔNICA	102
3.2.6.3.2 GLUTATIONA S-TRANSFERASE	103
3.2.6.3.4 CATALASE	104

3.2.6.3.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE	104
3.2.6.3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	104
3.2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	105
3.3 RESULTADOS.....	106
3.3.1.TAMANHO DOS PEIXES ANALISADOS E MORTALIDADE	106
3.3.2 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DURANTE O TRANSPORTE	110
3.3.3 OSMOLALIDADE.....	115
3.3.4.TEOR HÍDRICO MUSCULAR	115
3.3.5.GLICEMIA.....	115
3.3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	117
3.3.6.1 ANIDRASE CARBÔNICA	117
3.3.6.2 ENZIMAS ANTI-OXIDANTES	117
3.4 DISCUSSÃO	120
3.4.1 MORTALIDADE DURANTE OS EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE	120
3.4.2 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DURANTE O TRANSPORTE	121
3.4.3 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	125
3.4.4 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	126
3.4.4.1 ANIDRASE CARBÔNICA	127
3.4.4.2 ENZIMAS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	127
3.5 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS (CAPÍTULO 3).....	130
CONCLUSÃO GERAL	134
REFERÊNCIAS	135

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1: Localização dos quarentenários no Brasil e volume de peixes ornamentais marinhos exportados 43
- Figura 1.2: Ministérios relacionados a IRA e quarentena no Brasil e suas atribuições. 44

Capítulo 2

- Figura 2.1 - Esquema das diferentes possibilidades de transporte de peixes vivos, diferenciando os transportes curtos (A) dos longos (B). O transporte longo em geral envolve transporte rodoviário cobrindo distâncias maiores, e/ou também transporte aéreo. 57
- Figura 2.2. Resposta de conformação ou regulação interna diante de variação em parâmetro ambiental (meio externo). A área cinza claro no centro da Figura indica a faixa de “preferência” dos animais quanto ao parâmetro ambiental em questão. Para um animal regulador para este parâmetro, a área envolve a região de estabilidade/homeostasia, com perda do controle e aumento no valor interno, diante de aumentos no parâmetro ambiental acima de valor limite superior de regulação, e queda no valor interno, diante de queda no parâmetro ambiental abaixo do valor limite inferior de regulação. Para um animal conformador para este parâmetro, envolve a faixa intermediária de variação no parâmetro, de maior tolerância e conforto para o animal. A linha tracejada representa a igualdade entre o meio interno e o meio externo. 60
- Figura 2.3. Formas como o meio interno (líquido extracelular) de peixes de ambiente estável (maior profundidade, sem efeitos de maré, ou água doce) e peixes de ambientes instáveis (marinhos ou estuarinos sujeitos a efeitos das marés ou de riachos rasos de água doce) responde a variações ambientais. A: definição de respostas conformadora e reguladora; a resposta reguladora reflete o conceito clássico de homeostasia, com controle e regulação; B: hiporegulação em água do mar (AM) e hiper-regulação em água doce (AD), e capacidade de manutenção da estabilidade em salinidades intermediárias, para peixes eurihalinos, de ambiente instável; C: resposta conformadora típica em relação à temperatura (ectotermia e pecilotermia), mas extensão da tolerância em peixes de ambientes instáveis; D: mesma resposta conformadora em relação ao pH, pela baixa capacidade de tamponamento do sangue de peixes, mesma expectativa de extensão da tolerância em peixes de ambientes instáveis; E: resposta oxi-reguladora quando o oxigênio dissolvido (OD) é alto, com manutenção do consumo de oxigênio estável (VO₂); expectativa de maior capacidade de manter o consumo em hipóxia, em peixes de ambiente instável. Com maior queda do OD, redução no consumo (oxi-conformação); F: a amônia (NH₃) produzida pelo metabolismo do peixe é liberada para a água e vai se

acumulando na água, especialmente em situação de volume reduzido do meio externo; em peixes de ambientes instáveis, muitas vezes esta situação é evitada pela síntese de ureia. 64

Figura 2.4. A: Limites de tolerância e área de preferência de distribuição de uma espécie de peixe, em função da temperatura e salinidade da água, dentro de certo protocolo de exposição temporal. Área central de preferência relacionada com a manutenção da homeostasia. Periferias indicam desvio das condições ideais, ou carga alostática, “para cima e para baixo, para a esquerda e para a direita”. Desvios adicionais representam sobrecarga alostática e potencialmente morte, dependendo do tempo de exposição. As linhas pontilhadas indicam os limites máximo e mínimo de tolerância aos parâmetros temperatura e salinidade. Os cantos dos retângulos, tanto para a carga quanto para a sobrecarga alostática são mais escuros para indicar maior carga, pois representam valores desafiadores nos 2 parâmetros ao mesmo tempo. AD= água doce, AM = água do mar, AH= água hiper-salina. Este exemplo ilustra um peixe marinho relativamente eurihalino, pois mantém homeostasia em água salobra de aproximadamente 50% da água do mar. 67

Figura 2.5 Caracterização do estresse de transporte em peixes em relação aos conceitos de homeostase e alostase. A sobreposição de áreas reflete a interação entre os 2 parâmetros/eixos, caracterizando a passagem do estado de homeostase para carga e sobrecarga alostática. A alteração de estados ocorre em função da diminuição do oxigênio dissolvido e do aumento da amônia, representados no gráfico pelo deslocamento na área do gráfico para baixo e para direita. A morte do peixe durante e após o transporte é consequência da permanência por longo período no estado de sobrecarga alostática..... 70

Capítulo 3

FIGURA 3.1: Área onde foram coletados os peixes, no município de Bombinhas, Estado de Santa Catarina, Praia da Sepultura. 97

FIGURA 3.2: Coleta dos peixes: A) Tentativa de coleta sem a obtenção de indivíduos em função das condições climáticas; B) Utilização da rede para cercar os peixes para coleta em dia com condições climáticas favoráveis..... 98

FIGURA 3.3: Peixe embalado após a coleta. 99

FIGURA 3.4: Peixes coletados e mantidos em aquário estoque para obtenção de dados do grupo referência.101

FIGURA 3.5: Detalhe de peixe morto antes do início do processamento.107

FIGURA 3.6: Relação entre peso total (g) e comprimento total (cm) dos *Abudefduf saxatilis* utilizados neste estudo. A: peso (g) em função do comprimento (cm) dos peixes. Círculos pretos, animais vivos (n= 53) ao final dos experimentos; círculos brancos, animais mortos (n= 15). B: relação peso/comprimento versus comprimento dos peixes, com retas de regressão linear traçadas para os vivos e os mortos, separadamente, e indicação do coeficiente r² das retas.108

FIGURA 3.7: Comparação entre o comprimento total dos peixes *Abudefduf saxatilis* vivos (n= 53) e mortos (n= 15). As linhas tracejadas indicam a faixa de tamanho acima da qual os peixes passam a não tolerar o transporte (~6-8 cm de comprimento total), ou a chance de morrerem é muito grande. Símbolos brancos, animais mortos, símbolos preenchidos, animais vivos. Círculos, Vivos 24 h, triângulos invertidos, 48 h, quadrados, e 72h. Mortos entre 0-24h e entre 24-48 h.....109

FIGURA 3.8: Relação entre o comprimento total dos peixes *Abudefduf saxatilis* analisados e os valores de oxigênio dissolvido em mg/L (A), amônia em mg/L (B) e pH (C) na água da embalagem plástica. Símbolos brancos: animais mortos (n= 15), símbolos preenchidos: animais vivos (n= 53). Círculos, 24 h; triângulos invertidos, 48 h; e quadrados, 72h. A linha contínua indica a regressão linear entre o parâmetro ambiental da água e o comprimento dos peixes vivos; a linha tracejada indica a regressão linear para os peixes que morreram. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson e da probabilidade estão mostrados junto das retas de regressão, nas caixas de texto. As caixas de texto com linhas mais espessas indicam os valores dos peixes vivos. O asterisco indica onde a correlação foi significativa.111

FIGURA 3.9: Relação entre os pares de parâmetros ambientais avaliados na água da embalagem plástica. A: oxigênio dissolvido (OD, mg/L) x amônia (NH₃, mg/L); B: pH x OD; C: pH x NH₃. Símbolos brancos: animais mortos (n= 15), símbolos preenchidos: animais vivos (n= 53). Círculos, 24 h; triângulos invertidos, 48 h; e quadrados, 72h. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson e da probabilidade de significância estão mostrados nas caixas de texto junto aos símbolos. As caixas de texto com linhas mais espessas indicam os valores dos peixes vivos. Os asteriscos indicam as correlações significativas.....112

FIGURA 3.10: Gráficos tri-dimensionais com valores de NH₃ x OD x pH da água das embalagens de transporte, para peixes vivos (A) (n= 53) e mortos (B) (n= 15), utilizando todos os dados do estudo. A legenda indica o código de cores para as interpolações dos valores de pH.....113

FIGURA 3.11: Gráficos tri-dimensionais com valores de NH₃ x OD x pH da água das embalagens de transporte, para peixes vivos (A) (n= 14) e mortos (B) (n= 9), apenas para os dados de 24 horas dentro da embalagem plástica. A legenda indica o código de cores para as interpolações dos valores de pH...114

FIGURA 3.12: Parâmetros fisiológicos em *Abudefduf saxatilis*, no grupo referência (n=) e nos grupos mantidos vivos por 24, 48 ou 72 horas nas embalagens plásticas simulando transporte. A: Osmolalidade plasmática (mOsm/kg H₂O), B: teor hídrico muscular (%), C: glicemia (mg/dL) (n=).116

FIGURA 3.13: Atividade específica da anidrase carbônica branquial (/mg proteína) em *Abudefduf saxatilis* do grupo referência e após 24, 48 e 72 horas de permanência em embalagens plásticas, simulando transporte. Não houve diferença significativa entre os 4 grupos.118

FIGURA 3.14: Enzimas do sistema antioxidante no fígado de *Abudefduf saxatilis* após diferentes tempos de transporte (24, 48 e 72 horas). As barras indicam média ± erro padrão da média. (A) Atividade da Glutathione S-transferase (Referência n= 5; 24 h n= 10; 48 h n=8; 72 h n=9). (B) Atividade da Catalase (Referência n= 5; 24 h n= 10; 48 h n=7; 72 h n=8). (C) Atividade da

Superóxido dismutase (Referência n= 6; 24 h n= 9; 48 h n=7; 72 h n=8); “b”
indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo referência.....119

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1: COMPARAÇÃO ENTRE AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS NA LITERATURA CIENTÍFICA E OS TEMAS CONTIDOS NA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA RELATIVOS A PO. 41

Capítulo 2

TABELA 2.1: UTILIZAÇÃO DE MARCADORES FISIOLÓGICOS DE ESTRESSE DE TRANSPORTE EM TRABALHOS COM PEIXES. AD = ÁGUA DOCE; M= MARINHO; NI= FASE DE VIDA NÃO INFORMADA NO TRABALHO. (P)= RESPOSTA PRIMÁRIA; (S)= RESPOSTA SECUNDÁRIA.....88

INTRODUÇÃO GERAL

COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS MARINHOS E A ESPÉCIE *Abudefduf saxatilis*

A coleta de peixes ornamentais marinhos (POM) para fins comerciais representa um exemplo de exploração de recursos renováveis de propriedade comum, que acabam sendo degradados em proporção descontrolada (Hardin 1968). Tal fato está associado aos custos operacionais relativamente baixos envolvidos na atividade e a uma visão ultrapassada, mas ainda presente, de que os recursos marinhos são inesgotáveis (Miller and Spoolman 2012; Van Long and McWhinnie 2012).

A comercialização mundial dos POM está baseada na pesca extrativista, concentrada principalmente em regiões tropicais, com destaque para países como Indonésia, Filipinas, Brasil, Maldivas, Vietnam, Sri Lanka e Estados Unidos (Havaí), e tendo como principais mercados consumidores os Estados Unidos, a Europa e o Japão (Wood 2001). Entretanto, sabe-se que o manejo e a regulação das espécies coletadas para o comércio ornamental marinho não são suficientemente desenvolvidos na maioria dos países de origem, principalmente em grandes centros fornecedores como Indonésia e Filipinas (Tissot et al. 2010).

A maioria dos peixes coletados com finalidade ornamental é proveniente de recifes de corais. Em consequência, sua extração e comercialização estão relacionadas a muitos impactos ambientais, dentre os quais se destacam: a diminuição de populações de espécies alvo e/ou, alteração de processos ecológicos nos ambientes naturais (Wood 2001), introdução de espécies exóticas (Semmens et al. 2004; Wood 2001), e até a extinção local de organismos (Gasparini et al. 2005). Frequentemente, nesta atividade exploratória, ocorre a utilização de substâncias tóxicas, como o cianeto (utilizado para atordoar os peixes e facilitar sua captura), que pode causar danos irreversíveis aos organismos e ao próprio ecossistema (Fabinyi and Dalabajan 2011; Mak et al. 2005; Reynoso et al. 2012; Wood 2001).

Verificou-se no Brasil que a pressão de captura de peixes recifais no Brasil teve um efeito negativo significativo sobre a abundância e o tamanho de muitas espécies (Floeter et al. 2006). A retirada de peixes de recifes com objetivos comerciais e ornamentais tem sido responsável por alterações significativas na estrutura de comunidades destas espécies (Floeter et al. 2006).

O Brasil é um dos principais países fornecedores internacionais de POM, exportando principalmente para os EUA, mas também para a Europa (Wood 2001). Não existem estatísticas oficiais do comércio de POM no Brasil. Das 75 espécies coletadas para o comércio de peixes ornamentais no Brasil, 26 (35%) são endêmicas (Gasparini et al. 2005). Sob a ótica conservacionista, um fator de relevada importância do comércio de POM é que a maior parte dos exemplares comercializados é extraída do ambiente natural, uma vez que, para as espécies exploradas, não há domínio sobre o desenvolvimento em cativeiro. No Brasil, a situação é mais preocupante, pois todos os peixes marinhos nativos utilizados para a aquariofilia são capturados na natureza (Monteiro-Neto et al. 2003).

A Instrução Normativa (IN) nº 202, de 22 de outubro de 2008 dispõe sobre normas, critérios e padrões para a exploração com finalidade ornamental e de aquariofilia de peixes nativos ou exóticos de águas marinhas e estuarinas (IBAMA 2008b). De acordo com a IN 202, é possível a coleta de 136 espécies nativas de peixes ornamentais marinhos da costa brasileira. Dentre as espécies permitidas está o *Abudefduf saxatilis*, espécie escolhida para a abordagem experimental nesta Tese.

Esta espécie, representante da família Pomacentridae, é comumente comercializada em sites, sendo que os peixes são classificados em faixas de tamanho que possuem preços distintos e quanto maior o espécime, maior o preço. Foram encontradas as seguintes faixas: minúsculos (com até 1.5”), pequenos (entre 1.5 e 2”), médios (entre 2 e 3”) e grandes (entre 3 e 4.5”) (Aquariums 2013; Aquatics. 2013; Corrie 2012; Marine 2012).

A Família Pomacentridae é composta por espécies de pequeno porte (até 30 cm) e possui ampla distribuição em regiões costeiras tropicais e temperadas, apresentando maior diversidade em áreas de recife de coral

(James Cooper et al. 2009). É uma das famílias com o maior número de espécies exploradas como peixes ornamentais (Wood 2001), sendo que para a maioria das espécies dados biológicos são escassos. Pesquisas que tem por objetivo avaliar o estresse em peixes têm seu maior foco em animais cultivados, e as populações selvagens são menos pesquisadas (Pankhurst 2011).

TRANSPORTE DE PEIXES PARA COMERCIALIZAÇÃO E ESTRESSE

O transporte de peixes acarreta uma sucessão de estímulos adversos que incluem a captura, o carregamento e a adaptação ao novo ambiente. Como qualquer outro agente estressor, o transporte pode alterar a homeostase normal do peixe e influenciar negativamente o processo de osmorregulação (Carneiro 2007). Para otimizar espaço e custos de transporte de peixes ornamentais, utiliza-se o mínimo de água possível, o que também cria condições desfavoráveis para os peixes (Brinn et al. 2012). O procedimento utilizado para o transporte de peixes ornamentais marinhos consiste em colocar os peixes individualmente em pequenas sacolas plásticas, com o mínimo de água para cobrir o peixe em sua altura, e completar a sacola com oxigênio (Sampaio, FDF, observação pessoal).

A qualidade da água também é um fator determinante no sucesso de transporte de peixes. O transporte de peixes vivos resulta em significativa degradação da qualidade da água em função dos produtos excretados, liberação de muco e comida regurgitada (Carneiro 2007). No caso de peixes coletados no ambiente natural, como é o caso dos ornamentais marinhos, a situação pode ser agravada em função do fato de não se ter controle do período de alimentação do animal. Tal situação pode acarretar ainda o acúmulo de fezes na água utilizada para o transporte (Sampaio, FDF observação pessoal). Para a espécie ornamental *Potamotrygon cf. hystrix*, um elasmobrânquio de água doce endêmico da região amazônica, a adição de probióticos e antibióticos na água utilizada no transporte não reduziu a resposta ao estresse (Brinn et al. 2012). A baixa qualidade da água é um dos principais fatores do desencadeamento de doenças em peixes (2013; Bernoth and Crane

1995; Murphy and Lewbart 1995; Petty and Francis-Floyd 2004; Roberts and Palmeiro 2008; Weber *lii* 2011).

A regulação osmótica em peixes ósseos marinhos é realizada através da ingestão de água do mar que é absorvida pelo intestino, sendo que o principal sal marinho, o cloreto de sódio, é transportado pelo sangue para as brânquias, onde é devolvido ao mar através de secreção ativa pelo epitélio branquial, energizado pela $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. Íons restantes (basicamente os divalentes Mg^{2+} e SO_4^{2-}) são eliminados pelas fezes ou excretados pelos rins. A água perdida por osmose é assim recuperada pela dessalinização da água ingerida pelas brânquias (Marshall and Grosell 2006; Pough 2003). Além disso, o epitélio branquial também é o principal local de regulação do pH e de excreção de produtos nitrogenados, na maioria das vezes amônia (Carneiro 2007).

Situações de estresse ativam a liberação e o aumento da expressão de marcadores como o cortisol e enzimas de proteção antioxidante (Martínez-Álvarez and Sanz 2002). Pesquisa envolvendo transporte de uma espécie de elasmobrânquio de água doce ornamental evidenciou que o cortisol foi um bom bioindicador de estresse para a espécie (Brinn et al. 2012). Contudo, o cortisol, além de ser bioindicador de estresse em vertebrados, interfere sobre o transporte e regulação da homeostasia iônica em peixes (McCormick 2001).

Outro fator que acarreta estresse em animais marinhos é a variação na quantidade de oxigênio, uma vez que animais aquáticos captam oxigênio dissolvido na água (Schmidt-Nielsen 1996). O processo físico responsável pela passagem do oxigênio do meio extracelular para o interior da célula é a difusão, sendo que espécies marinhas usualmente vivem em áreas com suprimento de oxigênio relativamente constante e, em função disto, mecanismos para ajustar a regulação da respiração são precários ou ausentes (Schmidt-Nielsen 1996).

Alterações na temperatura são causa de estresse para animais marinhos, pois a vida ativa limita-se a uma faixa restrita de temperaturas e fora deste limite animais podem sobreviver em um estado de inatividade ou torpor (Schmidt-Nielsen 1996). A Taxa Metabólica Padrão (TMP) de um organismo é a taxa mínima de consumo de oxigênio necessária para a manutenção da vida.

A TMP é sensível à temperatura e isso significa que o custo energético da vida é afetado pelas alterações da temperatura corpórea (Pough 2003). Considerando a situação de um peixe em um local no qual ocorre uma elevação de temperatura, ocorrerá um aumento da utilização de energia que por sua vez corresponde a uma maior quantidade de alimento a ser ingerido (Pough 2003).

Reações bioquímicas são muito sensíveis à temperatura, o que faz com que a temperatura se constitua em um fator limitador para os animais, pois eles precisam manter a estabilidade bioquímica (Hickman-Jr et al. 2004). Os limites de tolerância para os animais não são fixos; a exposição de uma temperatura próxima da letal frequentemente acarreta um certo grau de adaptação, de modo que uma temperatura anteriormente letal possa ser tolerada, sendo que o processo de aclimação à temperatura depende de um suprimento adequado de oxigênio (Schmidt-Nielsen 1996). Vê-se assim forte interação entre os fatores abióticos, ambientais, podendo ou não gerar situação de perturbação da homeostasia dos animais, e em consequência estresse.

O estresse pode assim ser percebido como resposta do organismo, ou de tecidos e células. Dentre os danos celulares decorrentes do estresse, destaca-se o estresse oxidativo que se dá em função da formação de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido O_2^- e peróxido de hidrogênio H_2O_2), denominadas EROs. Estas espécies são convertidas em formas tóxicas de radicais livres, nocivas ao organismo (Almeida et al. 2007; Hermes-Lima et al. 2001). Quando a capacidade fisiológica do organismo não consegue eliminar ou anular as espécies reativas, tem-se, em alguns casos, a situação do estresse oxidativo (Hermes-Lima and Zenteno-Savín 2002). Defesas enzimáticas contra EROs estão presentes em todos organismos aeróbios e incluem catalase (CAT), glutatiónaredutase (GR), glutatiónaperoxidase dependente de selênio (Se-GPX), isoformas de superóxido dismutase (SOD), glutatióna S-transferase (GST) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Hermes-Lima and Zenteno-Savín 2002). As defesas oxidantes não enzimáticas incluem glutatióna reduzida (GSH), ácido ascórbico, ácido úrico, vitaminas C e E, β - caroteno, polifenóis e bilirrubinas (Hermes-Lima and Zenteno-Savín 2002).

O desenvolvimento da doença nos peixes está associado a fatores que causam estresse. O processo de coleta, transporte e adaptação ao novo ambiente são situações que figuram entre as mais estressantes para estes animais (Murphy and Lewbart 1995; Roberts et al. 2009; Smith 1997; Weber lii 2011). A relação entre estresse e doença em peixes se dá em função da alteração da homeostase, o que sujeita o peixe a doenças oportunistas (Bernoth and Crane 1995; Weber lii 2011), uma vez que o estresse influencia a habilidade do peixe de se proteger contra infecções (Scholz 1999).

Estudos do estresse em peixes devem levar em conta os aspectos biológicos e também do ambiente no qual o peixe será transportado. Tais estudos tem uma aplicação comercial direta que implica, conseqüentemente, na conservação uma vez que muitas espécies ainda não são cultivadas. Para o desenvolvimento adequado da aquicultura, espera-se que critérios objetivos sejam estabelecidos para definir o bem-estar e a saúde das espécies aquáticas comercializadas (Varsamos et al. 2006). Entender os mecanismos de resposta ao estresse do transporte pode possibilitar um manejo mais eficaz.

OBJETIVO GERAL E ESTRUTURA DA TESE

O objetivo geral da Tese foi o de avaliar o transporte de peixes ornamentais marinhos (POM) sob duas ópticas: A) o da política comercial (Capítulo 1), e B) o dos desafios fisiológicos. Nesta segunda óptica, utilizou-se abordagem teórica de revisão da literatura (Capítulo 2) e abordagem experimental com a espécie *Abudefduf saxatilis* (peixe sargento) como modelo (Capítulo 3).

A exportação e importação caracterizam o transporte mais longo e mais desafiador do ponto de vista fisiológico aos quais estes animais estão sujeitos. Em função disto, o **Capítulo 1** analisa os aspectos políticos no Brasil da comercialização internacional destes peixes, uma vez que as exigências políticas influenciam diretamente a conservação pois são capazes de piorar ou melhorar a condição dos animais.

O **Capítulo 2** contém uma análise das informações científicas fisiológicas que podem ser aplicadas comercialmente para se diminuir o

estresse do transporte de peixes em geral. Neste capítulo optou-se por não restringir as pesquisas aos ornamentais marinhos em função da pouca quantidade de referências além do fato de que a revisão possibilita indicar os aspectos que podem ser pesquisados futuramente.

No **Capítulo 3** foi feita a parte experimental que consistiu em coletar peixes da espécie *A. saxatilis* e mantê-los na embalagem de transporte por diferentes tempos a fim de avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas do estresse de transporte. As pesquisas desta natureza em geral testam produtos ou condições (e.g. a condição isosmótica) capazes de minimizar o estresse tais como anestésicos e adição de sal a água para peixes dulcícolas. Neste experimento porém, optou-se por não alterar a água utilizada no transporte com intuito de compreender como os animais reagem.

REFERÊNCIAS

(2013). Protozoal Ectoparasites (Ciliated and Flagellated). Clinical Veterinary Advisor. Saint Louis, W.B. Saunders: 33-34.

Almeida, E. A., A. C. D. Bainy, A. P. M. Loureiro, G. R. Martinez, S. Miyamoto, J. Onuki, L. Barbosa, C. C. M. Garcia, F. M. Prado, G. E. Ronsein, C. A. Sigolo, C. B. Brochini, A. M. G. Martins, M. H. G. Medeiros and P. Di Mascio (2007). "Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **146**(4): 588-600.

Aquariums, S. W. (2013). "Sergeant Major Damselfish (*Abudefduf saxatilis*).", 2013, from <http://www.saltwateraquarium.com/reef-live-rock/fish/damsels/sergeant-major-damselfish.html>.

Aquatics., B. Z. (2013). "Sergeant Major Damselfish.", 2013, from <http://www.bluezooaquatics.com/productdetail.asp?cid=15&pid=748&did=1>.

Bernoth, E.-M. and M. S. J. Crane (1995). "Viral diseases of aquarium fish." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine **4**(2): 103-110.

Brinn, R. P., J. L. Marcon, D. M. McComb, L. C. Gomes, J. S. Abreu and B. Baldisseroto (2012). "Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. histrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **162**(2): 139-145.

Carneiro, P. C. F. U., E.C.; Bendhack, F. (2007). Osmoregulation and Fish Transportation. Fish Osmoregulation. New Hampshire, Science Publishers.

Corrie, D. (2012). "CARIBBEAN SELECT MARINE EXOTICS - BUY DIRECT FROM THE DIVERS!", 2013, from <http://www.corriebusinessgroup.com/exotic/aquaculture/csme.php>.

Fabinyi, M. and D. Dalabajan (2011). "Policy and practice in the live reef fish for food trade: A case study from Palawan, Philippines." Marine Policy **35**(3): 371-378.

Floeter, S. R., B. S. Halpern and C. E. L. Ferreira (2006). "Effects of fishing and protection on Brazilian reef fishes." Biological Conservation**128**(3): 391-402.

Gasparini, J. L., S. R. Floeter, C. E. L. Ferreira and I. Sazima (2005). "Marine Ornamental Trade in Brazil." Biodiversity and Conservation**14**: 2883-2899.

Hardin, G. (1968). "The Tragedy of the Commons." Science**162**: 1243-1248.

Hauser-Davis RA, L. R., Bastos FF, Oliveira TF, Ribeiro CA, Ziolli RL, de Campos RC. (2012). "Alterations in morphometric and organosomatic indices and histopathological analyses indicative of environmental contamination in Mullet, *Mugil liza*, from Southeastern Brazil." Bulletin Environmental Contamination Toxicology**89**(6): 1154-1160.

Hermes-Lima, M., J. M. Storey and K. B. Storey (2001). Chapter 20 Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. Cell and Molecular Response to Stress. K. B. Storey and J. M. Storey, Elsevier. **Volume 2**: 263-287.

Hermes-Lima, M. and T. Zenteno-Savín (2002). "Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**133**(4): 537-556.

Hickman-Jr, C. P., L. S. Roberts and A. Larson (2004). Princípios Integrados de Zoologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

IBAMA (2008). Instrução Normativa N° 202, Diário Oficial da União.

James Cooper, W., L. L. Smith and M. W. Westneat (2009). "Exploring the radiation of a diverse reef fish family: Phylogenetics of the damselfishes (Pomacentridae), with new classifications based on molecular analyses of all genera." Molecular Phylogenetics and Evolution**52**(1): 1-16.

Mak, K. K. W., H. Yanase and R. Renneberg (2005). "Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors." Biosensors and Bioelectronics**20**(12): 2581-2593.

Marine, F. (2012). "Sergeant Major Damsel Fish - *Abudefduf saxatilis* - Striped Sergeant Damselfish.", 2013, from <http://www.freshmarine.com/sergeant-major-damsel.html>.

Marshall, W. S. and M. Grosell (2006). Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. The Physiology of Fishes, CRC, Taylor & Francis.

Martínez-Álvarez, R. M. H., M. C.; Domezain, A.; Morales, A. E.; García-Gallego, M. and a. A. Sanz (2002). "Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity." The Journal of Experimental Biology**205**: 3699-3706.

McCormick, S. D. (2001). "Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish." Integrative and Comparative Biology**41**: 781-794.

Miller, G. T. and S. E. Spoolman, Eds. (2012). Ecologia e Sustentabilidade. São Paulo, Cengage Learning.

Monteiro-Neto, C., F. E. A. Cunha, M. C. Nottingham, M. E. Araújo, I. L. Rosa and G. M. L. Barros (2003). "Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceara´ State, northeast Brazil." Biodiversity and Conservation**12**: 1287-1295.

Murphy, K. M. and G. A. Lewbart (1995). "Aquarium fish dermatologic diseases." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine **4** (4): 220-233.

Pankhurst, N. W. (2011). "The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective." General and Comparative Endocrinology **170** (2): 265-275.

Petty, B. D. and R. Francis-Floyd (2004). "Pet fish care and husbandry." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**7**(2): 397-419.

Pough, F. H. J., C. M.; Heiser, J. B. (2003). A Vida dos Vertebrados. São Paulo, Atheneu

Reynoso, F. L., M. Castañeda-Chávez, J. E. Zamora-Castro, G. Hernández-Zárate, M. A. Ramírez-Barragán and E. Solís-Morán (2012). "La acuariofilia de especies ornamentales marinas: un mercado de retos y oportunidades." Latin American Journal of Aquatic Research**40**(1): 12-21.

Ribeiro, C. A. O. R.-F., H.S.; Grötzner, S.R. (2012). Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia. São Paulo, Santos.

Roberts, H. and B. S. Palmeiro (2008). "Toxicology of Aquarium Fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**11**(2): 359-374.

Roberts, H. E., B. Palmeiro and E. S. Weber Iii (2009). "Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**12**(3): 609-638.

Schmidt-Nielsen, K. (1996). Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente. São Paulo, Livraria Santos Editora.

Scholz, T. (1999). "Parasites in cultured and feral fish." Veterinary Parasitology**84**(3-4): 317-335.

Semmens, B. X., E. R. Buhle, A. K. Salomon and C. V. Pattengill-Semmens (2004). "A hotspot of non-native marine fishes: evidence for the aquarium trade as an invasion pathway." Marine Ecology Progress Series**266**(239-244).

Smith, S. A. (1997). "Mycobacterial infections in pet fish." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**6**(1): 40-45.

Tissot, B. N., B. A. Best, E. H. Borneman, A. W. Bruckner, C. H. Cooper, H. D'Agnes, T. P. Fitzgerald, A. Leland, S. Lieberman, A. Mathews Amos, R. Sumaila, T. M. Telecky, F. McGilvray, B. J. Plankis, A. L. Rhyne, G. G. Roberts, B. Starkhouse and T. C. Stevenson (2010). "How U.S. ocean policy and market power can reform the coral reef wildlife trade." Marine Policy**34**(6): 1385-1388.

Van Long, N. and S. F. McWhinnie (2012). "The tragedy of the commons in a fishery when relative performance matters." Ecological Economics**81**(0): 140-154.

Varsamos, S., G. Flik, J. F. Pepin, S. E. W. Bonga and G. Breuil (2006). "Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*." Fish & Shellfish Immunology**20**(1): 83-96.

Weber Iii, E. S. (2011). "Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception?" Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**14**(1): 21-32.

Wood, E. M., Ed. (2001). Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies. UK, Marine Conservation Society.

CAPÍTULO 1: O PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO E SUA ABORDAGEM NA ANÁLISE DE RISCO E NA QUARENTENA RELACIONADOS À COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS NO BRASIL¹.

¹Capítulo publicado na revista Marine Policy 51(2015)163–168. Autores: Sampaio, Flavia DF; Freire, Carolina A; Sampaio, Tony Vinícius M; Vitule, Jean R S; Fávaro, Luís F.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de aplicar o princípio da precaução na análise de risco de importação (ARI) e quarentena em relação ao comércio de peixes ornamentais marinhos (POM). A análise utilizou o Brasil como exemplo, uma vez que ocorre a importação e a exportação destes peixes. A coleta de POM no ambiente natural, pode causar estresse nos peixes, levando ao desenvolvimento de doenças. A legislação que regula a ARI e quarentena é derivada dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Pesca e Aquicultura. A quarentena de POM no Brasil não é feita por agências do governo, mas por estabelecimentos comerciais que são credenciados junto aos Ministérios, sendo feita em um tempo muito reduzido. De acordo com os dados obtidos, a abordagem de precaução não é realmente aplicada no Brasil pois a informação científica não é contemplada pela legislação.

Palavras-chave: legislação sanitária; conservação de peixes; estrutura governamental brasileira.

ABSTRACT

The objective of this study was to employ the precautionary principle in import risk analysis (IRA) and quarantine in the trade of marine ornamental fishes (MOF). The analysis focused on the example of Brazil, as it imports and exports these fishes. These processes, since their collection in nature, may expose the fish to stress, which may lead to the development of diseases. The legislation that regulates IRA and quarantine is derived from the Ministries of Agriculture, Livestock and Supply and Fisheries and Aquaculture. The quarantine of MOF in Brazil is not undertaken by government agencies, but by commercial establishments that are registered with the Ministries, and is way too short. According to the data obtained, the precautionary approach is not actually applied, as scientific information is not contemplated by the legislation, and law is not enforced.

Keywords: sanitary legislation; fish conservation; Brazilian government structure.

1.1 INTRODUÇÃO

O objetivo da aplicação do princípio da precaução na gestão pesqueira é promover a utilização prudente e racional dos recursos naturais (Howarth 2008). O princípio da precaução recentemente começou a ser aplicado ao setor da pesca devido ao estado atual dos recursos naturais e da evidente falta de eficácia das medidas em vigor para assegurar a sustentabilidade da exploração (González-Laxe 2005). Examinar a questão, à luz de evidências científicas é obrigatório para que o princípio da precaução possa ser aplicado de forma eficaz para a gestão da pesca (Proelss and Houghton 2012). O Princípio da Precaução é tido como primário para a proteção dos interesses das futuras gerações e impõe antecipadamente a adoção de medidas preventivas para evitar danos ao meio ambiente (Canotilho and Leite 2011). Entretanto, o princípio da precaução não deve ser interpretado como cláusula geral, aberta e indeterminada, devendo ser explicitado o que se pretende prevenir e qual o risco a ser evitado (Antunes 2012).

O comércio global de peixes ornamentais tem se expandido sendo o número de espécies de peixes translocadas muito maior que a efetuada por todas atividades pecuárias juntas (Whittington and Chong 2007b). Estima-se que todos os anos mais de um bilhão de peixes ornamentais, envolvendo mais de 4,000 espécies de água doce e 1,400 espécies marinhas, sejam comercializados no mundo (Sales and Janssens 2003; Whittington and Chong 2007b). A comercialização de peixes recifais está baseada na pesca extrativista, concentrada principalmente em regiões tropicais, destacando-se Indonésia, Filipinas, Brasil, Maldivas, Vietnam, Sri Lanka e Havaí e tendo como principais mercados consumidores os Estados Unidos, a Europa e o Japão (Wood 2001). Esta situação favorece a necessidade de uma abordagem preventiva com o objetivo de conservação dos peixes ornamentais marinhos.

O comércio de peixes ornamentais no Brasil é composto por uma complexa gama de atividades: ocorre a pesca (Gasparini et al. 2005), a exportação (Gasparini et al. 2005; Wood 2001) e também a importação destes organismos (Wood 2001). O Brasil é um dos cinco países que mais exportam peixes ornamentais marinhos, mas não existem dados oficiais a respeito da

comercialização destes animais no mercado interno brasileiro (Gasparini et al. 2005). Também não há informações sobre os peixes importados de outros países e de animais provenientes do próprio mar territorial brasileiro, ou uma fiscalização apropriada quanto a isso. Há pouca informação sobre os estoques das espécies de peixe de recife nativas no Brasil. No entanto, nos últimos anos aumentaram os esforços de cientistas para obtenção de dados ecológicos adicionais sobre estas espécies (Bender et al. 2013; Longo and Floeter 2012; Luiz et al. 2011; Quimbayo et al. 2012). Uma análise da aplicação da legislação brasileira relativa ao comércio de peixes ornamentais não é apenas de interesse local, mas também é relevante para os outros países envolvidos no processo. A exportação/importação de peixes ornamentais está ligada a questões de conservação e sanitárias, além dos aspectos políticos, sociais e econômicos em escala global.

Para algumas questões ambientais e de conservação da biodiversidade o Brasil é um país com uma legislação relativamente moderna, mas com dificuldades administrativas para fazer esta legislação ser aplicada (Sampaio and Ostrensky 2013). Além disso, existem grandes retrocessos e “inovações” recentes em nossa legislação que ameaçam a conservação da biodiversidade. Em vários contextos a análise da aplicação da legislação brasileira relativa ao comércio de peixes ornamentais, é de interesse não só local, mas também se torna relevante para os demais países envolvidos no processo. O comércio destes organismos está ligado a questões conservacionistas e sanitárias, além dos aspectos políticos, sociais e econômicos.

Segundo a World Organisation for Animal Health – Office International des Epizooties (OIE) o aumento contínuo do comércio global, o que inclui animais vivos, traz como uma das consequências o aumento dos riscos de dispersão de doenças, especialmente zoonoses emergentes entre fronteiras internacionais e exige que a aplicação de medidas de controle destas doenças seja regulada por legislações modernas e cada vez mais eficazes (OIE 2013b). Para a OIE (OIE 2013a), "risco" pode ser definido como a probabilidade de ocorrência e a provável magnitude das consequências do perigo. A própria OIE (OIE 2013b) observa, entretanto, que em muitos países a legislação veterinária é ultrapassada e inadequada para enfrentar os desafios atuais e futuros.

No caso da comercialização de animais vivos entre países a quarentena é um procedimento frequentemente adotado. Para realização da quarentena os animais são isolados, evitando seu contato direto ou mesmo indireto com outros organismos, com o objetivo de evitar a transmissão de agentes patogênicos especificados (OIE 2013a). Para o comércio de peixes ornamentais, a quarentena se destaca como uma importante ferramenta para viabilizar a análise de risco. A análise de risco ambiental vem sendo utilizada para identificar os perigos e avaliar os riscos associados a fim de se determinar as opções e tomar decisões para a redução ou eliminação dos mesmos (Sánchez 2008). Recentemente a Análise de Risco de Importação tem sido utilizada para o manejo da saúde de animais aquáticos (Peeler et al. 2007).

A doutrina do Direito Ambiental Brasileiro reconhece a existência de dois princípios constitucionais próximos, porém distintos: Precaução e Prevenção (Antunes 2012; Fiorillo 2012). Para análise deste trabalho, será adotada a diferenciação que destaca que o Princípio da Precaução exige que diante da incerteza científica acerca do risco ambiental, a ação que poderá causar o risco deverá ser evitada (Antunes 2012; Fiorillo 2012; González-Laxe 2005; Machado 2012). Enquanto que o Princípio da Prevenção é aplicado a impactos ambientais já conhecidos a fim de que se possa identificar e prevenir impactos futuros prováveis (Antunes 2012; Canotilho and Leite 2011; Howarth 2008).

O objetivo deste trabalho foi se utilizar da aplicabilidade do Princípio da Precaução no que diz respeito à análise de risco e à quarentena na comercialização de peixes ornamentais. Partindo de uma revisão geral comparativa e da análise da legislação e estrutura no Brasil, buscou-se identificar procedimentos técnicos e administrativos gerais que precisam ser incorporados localmente a fim de tornar o comércio destes animais sanitária e ambientalmente mais seguro e economicamente mais rentável.

1.2 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE RISCO DE IMPORTAÇÃO (ARI) E DA QUARENTENA PARA A COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS

O comércio global de peixes envolve diferentes situações: peixes podem ser comercializados vivos para fins recreacionais (Fernandes 2003), para abate

e uso na alimentação humana (Farrell et al. 2010) e também para fins ornamentais (Wood 2001); a transmissão de doenças de peixes pode ser horizontal ou vertical (Oidtmann et al. 2011); os animais podem ser comercializados na forma de ovos embrionados, larvas e alevinos (Bui et al. 2013; King 2009) ou como indivíduos juvenis ou adultos (Jones and Tensen 2009); as espécies podem ser de água doce ou marinhas. Além disso, nos últimos anos aumentou consideravelmente o uso de peixes como modelo em pesquisas biomédicas (Ackermann and Paw 2003; Kent et al. 2009; Oidtmann et al. 2011; Stoskopf 2002). Todas essas razões fazem com que o transporte de peixes vivos venha se intensificando drasticamente em escala global.

No caso das espécies de peixes ornamentais marinhos é reduzido o número das que são produzidas em cativeiro o que faz com que o ambiente natural se constitua em uma fonte significativa de obtenção destes animais (Gasparini et al. 2005; Monteiro-Neto et al. 2003; Reynoso et al. 2012; Whittington and Chong 2007a; Wood 2001).

O ambiente natural dos peixes é rico em organismos potencialmente causadores de doenças, sendo que quando os peixes são capturados, geralmente possuem uma gama variada de patógenos, que não necessariamente indicam que os animais estão doentes (Murphy and Lewbart 1995; Scholz 1999). O desenvolvimento da doença nos peixes está associado a uma complexa associação entre o hospedeiro, o patógeno e os fatores que causam estresse, sendo que o processo de coleta, transporte e adaptação ao novo ambiente são situações que figuram entre as mais estressantes para estes animais (Murphy and Lewbart 1995; Roberts et al. 2009; Smith 1997; Weber 2011).

São bem documentados os casos de translocações de organismos aquáticos que, por estarem infectados por organismos patogênicos (e.g. metazoários, protozoários, bactérias e vírus), têm provocado surtos de doenças que podem colocar em risco a fauna dos locais de destino desses animais (Farley 1992; Ganzhorn 1992; Lightner 1992). Além de danos ambientais e riscos à saúde humana, uma vez que os organismos aquáticos podem servir como vetores para várias doenças humanas (Brier 1992; Petney and Taraschewski 2011), tais translocações podem provocar danos econômicos significativos.

A relação entre estresse e doença em peixes se dá em função da alteração da homeostase, o que sujeita o peixe a doenças oportunistas (Bernoth and Crane 1995; Weber 2011) uma vez que o estresse influencia a habilidade do peixe de se proteger contra infecções (Scholz 1999). A baixa qualidade da água é um dos principais fatores do desencadeamento de doenças em peixes (2013; Bernoth and Crane 1995; Murphy and Lewbart 1995; Petty and Francis-Floyd 2004; Roberts and Palmeiro 2008; Weber 2011) e, dependendo do período de transporte, os peixes ficam sujeitos a uma água em condições insalubres. Os coletores frequentemente não possuem sistemas equilibrados o que também sujeita os peixes coletados à baixa qualidade da água (Sampaio, FDF, em preparação). Desta forma, ao se capturar um peixe na natureza e introduzi-lo em um aquário, é possível introduzir uma série de patógenos.

Diante deste cenário, que envolve a coleta, o transporte e a readaptação dos animais, a análise de risco e a quarentena para peixes ornamentais visam a redução do risco de entrada de patógenos que possam promover algum tipo de desequilíbrio ao ambiente. A quarentena evita a perda de animais (Hadfield et al. 2007; Murphy and Lewbart 1995; Roberts and Smith 2011), uma vez que a prevenção de doenças em peixes é muito mais eficaz do que o controle de surtos (Petty and Francis-Floyd 2004). Também é possível que determinadas espécies de peixes sejam portadores de patógenos e não desenvolvam doenças por estar em equilíbrio com os mesmos. No entanto estes mesmos patógenos, podem causar doenças a outras espécies que são muito suscetíveis (Bernoth and Crane 1995) e desta forma um peixe sadio pode ser o responsável pelo adoecimento de outros peixes no sistema ou no ambiente. Outro objetivo vinculado à quarentena é evitar que, em caso de soltura ou escape de espécies de peixes não nativas, patógenos não nativos acometam populações selvagens (Bernoth and Crane 1995; Whittington and Chong 2007a).

No caso específico dos peixes, porém, a quarentena ainda é um tema pouco estudado, pouco praticado pelos pescadores e bastante complexo, pois vários fatores interferem na definição de protocolos de quarentena para estes organismos (Bartley et al. 2006; Lehane 1993; Wan Norhana et al. 2012; Whittington and Chong 2007b). A quarentena é uma das etapas da Análise de

Risco de Importação (ARI) (Bartley et al. 2006; Peeler et al. 2007; Whittington and Chong 2007b) e os importadores tem a obrigação de realizá-la. A ARI é utilizada para avaliar o risco de introdução de doenças provenientes do comércio internacional (Peeler et al. 2007). Utilizam-se modelos de árvores de cenários que descrevem relações temporais entre os eventos necessários para o perigo ocorrer, sendo que para animais aquáticos um dos modelos mais utilizados é o Covello–Merkhofer (CM) (Peeler et al. 2007).

A análise de risco pode ser feita de forma quantitativa ou qualitativa (Miller-Jr 2008; Thomas and Callan 2010), sendo que nos Estados Unidos existe uma cobrança maior para a realização da quantitativa (Lodge et al. 2006; Simberloff 2005). A análise quantitativa oferece uma margem de segurança maior para importar espécies que não oferecem risco e que podem gerar benefícios econômicos ao país (Keller et al. 2007). O que se observa é que geralmente a ARI é realizada para peixes utilizados na alimentação, e em países de economia mais desenvolvida tais como Austrália, Nova Zelândia, países da América do Norte e da Europa (Peeler et al. 2007). Em geral, a ARI é realizada com o objetivo de evitar a entrada de patógenos, porém outro objetivo muito relevante quando se considera os peixes ornamentais é evitar que espécies não nativas sejam introduzidas e comprometam a biodiversidade local, especialmente para regiões caracterizadas por um alto nível de endemismo (Lodge et al. 2006; Simonovic et al. 2013). A ferramenta que tem sido utilizada para triagem de peixes não nativos de água doce é a FISK (FishInvasivenessScreening Kit) (Simonovic et al. 2013). A utilização do FISK permite avaliar o potencial invasor da espécie em alto, médio e baixo (Simonovic et al. 2013).

A quarentena e a ARI são ferramentas importantes para tornar o comércio de peixes ornamentais mais seguro ambiental e economicamente. Entretanto, para aumentar a eficácia, o tempo de quarentena deveria ser maior e a ARI quantitativa. Tais alterações podem subsidiar melhor a tomada de decisões políticas sobre o comércio destes animais.

1.3 PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO NA CONSTITUIÇÃO FEDERAL DO BRASIL E SEUS REFLEXOS NA LEGISLAÇÃO QUE REGULAMENTA A ARI E A QUARENTENA PARA PEIXES ORNAMENTAIS.

O Brasil possui uma Constituição Federal (CF) baseada no modelo constitucional norte-americano (Moraes 2012). A Constituição Federal do Brasil de 1988 contém vários princípios ambientais em seu art. 225, sendo que o Princípio da Precaução se extrai de todo o sistema constitucional e não só do artigo relativo ao meio ambiente (Canotilho and Leite 2011). É considerado como um dos mais relevantes para o Direito Ambiental brasileiro (Fiorillo 2012), uma vez que o Brasil acatou o conceito de “sociedade de riscos” proveniente do Direito Ambiental alemão na década de 70 (Antunes 2012; Canotilho and Leite 2011; Fiorillo 2012). A sociedade de risco se caracteriza pelo contínuo crescimento econômico que pode sofrer a qualquer tempo as consequências de uma catástrofe ambiental, devendo o Estado atuar como gestor do controle dos riscos (Canotilho and Leite 2011).

A legislação brasileira mais diretamente relacionada com a ARI e a quarentena são dois documentos administrativos (Instruções Normativas, IN): IN 14/2010 (MPA 2010) e IN 18/2008 (MAPA 2008). O primeiro é proveniente do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e regulamenta os procedimentos da ARI e o segundo é do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e estabelece os procedimentos para importação de animais aquáticos para fins ornamentais. O foco da ARI (IN 14/2010) no Brasil são as questões sanitárias, sendo que não são abordadas questões ecológicas, como o risco de bioinvasão, por exemplo. Há uma outra IN, 202/2008, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que permite a importação de 530 espécies POM, todos os não-nativas no Brasil [62]. Em função disso, há a necessidade de atualizar a IN que regula a importação de POM, de modo que a ARI seja aplicada a todas as espécies que podem ser importados sob a luz do princípio da precaução.

A IN que regula ARI informa que a mesma pode ser qualitativa ou quantitativa. No entanto, o documento oficial do MPA que descreve a metodologia da ARI orienta para que seja feita qualitativamente (Figueiredo

H.C. P 2012). Para a quarentena é exigido o período mínimo de sete dias pela IN 18/2008. Assim sendo, a legislação brasileira referente a ARI equarentena de organismos aquáticos em geral, e POM em particular, não leva em conta o conhecimento científico e, por consequência, ignoram o princípio da precaução.

Cabe destacar que qualquer análise à luz do Princípio da Precaução deve considerar que alguns riscos devem ser admitidos ao se avaliar as atividades (Miller-Jr 2008). Em termos operacionais jurídicos e de conservação da biodiversidade e sustentabilidade, o Princípio da Precaução se baseia na inversão do ônus da prova (González-Laxe 2005), funcionando como uma espécie de princípio “*in dubio pro ambiente*”: na dúvida sobre o perigo de uma determinada atividade, decide-se a favor do ambiente até que se prove o contrário (Canotilho and Leite 2011). Em função do fato das questões ambientais envolverem várias áreas do conhecimento, nem sempre a ciência pode oferecer ao Direito a tranquilidade da certeza: aquilo que hoje é visto como inócuo amanhã poderá ser considerado extremamente perigoso ou vice-versa (Antunes 2012).

Para avaliar a Política de Pesca Comum da Comunidade Europeia a interpretação com base no Princípio da Precaução têm sido feita na tentativa de verificar a sustentabilidade dos recursos pesqueiros (González-Laxe 2005; Howarth 2008; Proelss and Houghton 2012). O Princípio da Precaução tem sido utilizado para preencher lacunas legais e políticas (Proelss and Houghton 2012), entretanto nem todos os estados da Comunidade Europeia adotam os mesmos requisitos em relação à implementação do princípio (González-Laxe 2005). Na tentativa de ajustar a gestão pesqueira ao princípio são utilizadas ferramentas tais como os Totais Admissíveis de Captura (Total Allowable Catches – TAC) (Howarth 2008; Proelss and Houghton 2012) e o Rendimento Máximo Sustentável (Maximum Sustainable Yield – MSY) (González-Laxe 2005). O exame contínuo da informação científica é condição para uma abordagem segundo o Princípio da Precaução (Proelss and Houghton 2012).

A análise do Princípio da Precaução relativo à comercialização de peixes ornamentais no Brasil permite afirmar que alguns pressupostos devem ser seguidos para que esta atividade não entre em conflito com a legislação. Neste sentido, o art. 225 § 1º, VII da Constituição Federal ressalta a responsabilidade

do Poder Público em proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais a crueldade (Brasil 1988). Para os peixes ornamentais são conhecidos casos concretos de sobrepesca (Chong et al. 2010), que pode levar à extinção de espécies e também de bioinvasão (Lodge et al. 2006; Thomas et al. 2009) que pode comprometer a função ecológica do ecossistema marinho. Para se verificar a aplicabilidade do Princípio da Precaução na legislação brasileira, foi realizada uma comparação com a literatura científica (Tabela 1).

Tabela 1.1: COMPARAÇÃO ENTRE AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS NA LITERATURA CIENTÍFICA E OS TEMAS CONTIDOS NA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA RELATIVOS A PO.

Tema abordado	Informação científica disponível	Conteúdo da legislação brasileira
<i>Tempo de quarentena</i>	Em torno de 30 dias (Harms 1996; Lewbart 2001; Petty and Francis-Floyd 2004)	7 dias (MAPA 2008)
<i>Análise de Risco de Importação</i>	Indicação para que seja feita de forma quantitativa (Lodge et al. 2006; Simberloff 2005)	É qualitativa (MPA 2010)
<i>Exemplo</i>	Peixe leão como bioinvasor em decorrência do comércio de PO (Luiz et al. 2013)	Permissão para importação do peixe leão (IBAMA 2008b)
<i>Ferramentas para gestão da atividade pesqueira</i>	TAC e MSY (González-Laxe 2005; Howarth 2008; Proelss and Houghton 2012)	Não contempla

Fica evidente que se a base do Princípio da Precaução é a incerteza científica, a legislação brasileira deveria seguir o que está disponível cientificamente. Ou seja, apesar do Brasil ter incorporado o Princípio da Precaução em sua legislação constitucional, não é possível afirmar que a

aplicação do Princípio está ocorrendo. São necessários ajustes quanto ao tempo de quarentena, controle da bioinvasão e análise de risco de importação para que a utilização do princípio cumpra sua função. É necessário ainda que se implemente a utilização de ferramentas para avaliação de dados biológicos, tais como TAC e MSY, para que o manejo da atividade pesqueira possa alcançar o Princípio da Precaução.

1.4 ESTRUTURA GOVERNAMENTAL BRASILEIRA PARA CONTROLE DA COMERCIALIZAÇÃO DE PEIXES ORNAMENTAIS E A APLICABILIDADE DO PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO.

O Brasil exporta e importa espécies de peixes ornamentais marinhos. Os animais exportados são provenientes da pesca (maioria) mas também da aquicultura que produz espécies nativas e exóticas. Das espécies marinhas tem destaque a produção do cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*), que é realizada por uma única empresa e totalmente exportada, e do peixe-palhaço que abastece o mercado interno. Em 2008, aproximadamente 70% de cavalos-marinhos exportados foram provenientes da aquicultura (IBAMA 2011).

Os últimos dados oficiais disponibilizados pelo IBAMA referentes à exportação de peixes ornamentais são do ano de 2007, sendo possível verificar que a exportação ocorre em 9 de um total de 26 estados no Brasil (IBAMA 2008a). Apenas para efeito de comparação, a exportação de espécies de água doce é 300 vezes maior do que a de marinhos. Tal fato é decorrente das espécies marinhas possuírem preço mais elevado, serem mais difíceis de produzir e de exigirem aquários mais complexos para os pescadores manterem os animais. Seis estados exportam tanto espécies marinhas quanto de água doce, 2 exportam somente espécies água doce e 1 somente marinho (IBAMA 2013a). Entretanto, a coleta ocorre também em outros estados que transportam os animais até os locais dos atacadistas. A região brasileira que apresenta as maiores quantidades de peixes ornamentais marinhos exportados é a região Nordeste, sendo o estado do Ceará o que possui o maior volume de exportação, respondendo por 55,1% da quantidade total exportada. Para as espécies de água doce, a região que possui o maior volume de exportação é a Norte, sendo que o estado do Amazonas responde por 93,2% das exportações.

A desatualização dos dados no site governamental do IBAMA dificulta a gestão da atividade pesqueira, a pesquisa e a informação à sociedade. Além disso, não é informado se os peixes exportados são provenientes da pesca ou de atividades de aquicultura o que impede que se dimensionem aspectos relativos à conservação destas espécies.

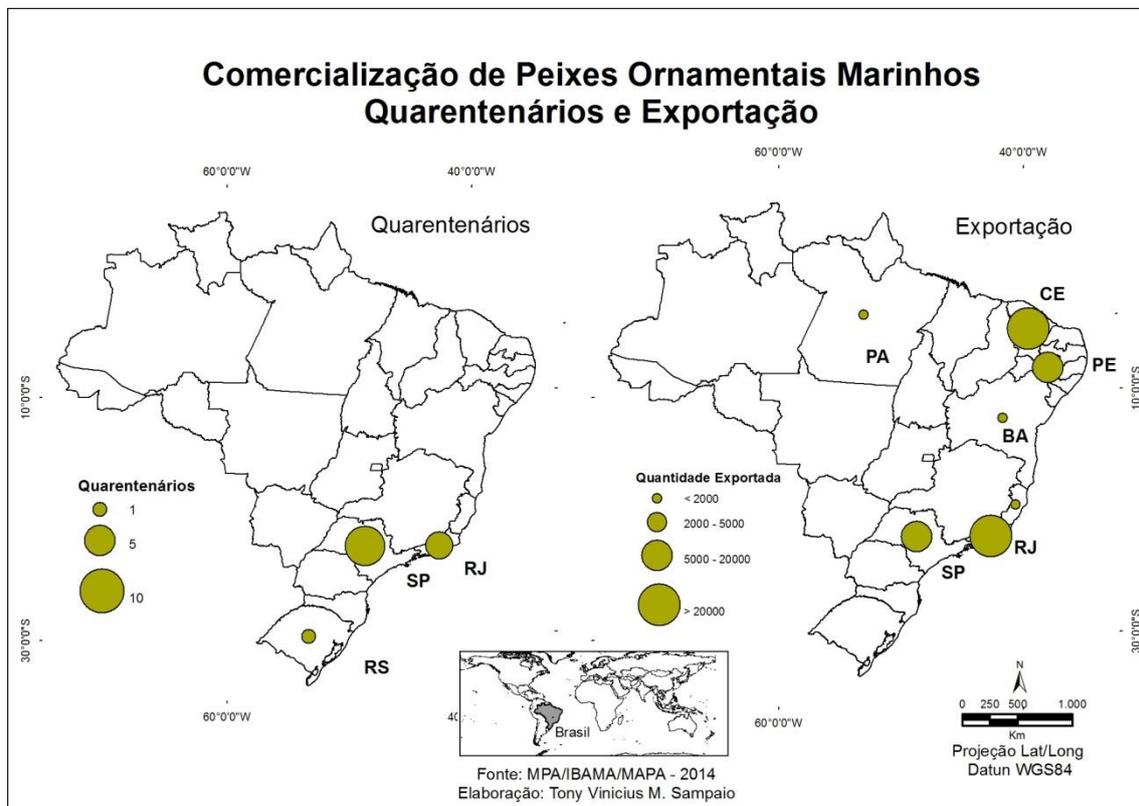


Figura 1.1: Localização dos quarentenários no Brasil e volume de peixes ornamentais marinhos exportados

Para espécies marinhas é mais comum lojas brasileiras venderem espécies ornamentais não-nativas. A principal alegação dos lojistas para explicar o fato é a fiscalização ambiental ser muito mais exigente quando se trata de animais da fauna brasileira. No entanto, em função da possibilidade de introdução e disseminação de agentes patogênicos ou de bioinvasão, essa relativa facilidade para adquirir espécies não nativas de peixes ornamentais pode colocar em risco a integridade das espécies e dos próprios ecossistemas brasileiros.

De acordo com a estrutura político-administrativa no Brasil a realização da Quarentena e da Análise de Risco para PO, está relacionada a três ministérios com suas atribuições resumidamente descritas na (IBAMA 2013b;

MAPA 2013b; MPA 2013b). No entanto a quarentena para PO no Brasil não é realizada por órgãos oficiais do governo, mas em estabelecimentos credenciados pelos órgãos federais. Existe uma estação quarentenária do governo localizada no município de Cananéia, estado de São Paulo, que foi estruturada pelo MAPA, entretanto a mesma não está apta a receber peixes (MAPA 2013c). O principal objetivo do quarentenário oficial é a proteção e preservação do patrimônio pecuário brasileiro e, em função disto, a estação está apta a receber bovinos, bubalinos, suínos e aves. O objetivo inicial do quarentenário oficial era realizar a quarentena em animais que seriam exportados e posteriormente o procedimento passou a ser realizado também para a importação (MAPA 2013a).



Figura 1.2: Ministérios relacionados a IRA e quarentena no Brasil e suas atribuições.

Para peixes os quarentenários credenciados no Brasil estão vinculados ao MAPA e ao MPA (MPA 2013a). Atualmente existem 13 quarentenários credenciados para importação de PO, sendo 8 no estado de São Paulo, 4 no Rio de Janeiro e 1 no Rio Grande do Sul (MPA 2013a). Ou seja, a região Sudeste abriga 92,3% dos quarentenários disponíveis no País sendo também a região que concentra os maiores mercados consumidores. Estes quarentenários são estruturados e mantidos pelos comerciantes que revendem estes animais no varejo ou no atacado para o restante do País. Informações obtidas junto a estes estabelecimentos evidenciam que os órgãos governamentais federais responsáveis pela quarentena delegam aos estabelecimentos comerciais a realização da mesma, porém falta suporte

técnico e operacional para o exercício da atividade. Foi mencionado como uma das principais dificuldades a demora em liberar a carga nos aeroportos, o que sujeita os animais a condições insalubres.

Fica evidente que o Brasil possui regiões distintas que concentram a exportação e a importação de POM. Além disso, em função da dimensão territorial do Brasil, os peixes que são exportados ou importados percorrem grandes distâncias ao longo da cadeia produtiva. Para organismos vivos este fato é agravado no Brasil pela burocracia, falta de interação entre os órgãos governamentais e falta de estrutura.

1.5 CONCLUSÃO

No Brasil as normas relativas à realização da quarentena na comercialização de peixes ornamentais são provenientes de órgãos ministeriais diferentes o que dificulta seu entendimento e aplicação. Além disso, existe uma desconexão de informações entre os órgãos governamentais, os responsáveis técnicos pelos quarentenários e o que está disponível na literatura científica.

Dentre as principais discrepâncias observadas está o tempo mínimo de quarentena exigido pela legislação brasileira que é muito inferior ao que é preconizado pelos livros técnicos. O vazio sanitário exigido pela legislação e a separação dos animais por espécie são incompatíveis com a manutenção de aquários marinhos e com os próprios aspectos biológicos dos peixes.

Apesar da importância da quarentena para a comercialização de peixes ornamentais, no Brasil a execução do procedimento apresenta falhas tanto legislativas quanto estruturais no que diz respeito à atuação do governo. Tal fato coloca em risco as populações selvagens e também se torna uma barreira ao desenvolvimento econômico da atividade.

Aceitar uma análise qualitativa com a justificativa da ausência de dados ecológicos não é o melhor caminho para a conservação dos POM. As políticas públicas devem estimular e exigir a geração de dados robustos e quantitativos, de modo que a ARI possa ser aplicada de forma segura, e o princípio da precaução adequadamente empregado.

Agradecimentos

Aos responsáveis técnicos dos quarentenários que forneceram as informações.

REFERÊNCIAS (CAPÍTULO 1)

(2013). Protozoal Ectoparasites (Ciliated and Flagellated). Clinical Veterinary Advisor. Saint Louis, W.B. Saunders: 33-34.

Ackermann, G. E. and B. H. Paw (2003). "Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders." Front Biosci**8**: d1227-1253.

Antunes, P. B., Ed. (2012). Direito Ambiental. São Paulo, Atlas.

Bartley, D. M., M. G. Bondad-Reantaso and R. P. Subasinghe (2006). "A risk analysis framework for aquatic animal health management in marine stock enhancement programmes." Fisheries Research**80**: 28-36.

Bender, M. G., S. R. Floeter, F. P. Mayer, D. A. Vila-Nova, G. O. Longo, N. Hanazaki, A. Carvalho-Filho and C. E. L. Ferreira (2013). "Biological attributes and major threats as predictors of the vulnerability of species: a case study with Brazilian reef fishes." Oryx**47**(02): 259-265.

Bernoth, E.-M. and M. S. J. Crane (1995). "Viral diseases of aquarium fish." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**4**(2): 103-110.

Brasil (1988). Constituição da República Federativa do Brasil.

Brier, J. W. (1992). "Emerging problems in seafood-borne parasitic zoonoses: Jeffrey W. Brier summarizes reports presented at the First International Conference on Foodborne Parasitic Zoonoses, Chiang Mai, Thailand." Food Control**3**(1): 2-7.

Bui, T. M., N. T. Phuong, G. H. Nguyen and S. S. De Silva (2013). "Fry and fingerling transportation in the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, farming sector, Mekong Delta, Vietnam: A pivotal link in the production chain." Aquaculture**388–391**(0): 70-75.

Canotilho, J. J. G. and J. R. M. Leite (2011). Direito Constitucional Ambiental Brasileiro. São Paulo, Saraiva.

Chong, V. C., P. K. Y. Lee and C. M. Lau (2010). "Diversity, extinction risk and conservation of Malaysian fishes." Journal of Fish Biology**76**: 2009-2066.

Farley, C. A. (1992). Mass mortalities and infectious lethal diseases in bivalve molluscs and associations with geographic transfers of populations. Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems. A. Rosenfield, Mann, R., University of Maryland, College Park: 139–154.

Farrell, A. P., S. Tang, M. Nomura and C. J. Brauner (2010). "Toward Improved Public Confidence in Farmed Fish: A Canadian Perspective on Fish Welfare

during Marine Transport." Journal of the World Aquaculture Society**41**(2): 225-239.

Fernandes, R. G., L.C.; Agostinho, A. A. (2003). "Pesque e pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas?" Acta Scientiarum: Biological Sciences**25**(1): 115-120.

Figueiredo H.C. P, C. E. A. P., Delphino M.K.V.C, Blume L.R, Machado D.P, Oliveira P.H.S. (2012). Análise de Risco de Importação: Metodologia Básica. MPA. Brasília.

Fiorillo, C. A. P., Ed. (2012). Curso de direito ambiental brasileiro. São Paulo, Saraiva.

Ganzhorn, J. R., J.S.; Fryer, J.L. (1992). Dissemination of microbial pathogens through introductions and transfers of finfish. Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems. A. M. Rosenfield, R., University of Maryland: 175–192.

Gasparini, J. L., S. R. Floeter, C. E. L. Ferreira and I. Sazima (2005). "Marine Ornamental Trade in Brazil." Biodiversity and Conservation**14**: 2883-2899.

González-Laxe, F. (2005). "The precautionary principle in fisheries management." Marine Policy**29**(6): 495-505.

Hadfield, C. A., B. R. Whitaker and L. A. Clayton (2007). "Emergency and Critical Care of Fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**10**(2): 647-675.

Harms, C. A. (1996). "Treatments for parasitic diseases of aquarium and ornamental fish." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**5**(2): 54-63.

Howarth, W. (2008). "The Interpretation of 'Precaution' in the European Community Common Fisheries Policy." Journal of Environmental Law**20**(2): 213-244.

IBAMA (2008). Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariofilia. . IBAMA.

IBAMA (2008). Instrução Normativa Nº 202, Diário Oficial da União.

IBAMA (2011). Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de Cavalos-Marinheiros do Brasil. IBAMA. Brasília.

IBAMA. (2013). "Estatísticas de exportação de peixes de águas marinhas 2006 e 2007." Retrieved 29/04/2013, 2013.

IBAMA. (2013). "Exportação de peixes Ornamentais de Águas Marinhas - Perguntas frequentes - IBAMA." 2013, from <http://www.ibama.gov.br/perguntas-frequentes/exportacao-de-peixes-ornamentais-de-aguas-marinhas>.

Jones, B. and M. C. Tensen (2009). "RSPCA Australia Scientific Seminar 2008 Animals in transit: The journey ahead." Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**4**(4): 145-147.

Keller, R. P., D. M. Lodge and D. C. Finnoff (2007). "Risk assessment for invasive species produces net bioeconomic benefits." Proceedings of the National Academy of Sciences**104**(1): 203-207.

Kent, M. L., S. W. Feist, C. Harper, S. Hoogstraten-Miller, J. M. Law, J. M. Sánchez-Morgado, R. L. Tanguay, G. E. Sanders, J. M. Spitsbergen and C. M. Whipps (2009). "Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**149**(2): 240-248.

King, H. R. (2009). "Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania." Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**4**(4): 163-168.

Lehane, L. (1993). "Risks of fish imports--the 1993 aquatic animal quarantine review." Aust Vet J**70**(6): 202-204.

Lewbart, G. A. (2001). "Bacteria and ornamental fish." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**10**(1): 48-56.

Lightner, D. V. R., R.M.; Bell, T.A.; Thurman, R.B. (1992). Geographic dispersion of the viruses IHNV, MBV and HPV as a consequence of transfers and introductions of penaeid shrimp to new regions for aquaculture purposes. Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems. A. M. Rosenfield, R. , University of Maryland, College Park: 155-173.

Lodge, D. M., S. Williams, H. J. MacIsaac, K. R. Hayes, B. Leung, S. Reichard, R. N. Mack, P. B. Moyle, M. Smith, D. A. Andow, J. T. Carlton and A. McMichael (2006). "Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management." Ecological Applications**16**(6): 2035-2054.

Longo, G. O. and S. R. Floeter (2012). "Comparison of remote video and diver's direct observations to quantify reef fishes feeding on benthos in coral and rocky reefs." J Fish Biol**81**(5): 1773-1780.

Luiz, O. J., S. R. Floeter, L. A. Rocha and C. E. L. Ferreira (2013). "Perspectives for the lionfish invasion in the South Atlantic: Are Brazilian reefs protected by the currents?" Marine Ecology Progress Series**485**: 1-7.

Luiz, O. J., J. S. Madin, D. R. Robertson, L. A. Rocha, P. Wirtz and S. R. Floeter (2011). "Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.

Machado, P. A. L., Ed. (2012). Direito Ambiental Brasileiro. São Paulo, Malheiros Editores.

MAPA (2008). Instrução Normativa Nº 18. Brasil, Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura.

MAPA. (2013). "Estação quarentenária de Cananéia - EQC." Retrieved 2013/04/11, from <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/transito>.

MAPA. (2013). "Ministério - MAPA." 2013, from www.agricultura.gov.br/ministerio.

MAPA. (2013). "Trânsito - MAPA." 2013, from <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/transito>.

Miller-Jr, G. T. (2008). Ciência Ambiental. São Paulo, Cengage Learning.

Monteiro-Neto, C., F. E. A. Cunha, M. C. Nottingham, M. E. Araújo, I. L. Rosa and G. M. L. Barros (2003). "Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceara' State, northeast Brazil." Biodiversity and Conservation**12**: 1287-1295.

Moraes, A. (2012). Direito Constitucional. São Paulo, Editora Atlas.

MPA (2010). INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, Diário Oficial da União.

MPA. (2013). "Lista de quarentenários credenciados para a importação de organismos aquáticos para fins ornamentais " Retrieved 2013/04/11, from http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Monitoramento_e_Controlo/Lista%20Quarenten%C3%A1rios%2005.04.2013.pdf.

MPA. (2013). "Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA - Competências." Retrieved 17/01/2013, 2013, from <http://www.mpa.gov.br/index.php/ministeriomp/competencias>.

Murphy, K. M. and G. A. Lewbart (1995). "Aquarium fish dermatologic diseases." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**4**(4): 220-233.

Oidtmann, B. C., C. N. Crane, M. A. Thrush, B. J. Hill and E. J. Peeler (2011). "Ranking freshwater fish farms for the risk of pathogen introduction and spread." Preventive Veterinary Medicine**102**(4): 329-340.

OIE, W. O. f. A. H.-. (2013). "Aquatic Animal Health Code." Retrieved 23/04/2013, from http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_sommaire.htm.

OIE, W. O. f. A. H.-. (2013). "Veterinary legislation." Retrieved march, 29, 2013, from <http://www.oie.int/en/support-to-oie-members/veterinary-legislation/>.

Peeler, E. J., A. G. Murray, A. Thebault, E. Brun, A. Giovaninni and M. A. Thrush (2007). "The application of risk analysis in aquatic animal health management." Preventive Veterinary Medicine**81**(1-3): 3-20.

Petney, T. N. and H. Taraschewski (2011). 3.12 - Waterborne Parasitic Diseases: Hydrology, Regional Development, and Control. Treatise on Water Science. W. Editor-in-Chief: Peter. Oxford, Elsevier: 303-366.

Petty, B. D. and R. Francis-Floyd (2004). "Pet fish care and husbandry." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**7**(2): 397-419.

Proelss, A. and K. Houghton (2012). "The EU Common Fisheries Policy in light of the precautionary principle." Ocean & Coastal Management**70**(0): 22-30.

Quimbayo, J. P., S. R. Floeter, R. Noguchi, C. A. Rangel, J. L. Gasparini, C. L. S. Sampaio, C. E. L. Ferreira and L. A. Rocha (2012). "Cleaning mutualism in Santa Luzia (Cape Verde Archipelago) and São Tomé Islands, Tropical Eastern Atlantic." Marine Biodiversity Records**5**: null-null.

Reynoso, F. L., M. Castañeda-Chávez, J. E. Zamora-Castro, G. Hernández-Zárate, M. A. Ramírez-Barragán and E. Solís-Morán (2012). "La acuariofilia de especies ornamentales marinas: un mercado de retos y oportunidades." Latin American Journal of Aquatic Research**40**(1): 12-21.

Roberts, H. and B. S. Palmeiro (2008). "Toxicology of Aquarium Fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**11**(2): 359-374.

Roberts, H. E., B. Palmeiro and E. S. Weber Iii (2009). "Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**12**(3): 609-638.

Roberts, H. E. and S. A. Smith (2011). "Disorders of the Respiratory System in Pet and Ornamental Fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**14**(2): 179-206.

Sales, J. and G. P. J. Janssens (2003). "Nutrient requirements of ornamental fish." Aquatic Living Resources**16**(6): 533-540.

Sampaio, F. D. F. and A. Ostrensky (2013). "Brazilian environmental legislation as tool to conserve marine ornamental fish." Marine Policy**42**(0): 280-285.

Sánchez, L. H. (2008). Avaliação de Impacto Ambiental: conceitos e métodos. São Paulo, Oficina de Textos.

Scholz, T. (1999). "Parasites in cultured and feral fish." Veterinary Parasitology**84**(3-4): 317-335.

Simberloff, D. (2005). "The politics of assessing risk for biological invasions: the USA as a case study." Trends in Ecology & Evolution**20**(5): 216-222.

Simonovic, P., A. Tomic, M. Vassilev, A. Apostolou, D. Mrdak, M. Ristovska, V. Kostov, V. Nikolic, D. Škraba, L. Vilizzi and G. H. Copp (2013). Risk assessment of non-native fishes in the Balkans Region using FISK, the invasiveness screening tool for non-native freshwater fishes.

Smith, S. A. (1997). "Mycobacterial infections in pet fish." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**6**(1): 40-45.

Stoskopf, M. K. (2002). Chapter 20 - Biology and Health of Laboratory Fishes. Laboratory Animal Medicine (Second Edition). G. F. James, C. A. Lynn, M. L.

Franklin, L. C. A. F. M. L. Fred W. QuimbyA2 - James G. Fox and W. Q. Fred. Burlington, Academic Press: 885-907.

Thomas, J. M. and S. J. Callan (2010). Economia Ambiental - Fundamentos, Políticas e Aplicações. São Paulo, Cengage Learning.

Thomas, V. G., C. Vasarhelyi and A. J. Niimi (2009). "Legislation and the capacity for rapid-response management of nonindigenous species of fish in contiguous waters of Canada and the USA." Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**19**: 354-364.

Wan Norhana, M. N., G. A. Dykes, B. Padilah, A. A. Ahmad Hazizi and A. R. Masazurah (2012). "Determination of quarantine period in African catfish (*Clarias gariepinus*) fed with pig (*Sus sp.*) offal to assure compliance with halal standards." Food Chemistry**135**(3): 1268-1272.

Weber Iii, E. S. (2011). "Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception?" Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**14**(1): 21-32.

Whittington, R. J. and R. Chong (2007). "Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies." Preventive Veterinary Medicine**81**: 92-116.

Whittington, R. J. and R. Chong (2007). "Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies." Preventive Veterinary Medicine**81**(1-3): 92-116.

Wood, E. M., Ed. (2001). Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies.UK, Marine Conservation Society.

**CAPÍTULO 2: ESTRESSE DO TRANSPORTE EM PEIXES:
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E APLICAÇÃO COMERCIAL²**

²Capítulo formatado segundo as normas da revista Reviews in Aquaculture.

RESUMO

Este trabalho apresenta análise da literatura sobre o estresse do transporte em peixes, com abordagem ecofisiológica e proposta de aplicação comercial. Foi feita caracterização de: 1) processos de transporte mais utilizados, 2) visão ecofisiológica das respostas dos peixes, analisando a água de transporte e os desafios fisiológicos que sua deterioração impõe aos peixes, 3) alterações fisiológicas decorrentes do transporte e associação à classificação das respostas primárias, secundárias e terciárias ao estresse, e 4) sugestões de aplicação comercial deste conhecimento. O transporte foi classificado em transporte curto (até 8 horas) ou transporte longo (acima de 8 horas). As alterações ambientais e em consequência, fisiológicas, durante o transporte foram relacionadas aos conceitos de homeostase e alostase (carga e sobrecarga alostática). As principais medidas no sentido de minimização do estresse do transporte de peixes vivos se relacionam com as tentativas de redução no consumo de oxigênio ou prevenção da hipóxia ambiental, e/ou da geração de amônia, e/ou da acidificação da água: 1) adição de atmosfera de O₂ puro, 2) jejum pré-transporte, 3) salinidade isosmótica, 4) redução na temperatura, 5) utilização de anestésicos. Para alcançar este conjunto de dados necessários, deve-se levar em conta que à medida em que forem utilizadas metodologias com menores custos e maior praticidade mais valores de referência serão disponibilizados em relação aos marcadores ambientais e fisiológicos, para o maior número de espécies relevantes comercialmente.

Palavras-chave: transporte de peixes vivos; alterações fisiológicas; medidas mitigadoras

2.1 INTRODUÇÃO

O estado de saúde de animais aquáticos como peixes é muito influenciado pelas condições ambientais, mais do que o de animais terrestres, como aves e mamíferos. Estressores antropogênicos, como o manuseio e o transporte, causam estresse agudo e/ou crônico nestes animais (Meinelt et al. 2008). O estresse pode acarretar doenças ou a morte do animal (Bernoth and Crane 1995; Murphy and Lewbart 1995). A necessidade de transportar peixes vivos é decorrente de situações variadas: alimentação humana (Marçalo et al. 2008; Reglero et al. 2013), transporte de alevinos criados em cativeiro para o local de crescimento, engorda ou recreação humana, transporte de espécimes selvagens para criação em aquicultura, soltura de juvenis em programas de repovoamento, aquários públicos (Harmon 2009), ornamentação e pesquisa (Corrêa et al. 2014). Em muitos setores de piscicultura os peixes são transportados vivos, por exemplo, para repovoamento, engorda, aquariofilia (Acerete et al. 2004; Brinn et al. 2012; Carneiro and Urbinati 2002; Iversen et al. 1998). O cultivo de peixes implica em seu transporte para diversas finalidades, e por períodos de tempo variáveis (Stieglitz et al. 2012). Por isso, o estabelecimento de protocolos adequados de procedimentos menos estressantes aos peixes durante o transporte é importante para os aquicultores, implicando em provável aumento de rentabilidade no seu negócio (Gomes et al. 2003). Estudos com o objetivo de caracterizar a resposta ao estresse em peixes comerciais são relevantes para viabilizar a aquicultura enquanto atividade econômica (Pottinger and Carrick 1999). Portanto, critérios objetivos para avaliar a saúde e o bem-estar destes animais são cada vez mais necessários (Varsamos et al. 2006). Para que a piscicultura se desenvolva como atividade sustentável, é necessário que se consiga aumentar a produção e reduzir as despesas, a fim de se obter aumento no lucro (Baldisserotto 2009).

A maioria dos trabalhos sobre estresse do transporte em peixes trata de teleósteos de água doce (Skomal and Mandelman 2012). Para peixes marinhos, tanto teleósteos quanto elasmobrânquios, as pesquisas são muito menos numerosas, uma vez que grande parte das espécies marinhas destinadas à alimentação e à ornamentação é proveniente da pesca e não de

cultivo, tornando mais difícil sua obtenção para estudos fisiológicos. Como será exposto abaixo, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas no entendimento das respostas fisiológicas de peixes ao estresse decorrente do transporte, principalmente para espécies marinhas que ainda não se tem tecnologia de produção em cativeiro e que precisam ser transportadas vivas.

Como exemplo da abordagem comumente utilizada, os teleósteos mais estudados quanto ao estresse associado ao transporte são os salmonídeos. Isto é consequência da sua importância econômica e de conservação especialmente em países do Hemisfério Norte, e o grande número de espécies utilizadas na aquicultura (Acerete et al. 2004; Wells and Pankhurst 1999). Contudo, mesmo para as espécies mais pesquisadas, ainda restam muitas lacunas relativas ao estresse do transporte. Um exemplo é que dentre as possibilidades para explicar a baixa taxa de recaptura do salmão do atlântico em um programa de repovoamento, os autores observaram mortalidade de juvenis desta espécie após sua reintrodução no ambiente, pois podem não ter tido tempo para se recuperar do estresse do manuseio e transporte (Iversen et al. 1998).

O objetivo deste trabalho é o de revisar a literatura sobre o estresse do transporte em peixes teleósteos, caracterizando: 1) os processos de transporte mais utilizados, 2) a abordagem ecofisiológica para as respostas dos peixes, analisando a água de transporte e os desafios fisiológicos que sua deterioração impõe aos peixes, 3) as alterações fisiológicas decorrentes do transporte e 4) sugestões de aplicação comercial deste conhecimento.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE NOS PROCESSOS DE TRANSPORTE DE TELEÓSTEOS VIVOS

O que as várias situações de transporte de peixes vivos têm em comum é o fato de que, para os peixes, o processo de transporte acarreta estresse. Quanto às diferenças mais comumente encontradas no processo, pode-se destacar o tipo de embalagem e a densidade para o transporte, que são determinadas pelo tamanho e comportamento dos peixes e pela distância a ser percorrida. Peixes podem ser transportados em sacolas plásticas, como no

caso de ornamentais e alevinos para piscicultura, ou também podem ser transportados em tanques, e.g. peixes para aquários públicos (Harmon 2009) ou espécies marinhas para engorda (Marçalo et al. 2008), e ainda em gaiolas dentro do próprio ambiente no caso de atuns (*Thunnus thynnus*) (Reglero et al. 2013). A densidade durante o transporte também é um fator relevante, pois quanto maior a densidade, menor o custo. Porém, se este aumento na densidade acarretar mortalidade ou um grau de estresse que comprometa a saúde dos peixes, a alta densidade passa a não ser economicamente viável.

Os peixes ornamentais merecem especial atenção em função das peculiaridades do seu transporte: as enormes distâncias percorridas globalmente no seu comércio, e o fato de terem que ser transportados individualmente. Como exemplo podemos citar, dentre as famílias de peixes marinhos mais comercializadas mundialmente, os cavalos-marinhos (família Syngnathidae, Ordem Syngnathiformes), em função não só da utilização para aquariofilia, como também para a medicina tradicional chinesa (Vincent et al. 2011; Wood 2001). Para a indústria da aquariofilia, o transporte de animais vivos com mínimo de estresse e efeitos adversos é essencial (Wright et al. 2007).

Para efeito de ordenar e sintetizar as informações disponíveis na literatura sobre transporte de teleósteos vivos, foram separados os transportes considerando os que têm duração igual ou inferior a 8 horas (transportes curtos) e aqueles com duração superior a 8 horas (transportes longos) (Stieglitz et al. 2012). A Figura 1 ilustra a complexidade da caracterização dos tipos de transporte de peixes em função do seu objetivo. O comércio entre países ou entre regiões de países de grande área envolverá provavelmente transporte aéreo, o que prolonga a duração do transporte.

Em função da alta diversidade de espécies, fase do ciclo de vida, ambiente e objetivo de criação, não é possível estabelecer um protocolo padrão de transporte de peixes vivos que contemple toda esta gama de situações. Portanto, quanto mais dados básicos forem levantados para compreender a fisiologia dos peixes durante o procedimento de transporte, mais adequado será o manejo das diversas espécies de peixes transportadas comercialmente, uma vez que dificilmente se podem encurtar estes tempos,

dados o crescimento inclusive das atividades comerciais envolvendo peixes, mundialmente.

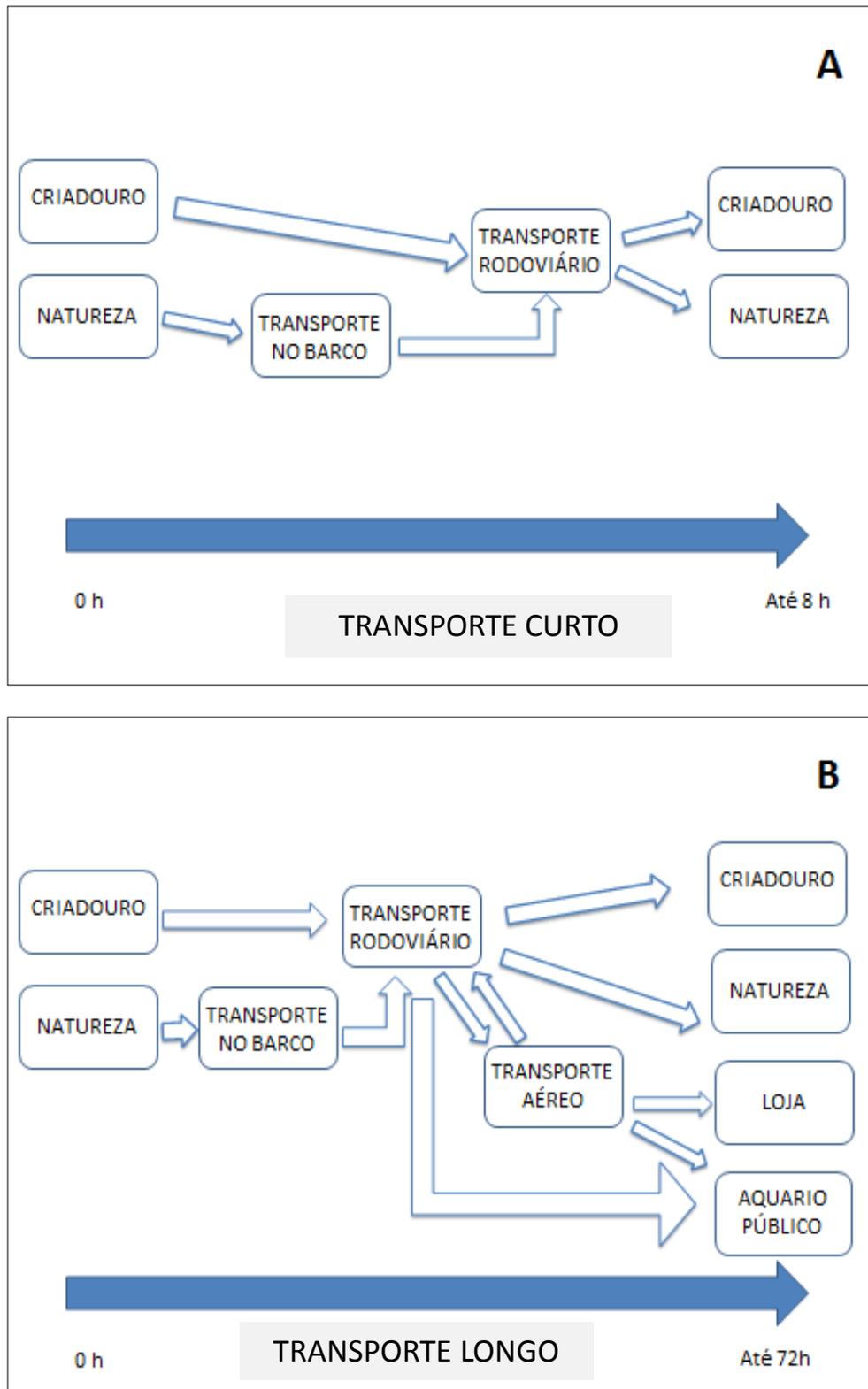


Figura 2.1 - Esquema das diferentes possibilidades de transporte de peixes vivos, diferenciando os transportes curtos (A) dos longos (B). O transporte longo em geral envolve transporte rodoviário cobrindo distâncias maiores, e/ou também transporte aéreo.

2.2.1 TRANSPORTES CURTOS

Muito frequentes na piscicultura, os transportes curtos, de até 8 horas de duração, ocorrem quando o criadouro localiza-se próximo do local de crescimento, engorda ou atividade recreativa, como no caso dos “pesque-pagues”. Em geral o transporte é somente rodoviário e os peixes são transportados em sacolas plásticas fechadas. No Brasil, este é um tipo de transporte com vários estudos publicados sobre espécies relevantes para aquicultura. Por exemplo, encontram-se estudos sobre o matrinxã (*Brycon cephalus* e *Brycon amazonicus*) juvenil (Abreu et al. 2008; Urbinati et al. 2004) e adulto (Carneiro and Urbinati 2002; Urbinati and Carneiro 2006), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Feitosa et al. 2013) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (Parodi et al. 2014; Zeppenfeld et al. 2014). Em outros países, estudos semelhantes são encontrados para a perca (*Perca fluviatilis*, na Espanha) (Acerete et al. 2004) e para o bagre africano (*Clarias gariepinus*, na Holanda) (Manuel et al. 2014).

Outra situação que também pode demandar transporte curto (Figura 1A) é quando há necessidade de retirar peixes na natureza para engorda ou para tentativa de reprodução em programas de repovoamento (Marçalo et al. 2008; Oyoo-Okoth et al. 2011). Este procedimento é especialmente comum com espécies para as quais ainda não se tem tecnologia para produção de alevinos em laboratório (Marçalo et al. 2008). Para esta situação ocorre geralmente o transporte em barcos antes do transporte rodoviário. Transportes curtos também são comuns quando se tem a produção de alevinos para programas de repovoamento; os alevinos foram produzidos em laboratório e precisam ser soltos no ambiente natural (Iversen et al. 1998).

2.2.2 TRANSPORTES LONGOS

O aumento da demanda por juvenis em locais de engorda e crescimento acarretou a demanda de transporte destes animais por longos períodos de tempo quando os criadouros são distantes. Este é o caso do tambaqui (*Colossoma macropomum*) na região Amazônica (Gomes et al. 2003), do robalo (*Centropomus pararellus*) na região sudeste do Brasil (Tondolo et al.

2013), também do peixe marinho cobia (*Rachycentron canadum*) nos Estados Unidos (Stieglitz et al. 2012), ou ainda a perca gigante (*Lates calcarifer*) na Austrália (Paterson et al. 2003). Em todos estes casos os peixes saem do criadouro e são transportados por rodovias.

Em programas de repovoamento, como no caso do tambaqui na região Amazônica, parte do transporte é terrestre e depois ocorre o transporte em barcos até o local de soltura, em geral XX horas após a captura. (Gomes et al. 2003). Os transportes mais longos e mais complexos são os de peixes ornamentais destinados à exportação. A origem destes animais pode ser de criadouros (Dhanasiri et al. 2013a; Wright et al. 2007) ou da natureza (Brinn et al. 2012; Gomes et al. 2009), tanto para espécies de água doce quanto marinhas. Este transporte envolve em alguns casos a embarcação, o transporte rodoviário e aéreo até chegar ao destino final (Figura 1B). Quando estes animais são provenientes da natureza, estima-se que a duração do transporte até o destino final, muitas vezes em outro país, fique em torno de 50 a 70 horas, como é o caso da produção exportada das Filipinas para os Estados Unidos que pode levar até 50 horas dependendo da cidade do destino final (Bruckner 2005).

2.3 ECOFISIOLOGIA: A ÁGUA DE TRANSPORTE E OS DESAFIOS FISIOLÓGICOS AOS PEIXES

Ecofisiologia pode ser definida como uma sub-disciplina da Ecologia que estuda as adaptações e limitações bioquímicas, fisiológicas e mecânicas de plantas e animais aos seus ambientes físicos e químicos (Krebs 2009). Podemos então abordar os desafios fisiológicos do transporte de peixes vivos sob a óptica da ecofisiologia, analisando o ambiente (=água do transporte) e suas alterações, e as respostas dos peixes. O transporte de peixes, tanto em sistemas abertos (caixas) quanto fechados (embalagens plásticas), e dependendo do tempo de duração, acarreta a alteração do ambiente aquático e potencial perturbação da estabilidade do meio interno do animal. O princípio da constância do meio interno - denominado homeostase - se caracteriza pelo balanceamento dos processos fisiológicos que mantêm a estabilidade de um animal e restauram o estado normal quando ele é perturbado (Hickman-Jr et al.

2004). Sem a manutenção da homeostase por mecanismos regulatórios, as alterações ambientais que atuam sobre o exterior de um animal acarretam mudanças no meio interno, e em consequência mudanças no meio intracelular, como ocorre em organismos conformadores (Randall et al. 2000). Ou seja, quando o meio no qual um organismo está inserido sofre alterações, mecanismos fisiológicos entram em ação para estabilizar o meio interno deste organismo (Hickman-Jr et al. 2004). Complexos mecanismos fisiológicos de vários órgãos são envolvidos e permitem a sobrevivência em ambientes estressantes e variados, com a manutenção da estabilidade do meio interno, especialmente nos vertebrados (Randall et al. 2000). A faixa de variação no parâmetro ambiental em que o animal mantém a sua estabilidade e interna corresponde exatamente à definição de homeostasia. Valores acima ou abaixo da faixa de estabilidade significam perda da homeostasia. Porém, independente da existência de mecanismos regulatórios para controlar a estabilidade do meio interno, valores intermediários do parâmetro ambiental para o qual um animal conforma podem também representar área de homeostasia, de maior conforto ambiental (Figura 2.2).

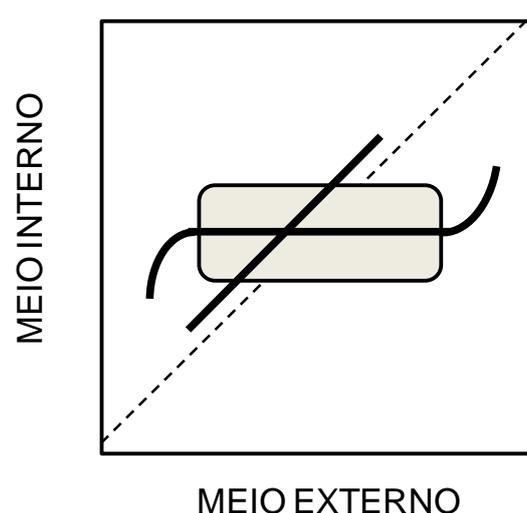


Figura 2.2. Resposta de conformação ou regulação interna diante de variação em parâmetro ambiental (meio externo). A área cinza claro no centro da Figura indica a faixa de “preferência” dos animais quanto ao parâmetro ambiental em questão. Para um animal regulador para este parâmetro, a área envolve a região de estabilidade/homeostasia, com perda do controle e aumento no valor interno, diante de aumentos no parâmetro ambiental acima de valor limite superior de regulação, e queda no valor interno, diante de queda no parâmetro ambiental abaixo do valor limite inferior de regulação. Para um animal conformador para este parâmetro, envolve a faixa intermediária de variação no parâmetro, de maior tolerância e conforto para o animal. A linha tracejada representa a igualdade entre o meio interno e o meio externo.

A manutenção da estabilidade do meio interno ou homeostasia é de fato mais evidente e estrita nos vertebrados do que nos invertebrados, devido ao aumento de complexidade dos vertebrados (Hill et al. 2008; Schmidt-Nielsen 1996; Willmer et al. 2005). Em geral é possível distinguir a resposta de manutenção da estabilidade do meio interno diante de variação ambiental, como resposta reguladora e de controle, com gasto de energia metabólica (sem considerar mecanismos/comportamentos de esquiva). Alternativamente, verifica-se a resposta conformadora, de economia metabólica, de ausência de gradientes entre o meio interno e o externo, na qual o meio interno do animal acompanha com nenhum ou pequeno gradiente/distância, a linha de igualdade, ou seja, o meio externo (Figura 2.3A).

Para os peixes, a regulação mais clara do meio interno ocorre na osmolalidade do plasma, diante de variação de salinidade, ou mesmo quando estes sustentam gradientes de grande magnitude em água do mar ou água doce (Figura 3B). Nesta Figura fazemos confronto hipotético das respostas de peixes de ambientes estáveis com peixes de ambientes instáveis. Ambientes estáveis são marinhos abaixo da linha da maré baixa, ou de água doce, em rios perenes e caudalosos e com pequena variação ambiental ou diária. Ambientes instáveis, por outro lado, são aqueles estuarinos, ou marinhos de regiões de costões rochosos, com formação de poças de marés, ou ainda, riachos temporários ou rasos de água doce (Odum 2008; Willmer et al. 2005). Animais que habitam ambientes instáveis são em geral mais tolerantes a mudanças ambientais. Portanto, mais “euri-“: halinos, térmicos, óxicos, etc. Além disso, muitas vezes animais de ambientes estáveis, porém com mudança evolutiva recente no seu ambiente, apresentam “ainda” certa plasticidade fisiológica decorrente de sua ancestralidade recente em ambiente mais instável, por retenção de genes associados a esta plasticidade ambiental (Freire et al. 2008; Freire et al. 2013). A linha que representa a resposta na Figura 2.3B é uma simplificação da realidade, mas indica que peixes teleósteos marinhos estenohalinos hiporregulam em água do mar, e teleósteos dulcícolas hiperregulam em água doce. A linha tracejada no meio indica que os peixes de ambientes instáveis ou mesmo migradores serão provavelmente mais

eurihalinos, regulando nas salinidades mais diluídas do que a água do mar, ou mais concentradas do que a água doce (Marshall and Grosell 2006).

Contudo, peixes não regulam todos os parâmetros ambientais que podem potencialmente variar no seu meio externo, a água. Por exemplo, são ectotermos e peilotérmicos, e sua temperatura corporal acompanha a temperatura da água, dentro dos seus limites de tolerância, e da variação que encontram em seu habitat (Figura 2.3C). Da mesma forma como indicado acima para a osmolalidade plasmática, espera-se extensão da faixa de tolerância para temperaturas mais altas e/ou mais baixas, em animais de ambientes instáveis. A faixa tolerada depende obviamente do ambiente/latitude onde vive o animal. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao pH. Animais de respiração aquática livram-se rapidamente do CO_2 resultante do seu metabolismo aeróbico, e sua PCO_2 sanguínea é baixa. Com isso não apresentam o tampão bicarbonato e seu sangue tem baixa capacidade de tamponamento (Hill et al. 2008; Schmidt-Nielsen 1996; Willmer et al. 2005). Se o pH da água varia, sofrem desafio ácido-básico (Figura 2.3D). Também para o pH, pode-se esperar que peixes de ambientes mais instáveis tenham tolerância mais ampla a variações de pH. De forma interessante, deve-se considerar que, em ambientes de pequeno volume, como um saco plástico de transporte, ácido gerado pelo metabolismo do peixe pode acidificar a água (Paterson et al. 2003; Treasurer 2012). Quanto à disponibilidade de oxigênio na água, em geral a maior preocupação dos piscicultores ou comerciantes de peixes, diante de redução na PO_2 da água, gerando situação de hipóxia, os peixes podem regular até certo ponto seu consumo de O_2 . Contudo, abaixo de determinada PO_2 crítica, extremamente variável entre peixes de ambientes distintos, seu consumo de O_2 irá cair drasticamente, e a geração de ATP se dará por metabolismo anaeróbico, aumentando a carga ácida interna pela geração de lactato. Como indicado na Figura 2.3E, novamente espera-se que animais de ambientes instáveis consigam oxi-regular um pouco mais, mantendo o consumo de oxigênio mesmo com uma queda um pouco mais acentuada na PO_2 ambiental (Richards 2011). A outra grande preocupação dos comerciantes de peixes vivos em ambiente confinado, a amônia na água, pode de fato aumentar significativamente ao longo do tempo de transporte. Havendo

aumento na amônia na água, o peixe tem maior dificuldade em excretar a amônia que produz por seu metabolismo. Em consequência a concentração de amônia no plasma aumenta, gerando diversos prejuízos fisiológicos. A não ser que o peixe disponha de enzimas para síntese de ureia, sofrerá acúmulo de amônia extracelular (Figura 2.3F). De fato ocorre frequentemente síntese de ureia em espécies de regiões entre-marés (Souza-Bastos et al. 2014). Em suma, peixes em geral apresentam regulação osmótica, alguma regulação de oxigênio, e potencialmente de amônia, se tiverem o recurso de produzir ureia.

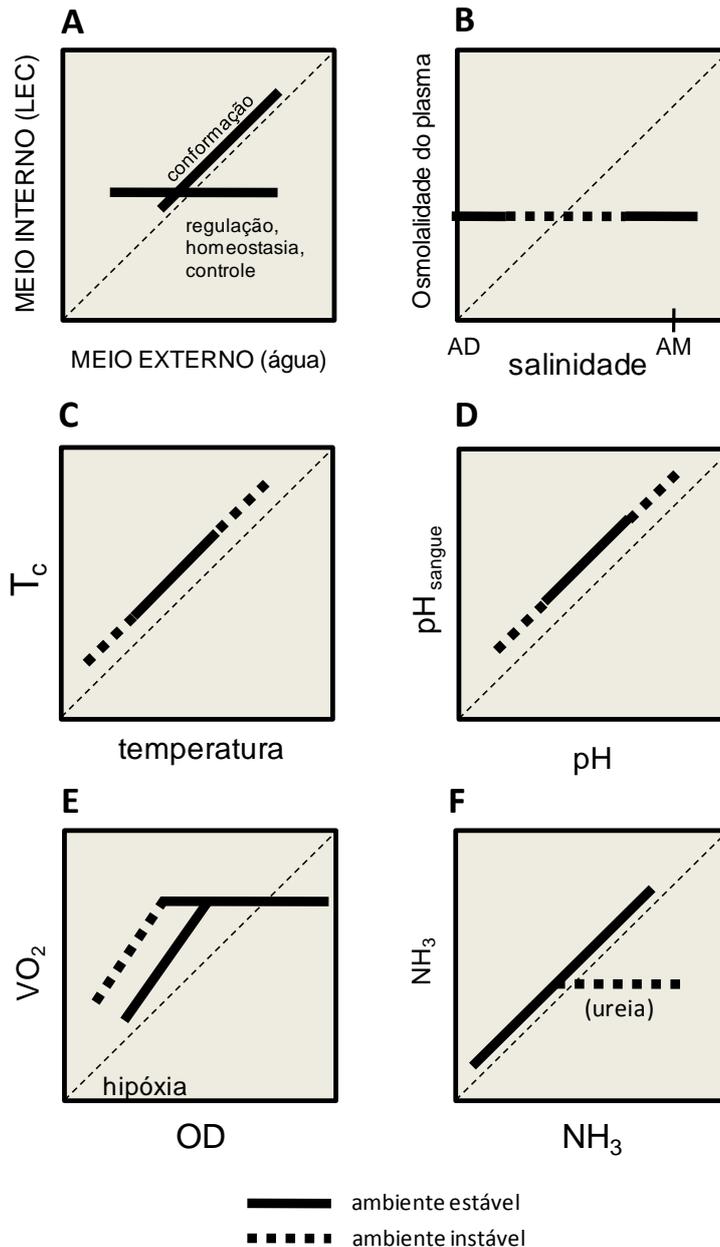


Figura 2.3. Formas como o meio interno (líquido extracelular) de peixes de ambiente estável (maior profundidade, sem efeitos de maré, ou água doce) e peixes de ambientes instáveis (marinhos ou estuarinos sujeitos a efeitos das marés ou de riachos rasos de água doce) responde a variações ambientais. A: definição de respostas conformadora e reguladora; a resposta reguladora reflete o conceito clássico de homeostasia, com controle e regulação; B: hipo-regulação em água do mar (AM) e hiper-regulação em água doce (AD), e capacidade de manutenção da estabilidade em salinidades intermediárias, para peixes eurihalinos, de ambiente instável; C: resposta conformadora típica em relação à temperatura (ectotermia e pecilotermia), mas extensão da tolerância em peixes de ambientes instáveis; D: mesma resposta conformadora em relação ao pH, pela baixa capacidade de tamponamento do sangue de peixes, mesma expectativa de extensão da tolerância em peixes de ambientes instáveis; E: reposta oxi-reguladora quando o oxigênio dissolvido (OD) é alto, com manutenção do consumo de oxigênio estável (VO_2); expectativa de maior capacidade de manter o consumo em hipóxias, em peixes de ambiente instável. Com maior queda do OD, redução no consumo (oxi-conformação); F: a amônia (NH_3) produzida pelo metabolismo do peixe é liberada para a água e vai se acumulando na água, especialmente em situação de volume reduzido do meio externo; em peixes de ambientes instáveis, muitas vezes esta situação é evitada pela síntese de ureia.

A partir do conceito de homeostase, foi definido que estresse pode ser caracterizado como um estado de ameaça a homeostase que pode ser reestabelecida por um conjunto complexo de respostas adaptativas. Este conceito foi escolhido com base em trabalhos de revisão que abordam o tema estresse em peixes (Barton 2002; Schulte 2014). Entender a relação entre a quebra da homeostase e o estresse em peixes é de vital importância uma vez que estes animais, quando mantidos em cativeiro, ou submetidos ao procedimento de transporte, estão sujeitos a estresse, ou desafio à sua homeostasia (Leong et al. 2009).

A utilização do termo homeostase tem sido frequente em artigos recentes que avaliam o estresse em peixes causado por agentes estressores variados. Por exemplo, o estresse proveniente no ambiente dos aquários, tais como flashes de máquinas fotográficas para a tilápia *Oreochromis mossambicus* (Leong et al. 2009) e mesmo o ruído dos equipamentos para o cavalo-marinho *Hippocampus erectus* (Anderson et al. 2011), foram ambos relacionados com a quebra da homeostase. Foi verificado para a espécie de salmão *Salmo salar* que o tipo selvagem mantém sua homeostase de forma mais eficaz, quando comparado aos tipos transgênico e triploide, em relação a 3 agentes estressores: manuseio, baixa disponibilidade de alimento e baixo oxigênio dissolvido (Cnaani et al. 2013). Em outro salmonídeo, *Oncorhynchus kisutch*, o estresse térmico agudo e da simulação de captura, evidenciou que os peixes menores recuperaram a homeostase osmorregulatória mais rapidamente (Clark et al. 2012). Para a espécie *Salvelinus fontinalis* verificou-se que a homeostase foi afetada pela queda no oxigênio e a alta densidade causando alterações na comunidade bacteriana do muco da pele (Boutin et al. 2013). A alta densidade também causou no arenque, *Clupea harengus*, a incapacidade de restabelecer a homeostase (Tenningen et al. 2012). A exposição sub-crônica aos efluentes de águas residuais municipais provocou na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, respostas secundárias ao estresse que podem comprometer sua homeostase (Ings et al. 2012).

Diante destas descrições de desafios e desvios da homeostase, mas com manutenção da vida do animal, e muitas vezes sua recuperação completa na chegada ao destino de transporte, percebe-se a necessidade de analisar os

estados alterados porém não letais, temporários, pelos quais os peixes passam durante seu processo de transporte.

2.3.1 O CONCEITO DA ALOSTASE E A FISIOLOGIA DOS PEIXES

O conceito complementar, que amplia a análise dos desafios fisiológicos sofridos pelos animais diante de variações ambientais, é o conceito de “alostase”. Alostase é o processo de atingir a estabilidade através da mudança fisiológica, ou seja, um novo estado estacionário ou estabilidade em nível diferente do anterior (Korte et al. 2007). Atualmente se discute a substituição do conceito da homeostase pelo da alostase como modelo do núcleo da regulação fisiológica animal (Korte et al. 2007; McEwen and Wingfield 2010). Assim como para a homeostase, o conceito de alostase também tem sido aplicado aos peixes em pesquisas experimentais recentes que avaliaram o estresse relacionado, por exemplo, 1) ao ambiente do aquário (Anderson et al. 2011), 2) ao desenvolvimento inicial dos juvenis (Varsamos et al. 2006), ou 3) ao comportamento social (Pavlidis et al. 2011). Para peixes ainda, o termo alostase aparece em trabalhos de revisão em aspectos tais como reprodução (Schreck 2010) e variações ambientais (Schulte 2014).

A principal diferença entre os conceitos de homeostase e alostase é que no primeiro o organismo trabalha para voltar ao estado anterior, que é tido como mais ou menos “fixo”, dependendo do animal (Hickman-Jr et al. 2004; Randall et al. 2000). O conceito de alostase enfatiza a “flexibilidade” no estado homeostático, em comportamento fisiológico “dinâmico” para lidar com a mudança ambiental sendo considerado um conceito adicional (McEwen and Wingfield 2010) e aperfeiçoado (Schulte 2014) em relação à homeostase, conceito mais rígido. Romero et al. (2009) também tentou integrar os conceitos de homeostase e alostase através do modelo da abordagem reativa que categoriza a resposta homeostática ao estresse em 4 fases: preditiva, reativa, sobrecarregada e falha.

Continuando com a abordagem ecofisiológica, pode-se relacionar a variação em dois parâmetros ambientais relevantes para os peixes, como a salinidade e a temperatura, por exemplo, com o impacto sobre a fisiologia dos peixes (Figura 2.4). E este impacto pode ser categorizado em termos de

manutenção da homeostasia ou existência de carga ou sobrecarga alostática e estresse, e morte. Segundo Shelford (Krebs 2009) a área central representa a preferência do animal em relação aos dois parâmetros ambientais representados, representa a faixa de valores não limitantes para ambos os parâmetros, e onde o animal vai viver e se reproduzir. Podemos incluir análise fisiológica neste diagrama e indicar que no centro da área estará a faixa de ambos os parâmetros em que a homeostasia será mantida (por regulação ou conformação, sensu Figura 2.2), ou em outras palavras, o animal não estará sob estresse (Figura 4). Valores fora desta faixa ótima, nos dois parâmetros, e nos dois sentidos, representam carga alostática; valores além destes que oferecem carga alostática representam sobrecarga alostática e podem levar à morte do animal. Por isso incluem a linha pontilhada que indica os limites de tolerância (Figura 2.4).

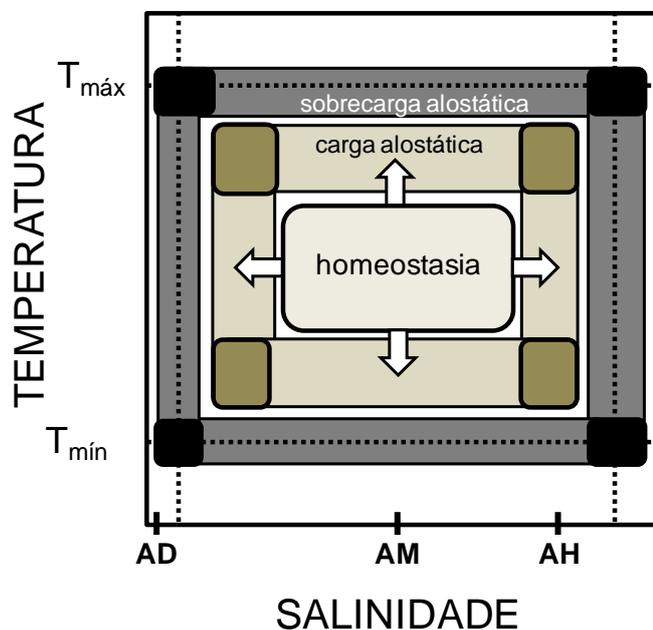


Figura 2.4. A: Limites de tolerância e área de preferência de distribuição de uma espécie de peixe, em função da temperatura e salinidade da água, dentro de certo protocolo de exposição temporal. Área central de preferência relacionada com a manutenção da homeostasia. Periferias indicam desvio das condições ideais, ou carga alostática, “para cima e para baixo, para a esquerda e para a direita”. Desvios adicionais representam sobrecarga alostática e potencialmente morte, dependendo do tempo de exposição. As linhas pontilhadas indicam os limites máximo e mínimo de tolerância aos parâmetros temperatura e salinidade. Os cantos dos retângulos, tanto para a carga quanto para a sobrecarga alostática são mais escuros para indicar maior carga, pois representam valores desafiadores nos 2 parâmetros ao mesmo tempo. AD= água doce, AM = água do mar, AH= água hiper-salina. Este exemplo ilustra um peixe marinho relativamente eurihalino, pois mantém homeostasia em água salobra de aproximadamente 50% da água do mar.

Estes conceitos mostram-se extremamente relevantes para avaliar e caracterizar o que ocorre com os peixes durante o transporte. Contudo, em trabalhos experimentais relativos ao estresse do transporte o termo alostase foi encontrado em apenas um artigo (Manuel et al. 2014). Independente da espécie, da fase de vida e do destino, o peixe que é transportado encontrará um ambiente diferente durante e após o transporte, e isto não necessariamente implica em desajustes fisiológicos uma vez que os organismos possuem mecanismos para encontrarem o equilíbrio neste novo ambiente, desde que a nova combinação de parâmetros esteja dentro de sua faixa de tolerância (Figura 4). A questão é que o desgaste decorrente da hiperatividade ou desregulação crônica dos mecanismos alostáticos é denominado de carga alostática, como já discutido acima (Schulte 2014). O estresse do transporte pode então acarretar um quadro de sobrecarga alostática, levando o peixe à morte, em princípio com o aumento no tempo de transporte no ambiente confinado do saco plástico, por exemplo. A mortalidade associada ao transporte pode ser o resultado de um agente estressor grave, interação de vários agentes mais leves ou doença infecciosa (Harmon 2009). Para que isto não ocorra é imprescindível diminuir o estresse do peixe durante o processo de transporte para que ele sobreviva à carga alostática durante o transporte, e recobre sua homeostasia original (ou algo próximo ao estado original) na chegada e ajuste ao novo ambiente.

2.3.2 TRANSPORTE, ALOSTASE E QUALIDADE DE ÁGUA

Durante o transporte de peixes vivos os principais desafios à manutenção da homeostase são decorrentes da deterioração da qualidade da água (Lim et al. 2003). Esta constatação reforça a relevância de análise ecofisiológica do problema. O fator mais importante no transporte de peixes-vivos é manter uma quantidade adequada de oxigênio dissolvido (Berka 1986; Harmon 2009; Lim et al. 2003). Outro fator de extrema importância é evitar a contaminação do peixe pelo aumento na amônia na água (NH_3) (Berka 1986; Harmon 2009), como já abordado acima. Se o peixe não conseguir recuperar a homeostase durante e após o transporte, pode ocorrer a mortalidade (Lim et al. 2003). A Figura 5 sintetiza o que provavelmente ocorre com os peixes durante

o transporte: o grande desafio “ambiental” durante o transporte confinado é potencialmente a queda no oxigênio aliado ao aumento na amônia (Gomes et al. 2009; Parodi et al. 2014; Tondolo et al. 2013; Urbinati et al. 2004). O estresse acarretado pelo manuseio e captura pré-transporte certamente já altera alguns marcadores fisiológicos que serão normalizados se o peixe não for exposto a agentes estressores mais severos durante o transporte. Conforme a espécie e a fase de vida, o peixe pode apresentar diferentes graus de tolerância a estas alterações do ambiente restrito de transporte e pode retornar (ou nunca sair efetivamente) à/de sua condição de equilíbrio original. Nesta análise abaixo, de forma geral, a área indicada como “homeostase” representa a combinação de valores de OD (queda de OD) e de NH_3 (aumento de NH_3) que o peixe tolera sem ter sua estabilidade interna afetada. À medida em que vai aumentando o seu tempo de permanência no saco de transporte, a queda no OD e/ou o aumento na NH_3 representam um desafio fisiológico que pode ser definido como carga alostática. Havendo a sobrevivência, o animal ajustou-se à nova situação ambiental. Aumentando mais a NH_3 , reduzindo-se mais o OD, em algum momento a carga não será tolerável, haverá sobrecarga alostática e a morte do animal (Figura 5). A sobreposição das áreas na Figura indica que existe variabilidade individual intra-específica. Como a variável OD vai de valor máximo que a água comporta de oxigênio dissolvido até zero (anóxia), e a variável NH_3 aumenta a partir de zero à medida em que a amônia vai sendo produzida pelo metabolismo do animal, ou seja, apenas a redução no OD e o aumento na NH_3 representam desafio alostático, por isso a área da carga alostática fica apenas à direita e abaixo da área de homeostase, e não ao redor, como ilustrado na Figura 4 anterior, em análise baseada nos parâmetros “salinidade e temperatura”.

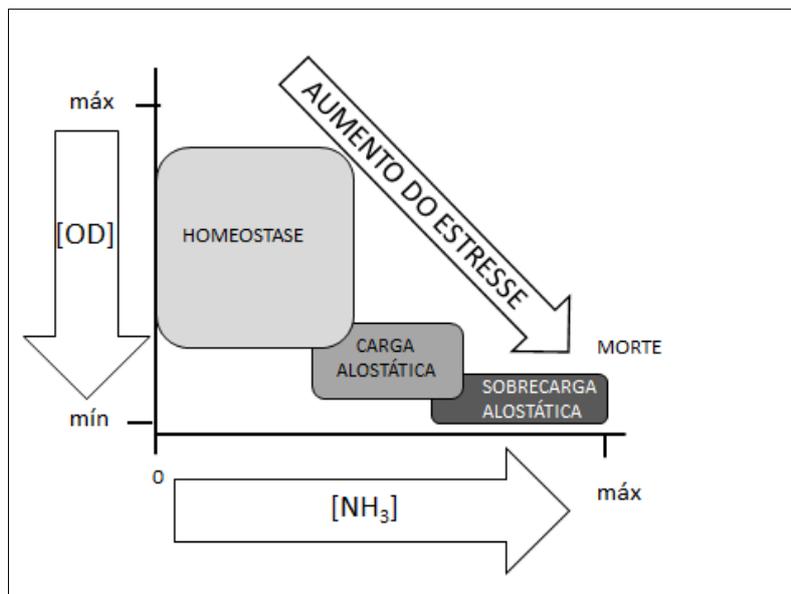


Figura 2.5 Caracterização do estresse de transporte em peixes em relação aos conceitos de homeostase e alostase. A sobreposição de áreas reflete a interação entre os 2 parâmetros/eixos, caracterizando a passagem do estado de homeostase para carga e sobrecarga alostática. A alteração de estados ocorre em função da diminuição do oxigênio dissolvido e do aumento da amônia, representados no gráfico pelo deslocamento na área do gráfico para baixo e para direita. A morte do peixe durante e após o transporte é consequência da permanência por longo período no estado de sobrecarga alostática.

2.4 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DECORRENTES DO TRANSPORTE

Para se avaliar como o transporte e as alterações no ambiente do peixe (meio de transporte) desafiam a homeostase e implicam em carga ou sobrecarga alostática dos peixes, utilizam-se marcadores de estresse. Respostas fisiológicas de peixes ao estresse podem ser agrupadas de uma forma geral em primárias, secundárias e terciárias (Barton 2002; Iwama et al. 2006). Respostas primárias envolvem ativação neuroendócrina diante da detecção neuronal da alteração ambiental (Iwama et al. 2006). Estas respostas neuroendócrinas incluem a liberação rápida de adrenalina (Iwama et al. 2006; Reid et al. 1998) e a estimulação do sistema hipotálamo-hipófise-células interrenais do rim anterior que culmina na liberação de cortisol na circulação do animal. As catecolaminas (principalmente adrenalina) são liberadas do tecido cromafim do rim anterior (da cabeça) do peixe e de neurônios adrenérgicos, e o cortisol é liberado por células do tecido interrenal, também localizado no rim anterior. O principal componente do estímulo hipofisário ao tecido interrenal é o ACTH, que também estimula a liberação de adrenalina (Iwama et al. 2006). O

cortisol por sua vez gera mobilização das reservas de energia, para manter o suprimento de oxigênio e a homeostasia osmótica (George et al. 2013; Peter 2011). Respostas secundárias são os efeitos (metabólicos) bioquímicos e fisiológicos provocados pelos hormônios liberados durante as respostas primárias. Incluem alterações no plasma e em tecidos e ainda, no nível de íons e metabólitos, características hematológicas e ativação de proteínas de estresse (HSPs) (Barton 2002; Haux et al. 1985; Weber Iii 2011). O parâmetro mais comumente analisado como resposta secundária é a glicemia (Iwama et al. 2006). Finalmente, respostas terciárias se referem à performance do organismo como um todo, e se verificam alterações no crescimento, reprodução, resistência a doenças, capacidade metabólica para atividades e sobrevivência (Haux et al. 1985; Kvamme et al. 2013; Weber Iii 2011). (Skomal and Mandelman 2012). Neste contexto, respostas terciárias dificilmente seriam observadas na avaliação do transporte de peixes vivos, principalmente ornamentais, principalmente pela questão do tempo necessário para que sejam observadas.

Relacionando os conceitos de homeostasia/alostasia com a classificação das respostas fisiológicas dos peixes, é possível propor que a manutenção da homeostasia envolve as respostas primárias e secundárias. A existência de carga alostática implica em alterações mais intensas e/ou numerosas nos marcadores das respostas secundárias. Finalmente, a sobrecarga alostática pode ser relacionada com a morte, ou existência de respostas terciárias, mais severas.

A Tabela 1 apresenta um resumo dos marcadores utilizados, classificados de acordo com os conceitos descritos acima. Além de marcadores fisiológicos (Respostas primárias e secundárias), alguns estudos avaliam a sobrevivência (Resposta terciária) (Stieglitz et al. 2012). A literatura relata também estudos com análise dos parâmetros da qualidade da água após o transporte, porém estes não realizados na Tabela 1 (Dhanasiri et al. 2011). Observa-se que a maioria dos trabalhos envolveu espécies de água doce, em transporte curto. Além disso, o parâmetro mais utilizado foi a medida do cortisol plasmático, clássico marcador de resposta primária.

2.4.1 RESPOSTAS PRIMÁRIAS CORTISOL E CATECOLAMINAS

A resposta fisiológica primária a perturbações em peixes é o aumento do nível de corticosteroides e catecolaminas, principalmente adrenalina (Cook 2011; Wells and Pankhurst 1999). Como a resposta da adrenalina apresenta pico muito rápido, e o aumento no cortisol permanece por mais tempo, o cortisol plasmático é considerado o bioindicador da resposta neuroendócrina de referência no nível do organismo (Iwama et al. 2006). Em função disto, diante do estresse, as alterações nos níveis sanguíneos de cortisol são consideradas um bioindicador mais direto da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal do que as mudanças nos níveis de glicose (Pottinger and Carrick 1999). E, como visto na Tabela 1, o cortisol é o marcador mais utilizado, e recebe destaque em revisões sobre o tema estresse em peixes (Iwama et al. 2006).

Dentre as consequências da liberação do cortisol estão a imunossupressão, o estímulo ao catabolismo proteico no músculo e a gliconeogênese (Baldisserotto 2009). O cortisol aumenta significativamente após o transporte em peixes (Acerete et al. 2004; Dhanasiri et al. 2013b; Gomes et al. 2003; Urbinati and Carneiro 2006). O aumento do cortisol plasmático em peixes submetidos a estímulos estressores pode ser rápido (de 1 a 10 min) ou lento (de 2 a 24 horas), sendo que em geral seus níveis voltam ao nível normal em menos de 24 horas nos casos de aumento rápido (Baldisserotto 2009).

Cabe destacar que, apesar do cortisol ser um marcador eficiente, em peixes de pequeno porte como os ornamentais e alevinos é difícil realizar a medição individual através do plasma sanguíneo em função do pouco volume de sangue que é obtido. Faz-se a medição utilizando-se *pools* de amostras (Gomes et al. 2009; Urbinati et al. 2004). Para solucionar este problema é necessário que se aprimorem outras metodologias, tais como medir o cortisol na água (Brinn et al. 2009; Leong et al. 2009), bem como que se caracterizem outros marcadores confiáveis. Outra dificuldade relacionada à medição do

cortisol plasmático é a obtenção de dados do grupo controle, uma vez que o próprio manuseio para a análise acarreta elevação nos níveis do hormônio.

2.4.2 RESPOSTAS SECUNDÁRIAS

GLICOSE E GLICOGÊNIO

A principal vantagem da medida de glicemia é a possibilidade de se medir com equipamentos portáteis, acessíveis economicamente e com pouco volume de sangue. O aumento no nível de glicose sanguínea e o consumo de glicogênio são considerados respostas secundárias ao estresse em peixes (Barton 2002). O glicogênio como marcador de estresse em peixes geralmente é medido tanto no fígado quanto no músculo e sempre combinado com outros fatores de estresse (El-Khaldi 2010; Zeppenfeld et al. 2014).

O aumento dos níveis de cortisol (resposta primária) gera mobilização das reservas de energia estimulando a gliconeogênese e a glicogenólise para que o indivíduo possa lidar com o agente estressor (Cook 2011; Iwama et al. 2006), o que permite que o glicogênio e a glicose sejam utilizados como marcadores. Durante o transporte foi observado nos trabalhos o aumento da glicose e do glicogênio (Urbinati and Carneiro 2006; Zeppenfeld et al. 2014).

Os níveis de glicose e glicogênio têm sido cada vez mais utilizados como marcadores de estresse de transporte em peixes, uma vez que são mais comuns artigos recentes com a utilização de tais marcadores.

OSMOLALIDADE E A ALTERAÇÃO DE ÍONS NO PLASMA

A osmorregulação é a função que envolve o controle da concentração geral de solutos do meio extracelular (Kirschner 1991, Stewart 1991, Schmidt-Nielsen 1996). Este controle fica evidente quando o animal aquático é submetido a alteração de salinidade da água. Vertebrados são osmorreguladores, ou seja, gastam energia metabólica para controlar o seu meio extracelular, sustentando gradientes osmóticos e iônicos entre o meio interno e a água. Peixes teleósteos de água doce (meio externo: <15-20 mOsm/kg H₂O) mantêm sua osmolalidade plasmática em aproximadamente 230-280 mOsm/kg H₂O, enquanto teleósteos marinhos (meio externo: 950-

1.050 mOsm/kg H₂O) mantêm concentração ligeiramente superior, de aproximadamente 300-350 mOsm/kg H₂O) (Kirschner 1991, Stewart 1991, Schmidt-Nielsen 1996,). Eurihalinos são os animais que conseguem tolerar grandes variações na concentração salina da água na qual vivem, ao passo que estenohalinos são os que apresentam tolerância limitada, sendo conceitos obviamente relativos (Hickman-Jr et al. 2004; Pough 2003; Schmidt-Nielsen 1996).

A osmorregulação implica no controle do transporte do sal mais relevante quantitativamente no meio extracelular, o NaCl. A regulação de NaCl extracelular nos teleósteos marinhos ocorre por ingestão de água do mar, seguida de absorção de NaCl pelo trato gastro-intestinal (TGI). A água segue por osmose e vai do lúmen do TGI para o plasma. O sal absorvido é ativamente (energizado pela Na⁺/K⁺-ATPase) secretado pelo epitélio branquial (Burggren 1991; Marshall and Grosell 2006). A regulação plasmática de íons como o sulfato e o magnésio é realizada pelo epitélio renal, e do potássio e cálcio mais pelo epitélio branquial, todos com participação do trato gastrointestinal (Marshall and Grosell 2006). Nos teleósteos dulcícolas ocorre absorção ativa de sal pelo epitélio branquial, energizado pela Na⁺/K⁺-ATPase e pela H⁺-V-ATPase; a água que entra osmoticamente é eliminada através da produção de urina abundante e diluída em relação ao plasma; o equilíbrio iônico é mantido também pela obtenção de íons pela alimentação (Marshall and Grosell 2006).

Muitas vezes também comercializados como peixes ornamentais, os elasmobrânquios marinhos hiporregulam NaCl através de secreção pela glândula retal, mas acumulam ureia, tornando-se aproximadamente isosmóticos à água do mar (~1000 mOsm/kg H₂O). Elasmobrânquios eurihalinos apresentam redução na ureia plasmática diante de redução de salinidade; as espécies de raias dulcícolas não possuem ureia no plasma e apresentam comportamento osmorregulatório semelhante a teleósteos dulcícolas (Wosnick e Freire 2013).

A osmolalidade plasmática não é um marcador comumente utilizado para avaliar o estresse do transporte, mas deveria ser uma vez que é dos parâmetros mais relevantes para a definição de homeostasia, e em várias

situações corrobora dados de marcadores mais comuns de estresse, como é o caso do cortisol (Abreu et al. 2008; Brinn et al. 2012; Urbinati et al. 2004). O cortisol tem papel reconhecidamente na osmorregulação de teleósteos marinhos, notadamente no estímulo da secreção de sal. Em teleósteos eurihalinos, o aumento do cortisol plasmático em geral acompanha o estímulo da secreção de sal pelas brânquias diante de aumento de salinidade.

Íons cloreto, sódio e potássio no plasma têm sido comumente utilizados para avaliar o estresse do transporte em peixes juntamente com outros marcadores (Abreu et al. 2008; Carneiro and Urbinati 2002; Feitosa et al. 2013). Como exemplo desta situação, no caso do robalo submetido ao transporte de 10 horas, os íons sódio apresentaram aumento, que não foi acompanhado pelos íons potássio mesmo em um quadro de estresse (Tondolo et al. 2013). Estes marcadores osmorregulatórios devem ser mais frequentemente explorados, em conjunto com outros marcadores para os quais os valores de referência já sejam conhecidos. O uso de vários marcadores em conjunto possibilitará uma melhor interpretação dos dados, e melhor avaliação e detecção da quebra de homeostasia durante o transporte.

MARCADORES HEMATOLÓGICOS

Os marcadores hematológicos mais utilizados em trabalhos que avaliaram o estresse do transporte em peixes são: hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos (Abreu et al. 2008; Brinn et al. 2012; Feitosa et al. 2013; Marçalo et al. 2008). Entretanto, nem sempre os marcadores hematológicos apresentaram alterações significativas após o transporte, mesmo quando os demais marcadores como o cortisol indicaram o estresse dos peixes (Acerete et al. 2004; Urbinati and Carneiro 2006).

OUTROS MARCADORES

Marcadores fisiológicos de estresse são utilizados com outros tipos de bioindicadores para que se tenha uma compreensão global do que ocorre com

o organismo. Para trabalhos que avaliaram o estresse do transporte, uma abordagem recente e moderna é a análise de transcriptômica, como feito por Dhanasiri e colaboradores (2013). Este tipo de análise molecular serve de exemplo de bioindicador complementar. Os autores verificaram, durante o transporte de zebrafish, alterações na expressão de genes envolvidos no processo metabólico de resposta ao estresse, como por exemplo genes que codificam enzimas envolvidas na gliconeogênese e glicólise, beta-oxidação de ácidos graxos, regulação da amônia corporal, no sistema antioxidante, na resposta celular ao estresse (ubiquitina e MAPquinases) e ainda o sistema imunológico (Dhanasiri et al. 2013a; Dhanasiri et al. 2013b).

2.5 MEDIDAS PARA DIMINUIR AS ALTERAÇÕES NO AMBIENTE DE TRANSPORTE E O ESTRESSE ASSOCIADO: APLICAÇÃO COMERCIAL

Como discutido acima, as principais medidas no sentido de minimização do estresse do transporte de peixes vivos se relaciona com as tentativas de redução no consumo de oxigênio ou prevenção da hipóxia ambiental, e/ou da geração de amônia, e/ou da acidificação da água: 1) adição de atmosfera de O₂ puro, 2) jejum pré-transporte, 3) salinidade isosmótica, 4) redução na temperatura, 5) utilização de anestésicos.

COMBATER A HIPÓXIA E A ACIDIFICAÇÃO PELO CO₂: AERAÇÃO E/OU ADIÇÃO DE OXIGÊNIO PURO À EMBALAGEM, OU ADIÇÃO DE TAMPÃO À ÁGUA

Para peixes transportados em tanques, é recomendável a utilização de aeradores a fim de se manter a saturação o oxigênio dissolvido próximo de 100% (Harmon 2009). Em relação à embalagens fechadas para transporte é necessário a adição de oxigênio puro à embalagem (Lim et al. 2003). A aeração ou adição de atmosfera de oxigênio puro, além de aumentar os níveis de oxigênio dissolvido na água, contribui para alcalinizar a água acidificada pelo aumento do CO₂(Paterson et al. 2003; Treasurer 2012).

Como os peixes são osmorreguladores em água doce e salgada, mantêm diferença de osmolalidade entre seu meio interno e a água, às custas

do transporte ativo (com custo metabólico) de íons pelos epitélios das brânquias, túbulo renal e intestino. Em água salobra, mais próxima de sua concentração interna, o consumo de oxigênio pode ser menor. A mudança de salinidade, quando tolerada, em geral leva a aumento no consumo de oxigênio, por estimular a síntese de proteínas ou regulação na sua atividade (e.g., revisado em Tseng e Hwang, 2008). Por causa deste gasto metabólico para a osmorregulação, muitas vezes a salinidade da água de transporte de peixes marinhos é reduzida ou sal é acrescentado à água doce para o transporte de peixes dulcícolas, para reduzir o custo metabólico e consumo de oxigênio da embalagem, respectivamente, decorrente da secreção de sal em água do mar ou absorção de sal em água doce.

MINIMIZAR AUMENTO NA AMÔNIA: PERÍODO DE JEJUM PRÉ-TRANSPORTE

O acúmulo de amônia pode ser minimizado pelo jejum do peixe antes do transporte e/ou pela adição de agentes que reduzem a amônia (Harmon 2009). Entretanto, em alguns estudos optou-se por não deixar os peixes em jejum antes do experimento de transporte porque os produtores de jundiá no Sul e Centro-Oeste do Brasil não seguem esta orientação (Parodi et al. 2014; Zeppenfeld et al. 2014). Como ainda não foram realizados estudos para verificar se o jejum aumenta o estresse, não é possível inferir o impacto desta medida durante o transporte.

Entre os produtores e exportadores de peixes ornamentais marinhos no Brasil, o jejum pré-transporte também não é consenso (Sampaio, FDF; observação pessoal), sendo que há quem chegue a afirmar que o jejum estressa e debilita ainda mais o peixe. Para o estabelecimento de um protocolo mais seguro de transporte, esta é uma informação que precisa ser testada.

MINIMIZAR O CUSTO METABÓLICO DA OSMORREGULAÇÃO, DIMINUINDO O CONSUMO DE OXIGÊNIO E GERAÇÃO DE AMÔNIA: ALTERAÇÃO DA SALINIDADE DA ÁGUA DO TRANSPORTE

No caso de peixes de água doce a adição de sal á agua do transporte previne distúrbios osmorregulatórios (Harmon 2009). Já para peixes marinhos, a diminuição da salinidade da água durante o transporte também possibilitou o transporte com maior biomassa, o que reduz custos, sem alterar a taxa de sobrevivência (Stieglitz et al. 2012). Em ambas as situações, espécies de água doce ou marinhas, as tentativas de transportar os peixes em condições isosmóticas tem indicado que esta é uma medida que diminui o estresse, por reduzir o custo metabólico da osmorregulação para os peixes teleósteos, que são sempre osmorreguladores. Porém, é necessário ainda, estabelecer protocolos diferenciados em função da espécie e da fase de vida do peixe.

REDUZIR A TAXA METABÓLICA: RESFRIAMENTO DA ÁGUA DO TRANSPORTE

Resfriar a água do transporte também é uma medida que pode ser benéfica uma vez que diminui o metabolismo do peixes, diminuindo conjuntamente a produção de amônia e o consumo de oxigênio, além de aumentar a solubilidade do oxigênio (Harmon 2009).

REDUZIR A TAXA METABÓLICA: UTILIZAÇÃO DE ANESTÉSICOS

A sedação é uma das alternativas para diminuir o estresse durante o transporte e, conseqüentemente manter a higidez dos peixes no novo sistema. Pesquisa com cavalos marinhos (*Hippocampus reidi*) sugerem que a utilização de óleo essencial de *Lippia alba*, é capaz de reduzir o estresse causado pelo transporte (Cunha 2011).

Anestésicos são amplamente utilizados antes e durante o transporte para retardar o metabolismo do peixe, reduzindo o consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono e amônia (Harmon 2009). Entretanto, mesmo alguns produtos que possuem atividade anestésica sobre os peixes não são capazes de reduzir o estresse do transporte como é o caso do óleo essencial de *Nectandra megapota mica* em relação ao robalo peva (*Centropomus parallelus*) (Tondolo et al. 2013).

REDUZIR A AMÔNIA NA ÁGUA: ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS À AGUA DO TRANSPORTE

Probióticos auxiliam na manutenção da homeostase, pois competem diretamente com agentes patogênicos presentes no muco da pele dos peixes (Boutin et al. 2013). Para o zebrafish a aplicação do consórcio de bactérias nitrificantes melhorou a qualidade da água uma vez que conteve o acúmulo de amônia (Dhanasiri et al. 2011). Porém para a arraia cururu (*Potamotrygon cf. hystrix*), espécie ornamental de água doce, o uso de probióticos e antibióticos não reduziu o estresse devendo ser evitado.

2.6 CONCLUSÃO

Práticas de manejo em aquicultura acarretam uma gama variada de agentes estressores para os peixes, sendo que a manutenção da homeostase varia em função da espécie, da origem (se do ambiente natural ou cultivada) e da fase de vida. Esta ainda é uma área de pesquisa com uma grande carência de dados. Para o transporte de peixes é imprescindível caracterizar as respostas fisiológicas que acarretam a carga e a sobrecarga alostática a fim de se obter um manejo adequado. Portanto, são necessárias pesquisas fisiológicas básicas para subsidiar o transporte com mínimo de estresse.

A compreensão das respostas fisiológicas dos peixes durante o transporte permite que se busquem alternativas para diminuir o estresse destes animais, e aumentar a rentabilidade do seu comércio. Durante o transporte os peixes estão sujeitos a uma condição que certamente desafia a sua homeostase e que, se não for minimizada, pode levar a um quadro de sobrecarga alostática, patologia e morte. Caracterizar para cada espécie, fase de vida e tempo de transporte (se curto ou longo) estes limites da homeostase e de carga alostática suportável e reversível implica em aumentar o bem-estar dos peixes, reduzir custos, aumentar os rendimentos ao longo da cadeia produtiva e ainda aumentar o potencial de conservação dos estoques naturais.

O pouco tempo do início das pesquisas (aproximadamente 15 anos), a pequena quantidade de publicações científicas, a diversidade de espécies produzidas e comercializadas e a crescente demanda do setor de aquicultura permitem afirmar que ainda há muito a ser pesquisado em relação ao estresse do transporte em peixes. Ainda não se tem dados suficientes para o estabelecimento de protocolos que seguramente diminuam o estresse em transportes curtos e longos. Procedimentos comumente utilizados durante o transporte de peixes, e.g. o jejum e a utilização de anestésicos, ainda não foram suficientemente pesquisados, e as conclusões não podem ser extrapoladas para todas as espécies.

Os dados atuais caracterizam o cortisol e a glicose como os marcadores fisiológicos mais frequentemente utilizados; sendo lactato e glicogênio os de menor frequência. Testar outros marcadores como as enzimas de estresse oxidativo e padrões comportamentais pode aumentar a compreensão sobre o real desafio enfrentado pelos peixes ao serem transportados comercialmente. Grande parte das pesquisas fornece dados sobre espécies cultivadas que são transportadas por curto período de tempo.

Para o futuro é necessário que se aprofunde a abordagem da utilização de vários marcadores conjuntos para que sejam obtidos diagnósticos cada vez mais precisos, e protocolos simples e eficazes sejam elaborados e disponibilizados. Para alcançar este conjunto de dados necessários, deve-se levar em conta que à medida em que forem utilizadas metodologias com menores custos e maior praticidade mais valores de referência serão disponibilizados em relação aos marcadores fisiológicos, para o maior número de espécies relevantes comercialmente. É importante ressaltar que é preciso ainda preencher a lacuna principalmente da resposta ao estresse de peixes retirados da natureza e transportados por longos períodos de tempo.

REFERÊNCIAS (CAPÍTULO 2)

- Abreu, J. S. d., Sanabria-Ochoa A. I., Gonçalves F. D., and Urbinati E. C. 2008. Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. *Ciência Rural* 38:1413-1417.
- Acerete, L., Balasch J. C., Espinosa E., Josa A., and Tort L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237:167-178.
- Anderson, P. A., Berzins I. K., Fogarty F., Hamlin H. J., and Guillette Jr L. J. 2011. Sound, stress, and seahorses: The consequences of a noisy environment to animal health. *Aquaculture* 311:129-138.
- Baldisserotto, B. 2009. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. *In Book Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. (Editor, ed.)^eds.), p. Editora UFSM, City.*
- Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42:517-525.
- Berka, R. 1986. The transport of live fish. A review. EIFAC TECHNICAL PAPER 48.
- Bernoth, E.-M., and Crane M. S. J.1995. Viral diseases of aquarium fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 4:103-110.
- Boutin, S., Bernatchez L., Audet C., and Derôme N. 2013. Network Analysis Highlights Complex Interactions between Pathogen, Host and Commensal Microbiota. *PLoS ONE* 8:e84772.
- Brinn, R. P., Marcon J. L., McComb D. M., Gomes L. C., Abreu J. S., and Baldisseroto B. 2012. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162:139-145.
- Brinn, R. P., Marcon J., Tavares-Dias M., and Brinn I. M. 2009. Fluorescence Detection of the Ornamental Fish Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *Photochemistry and Photobiology* 85:358-364.
- Bruckner, A. W. 2005. The importance of the marine ornamental reef fish trade in the wider Caribbean. *Revista de Biología Tropical* 53:127-137.
- Burggren, W. C., J. W.; DeVillez, E. J.; Farrel, A.P.; Heath, J.; Hochachka, P. W.; Kirschner, L.B. 1991. *Environmental and Metabolic Animal Physiology*, Wiley-Liss, New York.

- Carneiro, P. C. F., and Urbinati E. C. 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International* 10:221-229.
- Clark, T. D., Donaldson M. R., Pieperhoff S., Drenner S. M., Lotto A., Cooke S. J., Hinch S. G., Patterson D. A., and Farrell A. P. 2012. Physiological Benefits of Being Small in a Changing World: Responses of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to an Acute Thermal Challenge and a Simulated Capture Event. *PLoS ONE* 7:e39079.
- Cnaani, A., McLean E., and Hallerman E. M. 2013. Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 412–413:107-116.
- Cook, K. V., McConnachie, S.H., Gilmour, K.M., Hinch, S.G., Cooke, S.J. 2011. Fitness and behavioral correlates of pre-stress and stress-induced plasma cortisol titers in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) upon arrival at spawning grounds. *Hormones and Behavior* 60:489-497.
- Corrêa, L., Souza G. R., Takemoto R., Ceccarelli P., and Adriano E. 2014. Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp. in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil. *Parasitol Res* 113:499-503.
- Cunha, M. A., Silva, B.F., Delunardo, F.A.C., Benovit, S.C., Gomes, L.C., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. 2011. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology* 9:683-688.
- Dhanasiri, A. K. S., Fernandes J. M. O., and Kiron V. 2013a. Acclimation of Zebrafish to Transport Stress. *Zebrafish* 10:87-98.
- Dhanasiri, A. K. S., Fernandes J. M. O., and Kiron V. 2013b. Liver Transcriptome Changes in Zebrafish during Acclimation to Transport-Associated Stress. *PLoS ONE* 8:e65028.
- Dhanasiri, A. K. S., Kiron V., Fernandes J. M. O., Bergh O., and Powell M. D. 2011. Novel application of nitrifying bacterial consortia to ease ammonia toxicity in ornamental fish transport units: trials with zebrafish. *Journal of Applied Microbiology* 111:278-292.
- El-Khaldi, A. T. F. 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi Journal of Biological Sciences* 17:241-246.
- Feitosa, K. C. d. O., Povh J. A., and Abreu J. S. d. 2013. Physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) treated with homeopathic product and submitted to transport stress. *Homeopathy* 102:268-273.
- Freire, C. A., Amado E. M., Souza L. R., Veiga M. P. T., Vitule J. R. S., Souza M. M., and Prodocimo V. 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of

euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 149:435-446.

- Freire, C. A., Souza-Bastos L. R., Amado E. M., Prodocimo V., and Souza M. M. 2013. Regulation of Muscle Hydration Upon Hypo- or Hyper-Osmotic Shocks: Differences Related to Invasion of the Freshwater Habitat by Decapod Crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 319:297-309.
- George, N., Peter V. S., and Peter M. C. S. 2013. Physiologic implications of inter-hormonal interference in fish: Lessons from the interaction of adrenaline with cortisol and thyroid hormones in climbing perch (*Anabas testudineus* Bloch). *General and Comparative Endocrinology* 181:122-129.
- Gomes, L. C., Brinn R. P., Marcon J. L., Dantas L. A., Brandao F. R., de Abreu J. S., Lemos P. E. M., McComb D. M., and Baldisserotto B. 2009. Benefits of using the probiotic Efinol((R))L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquaculture Research* 40:157-165.
- Gomes, L. C., Roubach R., Araujo-Lima C. A. R. M., Chippari-Gomes A. R., Lopes N. P., and Urbinati E. C. 2003. Effect of Fish Density During Transportation on Stress and Mortality of Juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34:76-84.
- Harmon, T. S. 2009. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* 1:58-66.
- Haux, C., Sjöbeck M.-L., and Larsson Å. 1985. Physiological stress responses in a wild fish population of perch (*Perca fluviatilis*) after capture and during subsequent recovery. *Marine Environmental Research* 15:77-95.
- Hickman-Jr, C. P., Roberts L. S., and Larson A. 2004. *Princípios Integrados de Zoologia.*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Hill, R. W., Wyse G. A., and Anderson M. 2008. *Animal Physiology*, Sinauer Associates.
- Ings, J. S., Oakes K. D., Vijayan M. M., and Servos M. R. 2012. Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 156:67-74.
- Iversen, M., Finstad B., and Nilssen K. J. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 168:387-394.

- Iwama, G. K., Afonso L. O. B., and Vijayan M. M. 2006. Stress in Fishes *In* The Physiology of Fishes (D. H. Evans, and C. J. B. . eds.). Taylor and Francis, Florida.
- Korte, S. M., Olivier B., and Koolhaas J. M. 2007. A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology & Behavior* 92:422-428.
- Krebs, C. J. 2009. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance.*, San Francisco.
- Kvamme, B. O., Gadan K., Finne-Fridell F., Niklasson L., Sundh H., Sundell K., Taranger G. L., and Evensen Ø. 2013. Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. *Fish & Shellfish Immunology* 34:55-65.
- Leong, H., Ros A. F. H., and Oliveira R. F. 2009. Effects of putative stressors in public aquaria on locomotor activity, metabolic rate and cortisol levels in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 74:1549-1561.
- Lim, L. C., Dhert P., and Sorgeloos P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research* 34:923-935.
- Manuel, R., Boerrigter J., Roques J., van der Heul J., van den Bos R., Flik G., and van de Vis H. 2014. Stress in African catfish (*Clarias gariepinus*) following overland transportation. *Fish Physiol Biochem* 40:33-44.
- Marçalo, A., Pousão-Ferreira P., Mateus L., Duarte Correia J. H., and Stratoudakis Y. 2008. Sardine early survival, physical condition and stress after introduction to captivity. *Journal of Fish Biology* 72:103-120.
- Marshall, W. S., and Grosell M. 2006. Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. *In* The Physiology of Fishes. CRC, Taylor & Francis.
- McEwen, B. S., and Wingfield J. C. 2010. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Hormones and Behavior* 57:105-111.
- Meinelt, T., Schreckenbach K., Pietrock M., Heidrich S., and Steinberg C. E. W. 2008. Humic substances - Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environmental Science and Pollution Research* 15:17-22.
- Murphy, K. M., and Lewbart G. A. 1995. Aquarium fish dermatologic diseases. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 4:220-233.
- Odum, E. P. B., G.W. 2008. *Fundamentos de Ecologia*, Cengage Learning, São Paulo.
- Oyoo-Okoth, E., Cherop L., Ngugi C. C., Chepkirui-Boit V., Manguya-Lusega D., Ani-Sabwa J., and Charo-Karisa H. 2011. Survival and physiological response of *Labeo victorianus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901)

juveniles to transport stress under a salinity gradient. *Aquaculture* 319:226-231.

- Parodi, T., Cunha M., Becker A., Zeppenfeld C., Martins D., Koakoski G., Barcellos L., Heinzmann B., and Baldisserotto B. 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem* 40:323-334.
- Paterson, B. D., Rimmer M. A., Meikle G. M., and Semmens G. L. 2003. Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture* 218:717-728.
- Pavlidis, M., Sundvik M., Chen Y.-C., and Panula P. 2011. Adaptive changes in zebrafish brain in dominant–subordinate behavioral context. *Behavioural Brain Research* 225:529-537.
- Peter, M. C. S. 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. *General and Comparative Endocrinology* 172:198-210.
- Pottinger, T. G., and Carrick T. R. 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture* 175:351-363.
- Pough, F. H. J., C. M.; Heiser, J. B. 2003. *A Vida dos Vertebrados*, Atheneu São Paulo.
- Randall, D., Burggren W., and French K. 2000. *Fisiologia Animal - Mecanismos e Adaptações*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Reglero, P., Balbín R., Ortega A., Alvarez-Berastegui D., Gordo A., Torres A. P., Moltó V., Pascual A., Gándara F. D. L., and Alemany F. 2013. First attempt to assess the viability of bluefin tuna spawning events in offshore cages located in an a priori favourable larval habitat.
- Reid, S. G., Bernier N. J., and Perry S. F. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 120:1-27.
- Richards, J. G. 2011. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology* 214:191-199.
- Romero, L. M., Dickens M. J., and Cyr N. E. 2009. The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior* 55:375-389.
- Schmidt-Nielsen, K. 1996. *Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente.*, Livraria Santos Editora, São Paulo.

- Schreck, C. B. 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165:549-556.
- Schulte, P. M. 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *The Journal of Experimental Biology* 217:23-34.
- Skomal, G. B., and Mandelman J. W. 2012. The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: A review with a focus on the secondary response. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162:146-155.
- Souza-Bastos, L. R., Páscoa M. I., Freire C. A., and Wilson J. M. 2014. Ammonia excretion and expression of transport proteins in the gills and skin of the intertidal fish *Lipophrys pholis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 167:15-24.
- Stieglitz, J. D., Benetti D. D., and Serafy J. E. 2012. Optimizing transport of live juvenile cobia (*Rachycentron canadum*): Effects of salinity and shipping biomass. *Aquaculture* 364–365:293-297.
- Tenningen, M., Vold A., and Olsen R. E. 2012. The response of herring to high crowding densities in purse-seines: survival and stress reaction. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 69:1523-1531.
- Tseng Y-C, Hwang P-P (2008) Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **148**, 419-429.
- Tondolo, J. S. M., Amaral L. d. P., Simoes L. N., Garlet Q. I., Schindler B., Oliveira T. M., Silva B. F. d., Gomes L. d. C., Baldisserotto B., Mallmann C. A., and Heinzmann B. M. 2013. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology* 11:667-674.
- Treasurer, J. W. 2012. Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L. and stabilisation using buffering agents. *Aquaculture* 330–333:92-99.
- Urbinati, E. C., and Carneiro P. C. F. 2006. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleost: Characidae). *Acta Amazonica* 36:569-572.
- Urbinati, E. C., de Abreu J. S., da Silva Camargo A. C., and Landinez Parra M. A. 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* 229:389-400.
- Varsamos, S., Flik G., Pepin J. F., Bonga S. E. W., and Breuil G. 2006. Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 20:83-96.

- Vincent, A. C. J., Foster S. J., and Koldewey H. J. 2011. Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. *Journal of Fish Biology* 78:1681–1724.
- Weber Iii, E. S. 2011. Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 14:21-32.
- Wells, R. M. G., and Pankhurst N. W. 1999. Evaluation of Simple Instruments for the Measurement of Blood Glucose and Lactate, and Plasma Protein as Stress Indicators in Fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 30:276-284.
- Willmer, P., Stone G., and Johnston I. A. 2005. *Environmental physiology of animals*. Blackwell, Malden.
- Wood, E. M. 2001. Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies. *In* Book Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies. (Editor, ed.)^eds.), p. 80. Marine Conservation Society, City.
- Wright, K. A., Woods C. M. C., Gray B. E., and Lokman P. M. 2007. Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Journal of Fish Biology* 70:1447-1457.
- Zeppenfeld, C. C., Toni C., Becker A. G., Miron D. d. S., Parodi T. V., Heinzmann B. M., Barcellos L. J. G., Koakoski G., Rosa J. G. S. d., Loro V. L., Cunha M. A. d., and Baldisserotto B. 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* 418–419:101-107.

TABELA 2.1: UTILIZAÇÃO DE MARCADORES FISIOLÓGICOS DE ESTRESSE DE TRANSPORTE EM TRABALHOS COM PEIXES. AD = ÁGUA DOCE; M= MARINHO; NI= FASE DE VIDA NÃO INFORMADA NO TRABALHO. (P)= RESPOSTA PRIMÁRIA; (S)= RESPOSTA SECUNDÁRIA.

Ambiente/espécie/fase de vida	Tempo máx. de transporte	Cortisol	Glicose	Glicogênio	Lactato	Osmolalidade	Íons	Hematol.	Outros	Referência
		(P)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)		
Tempo Curto										
AD;M/ <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (salmão real)/juvenil	2h	X	X		X	X				Schreck et al. (1995)
AD/ <i>Arapaima gigas</i> (pirarucu)/ juvenil	3 h	X	X		X		X	X		Gomes et al. (2006)
M/ <i>Sardinapilchardus</i> (sardinha)/ NI	3 h	X	X				X	X		Marçalo et al. (2008)
AD/ <i>Clariasgariepinus</i> (bagre africano)/NI	3 h	X	X						X	Manuel et al. (2014)
AD/ <i>Perca fluviatilis</i> (perca eurasiãna)/ juvenil	4 h	X	X		X	X		X		Acerete et al. (2004)
AD/ <i>Brycon cephalus</i> (matrinxã) / juvenil	4 h	X	X			X	X	X		Urbinati et al. (2004)
AD/ <i>Brycon cephalus</i> (matrinxã) / adulto	4 h	X	X				X			Carneiro and Urbinati (2002)
AD/ <i>Brycon amazonicus</i> (matrinxã) / juvenil	4 h	X	X			X	X	X		Abreu et al. (2008)
AD/ <i>Brycon amazonicus</i> (matrinxã) / adulto	4 h	X	X	X				X	X	Urbinati and Carneiro (2006)
AD/ <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu) / juvenil	4 h	X	X				X	X	X	Feitosa et al. (2013)
AD; M/ <i>Salmo salar</i> (salmão) / juvenil	4,5 h	X	X		X		X	X		Iversen et al. (1998)
AD/ <i>Rhamdia quelen</i> (jundiã) / juvenil	5 h	X								Parodi et al. (2014)
AD/ <i>Rhamdia quelen</i> (jundiã) / juvenil	6 h	X	X	X	X				X	Zeppenfeld et al. (2014)
AD/ <i>Labeo victorians</i> / juvenil	6 h	X	X				X			Oyoo-Okoth et al. (2011)
Percentual de utilização do marcador (%)		100	93	14	36	29	57	57	29	

Ambiente/espécie/fase de vida	Tempo	Cortisol	Glicose	Glicogênio	Lactato	Osmolalidade	Íons	Hematol.	Outros	Referência
Tempo longo										
M/ <i>Centropomus pararellus</i> (robalo) / juvenil	10 h		X		X					Tondolo et al. (2013)
AD/ <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui) / juvenil	10 h	X	X					X		Gomes et al. (2003)
AD/ <i>Cyprinus carpio</i> (carpa comum)/ adulto	12 h	X	X		X		X	X	X	Dob-Íková et al. (2006)
AD/ <i>Pimelodus maculatus</i> (mandi amarelo)/ juvenil	12 h	X								Braun and Nuñez (2014)
AD;M/ <i>Lates calcarifer</i> (perca gigante)/ juvenil	20 h						X	X	X	Paterson et al. (2003)
AD/ <i>Paracheirodon axelrodi</i> (cardinal tetra) / NI	24 h	X								Gomes et al. (2009)
AD/ <i>Potamotrygon cf. hystrix</i> (arraia cururu) / NI	24 h		X			X	X	X	X	Brinn et al. (2012)
M/ <i>Hippocampus abdominalis</i> (cavalo-marinho) / adulto	36 h	X	X		X					Wright et al. (2007)
M/ <i>Gadus morhua</i> (bacalhau) /juvenil	48 h	X								Treasurer (2012)
AD/ <i>Danio rerio</i> (paulistinha) / NI	72 h	X	X						X	Dhanasiri et al. (2013a)
AD/ <i>Danio rerio</i> (paulistinha) / NI	72 h	X	X						X	Dhanasiri et al. (2013b)
Percentual de utilização do marcador (%)		73	64	0	27	9	27	36	45	

Hematol. = marcadores hematológicos;

REFERÊNCIAS UTILIZADAS NA TABELA 2.1

- Abreu JSd, Sanabria-Ochoa AI, Gonçalves FD, Urbinati EC (2008) Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. *Ciência Rural*, **38**, 1413-1417.
- Acerete L, Balasch JC, Espinosa E, Josa A, Tort L (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, **237**, 167-178.
- Braun N, Nuñez APdO (2014) Stress in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) at different densities and times in a simulated transport. *Zoologia (Curitiba)*, **31**, 101-104.
- Brinn RP, Marcon JL, McComb DM, Gomes LC, Abreu JS, Baldisseroto B (2012) Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. histrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **162**, 139-145.
- Carneiro PCF, Urbinati EC (2002) Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International*, **10**, 221-229.
- Dhanasiri AKS, Fernandes JMO, Kiron V (2013a) Acclimation of Zebrafish to Transport Stress. *Zebrafish*, **10**, 87-98.
- Dhanasiri AKS, Fernandes JMO, Kiron V (2013b) Liver Transcriptome Changes in Zebrafish during Acclimation to Transport-Associated Stress. *PLoS ONE*, **8**, e65028.
- Dob-Íková R, Svobodová Z, Blahová J, Modrá H, Velí-Ek J (2006) Stress Response to Long Distance Transportation of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, **75**, 437-448.
- Feitosa KCdO, Povh JA, Abreu JSd (2013) Physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) treated with homeopathic product and submitted to transport stress. *Homeopathy*, **102**, 268-273.
- Gomes LC, Brinn RP, Marcon JL, Dantas LA, Brandao FR, de Abreu JS, Lemos PEM, McComb DM, Baldisserotto B (2009) Benefits of using the probiotic Efinol((R))L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquaculture Research*, **40**, 157-165.
- Gomes LC, Chagas EC, Brinn RP, Roubach R, Coppati CE, Baldisserotto B (2006) Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture*, **256**, 521-528.

- Gomes LC, Roubach R, Araujo-Lima CARM, Chippari-Gomes AR, Lopes NP, Urbinati EC (2003) Effect of Fish Density During Transportation on Stress and Mortality of Juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **34**, 76-84.
- Iversen M, Finstad B, Nilssen KJ (1998) Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, **168**, 387-394.
- Manuel R, Boerrigter J, Roques J, van der Heul J, van den Bos R, Flik G, van de Vis H (2014) Stress in African catfish (*Clarias gariepinus*) following overland transportation. *Fish Physiol Biochem*, **40**, 33-44.
- Marçalo A, Pousão-Ferreira P, Mateus L, Duarte Correia JH, Stratoudakis Y (2008) Sardine early survival, physical condition and stress after introduction to captivity. *Journal of Fish Biology*, **72**, 103-120.
- Oyoo-Okoth E, Cherop L, Ngugi CC, Chepkirui-Boit V, Manguya-Lusega D, Anisabwa J, Charo-Karisa H (2011) Survival and physiological response of *Labeo victorianus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient. *Aquaculture*, **319**, 226-231.
- Parodi T, Cunha M, Becker A, Zeppenfeld C, Martins D, Koakoski G, Barcellos L, Heinzmann B, Baldisserotto B (2014) Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem*, **40**, 323-334.
- Paterson BD, Rimmer MA, Meikle GM, Semmens GL (2003) Physiological responses of the Asian sea bass, *Lateolabrax niloticus* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, **218**, 717-728.
- Schreck CB, Jonsson L, Feist G, Reno P (1995) Conditioning improves performance of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. *Aquaculture*, **135**, 99-110.
- Tondolo JSM, Amaral LdP, Simoes LN, Garlet QI, Schindler B, Oliveira TM, Silva BFd, Gomes LdC, Baldisserotto B, Mallmann CA, Heinzmann BM (2013) Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology*, **11**, 667-674.
- Treasurer JW (2012) Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L. and stabilisation using buffering agents. *Aquaculture*, **330-333**, 92-99.
- Urbinati EC, Carneiro PCF (2006) Sodium chloride added to transport water and physiological responses of *Matrinxã Brycon amazonicus* (Teleost: Characidae). *Acta Amazonica*, **36**, 569-572.

- Urbinati EC, de Abreu JS, da Silva Camargo AC, Landinez Parra MA (2004) Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, **229**, 389-400.
- Wright KA, Woods CMC, Gray BE, Lokman PM (2007) Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Journal of Fish Biology*, **70**, 1447-1457.
- Zeppenfeld CC, Toni C, Becker AG, Miron DdS, Parodi TV, Heinzmann BM, Barcellos LJG, Koakoski G, Rosa JGSd, Loro VL, Cunha MAd, Baldisserotto B (2014) Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture*, **418–419**, 101-107.

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO ESTRESSE DE TRANSPORTE DE PEIXE MARINHO DE INTERESSE PARA A AQUARIOFILIA: *ABUDEFDUF SAXATILIS* (LINNAEUS, 1758).³

³Capítulo formatado segundo as normas da revista Fisheries Research;

RESUMO

Peixes ornamentais marinhos são em geral coletados no ambiente natural e sujeitos a transportes longos na maioria dos casos até o seu destino final. Este estudo utilizou parâmetros fisiológicos e bioquímicos para avaliar o estresse de transporte do peixe *Abudefduf saxatilis*, por três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h. Os parâmetros fisiológicos foram: osmolalidade, teor hídrico muscular e glicemia. Quanto aos bioquímicos foi medida a atividade das enzimas Anidrase Carbônica e anti-oxidantes glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Também foram avaliados os seguintes parâmetros da água: oxigênio dissolvido, amônia e pH. A mortalidade dos peixes foi de 22,06% e ocorreu para indivíduos com maior comprimento. Peixes com comprimento total inferior a 6 cm não morreram até o tempo máximo avaliado de 72 h. O parâmetro da água que mais apresentou relação com a mortalidade foi o pH. Não houve diferença significativa para os parâmetros fisiológicos comparando-se o grupo referência e os grupos experimentais. Apenas a enzima SOD apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo referência. Recomenda-se que o transporte para esta espécie seja realizado dentro de 24 horas e para espécimes de no máximo 6 cm de comprimento total.

Palavras-chave: *Abudefduf saxatilis*; estresse; transporte.

3.1 INTRODUÇÃO

O transporte de peixes vivos é um processo crucial para a aquariofilia. Para peixes ornamentais capturados no ambiente natural o processo do transporte até seu destino final é longo e estressante (Brinn et al. 2012). Quando se compara a exportação de peixes ornamentais de água doce e marinhos verifica-se que estes últimos apresentam menores quantidades de indivíduos exportados em função da maior dificuldade de manter os peixes vivos durante o transporte (Chow et al. 1994). Por exemplo, peixes coletados nas Filipinas e exportados para os Estados Unidos chegam a levar de 20 a 25 horas até Los Angeles e mais de 40 horas para chegarem à Nova Iorque (Rubec et al. 2001).

Para o transporte de peixes vivos são necessárias instruções específicas de acordo com a tolerância dos peixes em relação às alterações ambientais (Treasurer 2012). Para peixes ornamentais esses guias ainda não estão disponíveis em função da quantidade incipiente de pesquisas. Como exemplo, peixes provenientes de ambientes mais estáveis, como o bacalhau, podem ser menos capazes de se adaptarem às mudanças na água no transporte do que peixes adaptados às mudanças entre ambientes marinhos e dulcícolas, como é o caso do salmão, ou de peixes de poças de marés (Treasurer 2012).

A melhoria das técnicas de coleta a fim de minimizar danos ao ambiente e evitar a mortalidade, juntamente com protocolos de transporte adequados que mantenham a qualidade da água, devem fazer parte dos objetivos da indústria de peixes ornamentais marinhos (Bruckner 2005). Entretanto, poucas pesquisas relacionadas ao manuseio e transporte têm por objetivo avaliar as variáveis estressantes associadas aos peixes em si (Schreck et al. 1995), sendo que os objetivos são em geral voltados para avaliação do uso de anestésicos (Parodi et al. 2014; Tondolo et al. 2013; Zeppenfeld et al. 2014) ou condições menos estressantes para o transporte, como por exemplo a densidade (Carneiro and Urbinati 2002; Tenningen et al. 2012; Urbinati et al. 2004). Conforme verificado no capítulo 2, pesquisas que tem por objetivo avaliar o transporte longo de peixes coletados no ambiente natural, como é o caso dos ornamentais marinhos, são menos realizadas.

Para peixes ornamentais marinhos, as respostas fisiológicas, a tolerância à deterioração da água e ao choque térmico que ocorrem durante o transporte não são bem documentados (Chow et al. 1994). Em consequência, em função do crescente interesse pelos peixes ornamentais marinhos, com o consequente aumento da pressão de captura em relação às espécies que estão no ambiente natural, o objetivo deste trabalho foi avaliar respostas fisiológicas e bioquímicas do peixe *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus, 1758) ao estresse associado ao transporte. É uma espécie com grande disponibilidade na costa brasileira, aspecto atraente esteticamente, e potencial relevância comercial.

A informação científica acerca do transporte de peixes é necessária não só do ponto de vista comercial mas também para a gestão governamental da atividade. A compreensão do que ocorre fisiologicamente com estes organismos poderá auxiliar a melhora das falhas existentes na legislação, conforme descrito no capítulo 1.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 ESCOLHA E OBTENÇÃO DOS PEIXES

A espécie foi escolhida em função de ser um peixe nativo do Brasil com possibilidade de captura diretamente na praia, o que propiciou a obtenção. Outro ponto relevante foi decorrente da necessidade de obtenção de dados de populações selvagens de peixes. Além disso, *A. saxatilis* possui extensa distribuição o que permite que dados sejam obtidos em outros locais, possibilitando uma melhor discussão.

Os peixes utilizados foram capturados em Santa Catarina, município de Bombinhas, praia da Sepultura (27° 8'28" S e 48° 28'42" W, Figura 1), através do uso de uma rede confeccionada para a coleta. Foram feitas duas tentativas de coleta, uma em agosto e outra em setembro de 2013 (Figura 2A), porém em função das condições climáticas adversas não foi possível a captura dos peixes. Os exemplares de *A. saxatilis* foram coletados entre os dias 28/10/2013 e 09/04/2014.

O comprimento total dos peixes capturados variou entre 3,4 e 18,2 cm. Tal variação foi decorrente da metodologia da coleta que consistiu em cercar os peixes com a rede de pesca e capturá-los manualmente ou com redinhas de aquário, tentando-se evitar ao máximo o estresse no ato da coleta (Figura 2B). Todos os indivíduos capturados foram aproveitados, não sendo separados por faixas de tamanho. Após a coleta os peixes foram acondicionados individualmente em embalagens plásticas transparentes tipo PEBD (Poliétileno de Baixa Densidade) contendo água do mar. As embalagens plásticas utilizadas foram de dois tamanhos (menor: 12cm X 33 cm e maior 24cm X 34 cm, ambos com 0,2 mm de espessura) para se alcançar uma relação mais próxima entre a quantidade de água do mar e o tamanho dos peixes capturados. Foi injetado oxigênio puro nestas embalagens, mantendo-se a proporção aproximada de 1/3 de água para 2/3 de oxigênio. As embalagens foram fechadas utilizando elásticos de borracha (Figura). Os peixes embalados foram transportados em caixas térmicas de isopor até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO), na Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba.

O Projeto de Pesquisa foi realizado em colaboração entre os Laboratórios de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO - Departamentos de Fisiologia) e de Toxicologia Ambiental (LTA - Departamento de Farmacologia). Ambos estão instalados no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).



FIGURA 3.1: Área onde foram coletados os peixes, no município de Bombinhas, Estado de Santa Catarina, Praia da Sepultura.



FIGURA 3.2: Coleta dos peixes: A) Tentativa de coleta sem a obtenção de indivíduos em função das condições climáticas; B) Utilização da rede para cercar os peixes para coleta em dia com condições climáticas favoráveis.



FIGURA 3.3: Peixe embalado após a coleta.

3.2.2 VERIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

No instante da coleta foi medido o oxigênio dissolvido, o pH e a salinidade da água do mar. Para cada peixe embalado foram medidos no momento do processamento o oxigênio dissolvido, o pH e o volume de água do mar contido na embalagem. Foi congelada uma amostra de água de cada embalagem para medir a amônia. Após o descongelamento da água de cada embalagem, a amônia foi medida utilizando-se o kit comercial da AlphaKit com leitura de absorvância a 505 nm em espectrofotometro (ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

3.2.3 PROCESSAMENTO DOS PEIXES

O tempo de simulação do transporte foi contado a partir do momento de embalagem dos peixes em campo. De cada coleta foi separada aproximadamente a mesma quantidade de peixes para cada grupo experimental. Para realização das análises os peixes foram anestesiados com

benzocaína (80 mg/litro de água, 3-4 min de anestesia), até não apresentarem movimentos natatórios. Em seguida o sangue colhido via veia caudal com seringas heparinizadas e os animais foram eutanasiados via secção medular. Logo após a retirada, o sangue foi utilizado para medir a glicemia e o restante foi centrifugado em 2.100xg por 5 minutos. As amostras de plasma foram mantidas em freezer -20°C para dosagens posteriores. Na sequência, os peixes foram pesados (peso total), medidos (comprimento total) e os tecidos - 4 arcos branquiais, o fígado e um fragmento de músculo foram retirados e acondicionados em criotubos e imediatamente congelados em ultrafreezer a -80°C, e mantidos até o momento dos ensaios enzimáticos e análises fisiológicas. Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o certificado de número 761 em 13 de fevereiro de 2014.

3.2.4 GRUPO REFERÊNCIA

Para efeito de comparação dos dados obtidos dos peixes transportados com outro grupo de animais não sujeitos ao estresse do transporte, peixes foram coletados e mantidos por aproximadamente sete dias em aquário estoque de 20 litros no laboratório. Durante o período de manutenção, os peixes foram alimentados com ração em flocos uma vez ao dia. Após este período, foram processados exatamente como descrito acima para os animais experimentais. A escolha deste procedimento foi decorrente da observação que o processo de coleta acarretava estresse nos peixes, impossibilitando que peixes processados logo após a captura, na própria praia, fossem utilizados como controle.

Foi observado que, após colocados no aquário, os peixes do grupo referência recobravam em poucas horas as características perdidas durante a captura e o transporte, e que são indicativos de estresse: a cor escurecida, o padrão de natação irregular, e o desinteresse pelo alimento.



FIGURA 3.4: Peixes coletados e mantidos em aquário estoque para obtenção de dados do grupo referência.

3.2.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O sangue foi utilizado imediatamente após a retirada do animal para medir a glicose e o plasma que estava congelado a -20°C foi mantido em gelo para o descongelamento gradual a fim de se medir a osmolalidade.

Amostras de fígado foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) sendo centrifugadas a 15000 g por 30 min a 4°C e aliqüotadas para as análises enzimáticas. As amostras de brânquias foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 10%P/V (peso/volume) juntamente com tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. Após o preparo o homogeneizado foi centrifugado a aproximadamente 2.000xg (5 minutos em temperatura ambiente) para a precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi separado em aliqüotas que serviram para a dosagem da concentração da proteína total e para a quantificação da atividade da enzima Anidrase Carbônica.

3.2.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

3.2.6.1 DOSAGENS PLASMÁTICAS

A osmolalidade do plasma sangüíneo foi determinada através da leitura de amostras de plasma sem diluição em micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor® 5520 VAPRO.

3.2.6.2 TEOR HÍDRICO MUSCULAR

A porcentagem de água foi determinada nos músculos, nas amostras descongeladas e pesadas (peso úmido) em tubos eppendorf em balança analítica (Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1 mg, Brasil). Na sequência os fragmentos de músculo foram transferidos para estufa (BIOPAR S22ST) a 60°C por 24 h para que ocorresse a desidratação. Após este período os tecidos foram novamente pesados (peso seco) e a perda de água (peso perdido na estufa) foi expressa como porcentagem do peso inicial da amostra (peso úmido).

3.2.6.2 GLICEMIA

A glicemia foi medida utilizando-se diretamente sangue obtido da veia caudal, colocando-se uma gota em tiras para leitura através do aparelho digital Accu-Chek® (Roche) modelo Performa Nano.

3.2.6.3 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

3.2.6.3.1 ANIDRASE CARBÔNICA

A atividade da anidrase carbônica branquial foi determinada pelo método descrito por Vitale(1999), que consiste na quantificação da atividade desta enzima pela reação com manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM). O cálculo da atividade da anidrase carbônica (AAC) foi realizado através da fórmula: $AAC = [TC/(TNC - 1)]/mg$ de proteína total, onde TC corresponde à taxa da reação catalisada e TNC à taxa de reação não catalisada.

As brânquias foram pesadas para que fosse calculado para cada amostra o volume de tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a ser utilizado. Na sequência, procedeu-se a homogeneização do tecido com o tampão e o homogeneizado foi centrifugado a aproximadamente 2000xg (5 minutos, temperatura ambiente). Foram separadas alíquotas distintas para a dosagem da concentração da proteína total e para a quantificação da atividade da enzima a partir do sobrenadante. A quantificação da atividade da enzima foi obtida através da adição do sobrenadante do homogeneizado tecidual e de água destilada saturada com CO₂ em um meio de reação contendo manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4. Imediatamente após a adição do sobrenadante, que resulta na queda do pH, foram anotados os valores de pH (pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW®) a cada 4 segundos até totalizar 20 segundos. Foi mantida a temperatura de $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante a reação. Os valores obtidos deram origem a uma reta de regressão linear do pH em relação ao tempo que determina taxa da reação catalizada (TC) pela enzima no homogeneizado tecidual. Para a determinação da taxa de reação não catalizada (TNC), foi realizado o “branco” que consistiu no mesmo procedimento utilizando-se o tampão sem o homogeneizado tecidual. A determinação do branco foi realizada em 8 réplicas, sendo uma no início do procedimento, uma a cada cinco leituras de amostras e uma ao final.

3.2.6.3.2 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Para análise da glutatona S-transferase (GST) foi seguido o protocolo proposto por KEEN et al. (1976). Foram utilizados 30 μl da amostra (homogeneizado tecidual de fígado) diluída e 180 μl da solução de reação. A solução de reação foi preparada com conjugação do substrato 1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 60mM, GSH 10mM e tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5, com quantidades determinadas de acordo com o número de amostras. A cinética da enzima foi determinada em microplaca, em triplicatas lidas em 340 nm (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH) durante 180 segundos, com leituras em intervalos de 15 segundos.

3.2.6.3.4 CATALASE

A atividade da Catalase foi medida conforme o método descrito por Aebi(1984). Foram utilizados 30 μL da amostra (homogeneizado tecidual de fígado) diluídos em 150 μL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, obtendo-se a diluição de 1:5. Em seguida, 10 μL da solução diluída foram acrescidos a 990 μL da solução reação composta por peróxido de hidrogênio 30% em solução tampão Tris – EDTA pH 8,0. A leitura foi feita em espectrofotômetro verificado pela diminuição da absorbância a 240 nm durante 60 segundos. Para cada amostra a leitura foi feita em triplicata e os resultados expressos em μmol de H_2O_2 consumido.min⁻¹.mg de proteína que quantificam a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio resultando em O_2 e água.

3.2.6.3.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi estimada através da capacidade da enzima de inibir a auto-oxidação do ácido pirogálico(Gao et al. 1998), com detecção da absorbância em espectrofotômetro a 440 nm. Foram diluídas alíquotas de 20 μL da amostra (homogeneizado tecidual de fígado) na proporção de 1:10 em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0. Após a diluição, 40 μL foram transferidos para um novo tubo e 885 μL de tampão Tris – EDTA pH 8,0 foram adicionados e agitados em vórtex. Na sequência, acrescentou-se 50 μL de ácido pirogálico e as amostras foram incubadas por 30 min. Após esse tempo, 25 μL de HCl 1N foram adicionados a fim de parar a reação. As amostras foram analisadas em triplicatas de 300 μL na microplaca, realizada a leitura da absorbância. Para se ter um parâmetro como controle da reação, foi feito o mesmo procedimento com 40 μL de cada amostra, sem o tempo de incubação antes da leitura. A quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição foi descrita como uma unidade de SOD e sua atividade foi expressa em U de SOD. mg de proteína⁻¹.

3.2.6.3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais de fígado foi determinada com base no protocolo descrito por BRADFORD (1976). Foi utilizada uma curva padrão de soro de albumina bovina e as dosagens foram realizadas em triplicatas em microplacas utilizando o reagente Bio-RadProteinAssay da Bio-RadLaboratories®. As amostras foram lidas em 620nm (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH) e o resultado expresso em mg.mL^{-1} .

3.2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o software SigmaPlot® versão 11.0. O nível de significância adotado foi de 0,05 para todos os resultados. Foi feita a análise de variância de uma via, comparando-se os o grupo referência e os diferentes tempos experimentais (24, 48 e 72 h). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade e homogeneidade de variâncias dos conjuntos de dados. Quando o teste indicava a não normalidade ou não homogeneidade das variâncias, o programa sugeria a realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média para os dados paramétricos e mediana \pm 1 quartil para os não-paramétricos. Quando a diferença entre os grupos foi significativa, foi utilizado o teste *post hoc* de Tukey (para os dados paramétricos) e o teste de Mann-Whitney (para os dados não paramétricos) para identificar quais grupos eram diferentes. O teste-t de Student (ou Mann-Whitney) foi utilizado para a análise pareada entre o tamanho do grupo de peixes vivos, que foram utilizados no experimento, e os peixes que morreram. Correlações de Pearson foram utilizadas para verificação de associação entre variáveis, também com limite de significância em 0.05.

3.3 RESULTADOS

3.3.1. TAMANHO DOS PEIXES ANALISADOS E MORTALIDADE

Para os dados da presente pesquisa foram utilizados 68 peixes ao total, sendo que destes 15 (22,06%) morreram antes do processamento, dentro das embalagens plásticas individuais (Figura 5). Para os demais grupos o n foi de 16 (23,53%), para 24 horas, 13 (19,12%) para 48 e 72 horas, e 11 (16,17%) para o grupo referência. O comprimento dos peixes vivos variou entre 3,4 e 14,2 cm e dos mortos entre 6,4 e 18,2 cm de comprimento total. O peso total dos peixes vivos variou entre 0,75g e 54g e dos mortos entre 4,5g e 125g. Diante da percepção de que os indivíduos de maior tamanho morreram antes que fosse possível a obtenção de seus dados fisiológicos e que o aumento do peso era proporcionalmente muito maior, foi elaborada a Figura 6. Na Figura 6 é possível observar que a relação peso/comprimento evidenciou 2 grupos, com separação em ~7-8 cm. Regressões lineares mostraram o grande salto no aumento de peso a partir deste comprimento. Foi demonstrada a tendência à morte, nos experimentos de confinamento individual em embalagem plástica, dos indivíduos maiores (Figura 6). Vê-se que o coeficiente angular das retas muda de 0,27 para 0,50 entre os vivos e os mortos, que são maiores, mostrando o drástico aumento de peso em relação ao comprimento, nos peixes a partir de ~7-8 cm.

Outra forma de mostrar que os maiores de 7-8 cm tendem a morrer após 24-48 horas foi elaborada na Figura 7. Peixes abaixo de 6 cm sobreviveram ao transporte e acima de 8 cm apenas um indivíduo (de 14,2 cm) sobreviveu (Figura 7). Ocorreu uma clara variabilidade intra-específica na faixa entre 6-8 cm, que concentrou quantidades próximas de vivos e mortos. Nota-se outro exemplo de variabilidade intra-específica que foi um indivíduo de 14,2 cm que sobreviveu ao transporte (estatisticamente um “outlier”).

Comparando-se os grupos de peixes vivos e mortos foi verificado que houve diferença estatística significativa entre o comprimento total dos dois grupos (FIGURA 7).



FIGURA 3.5: Detalhe de peixe morto antes do início do processamento.

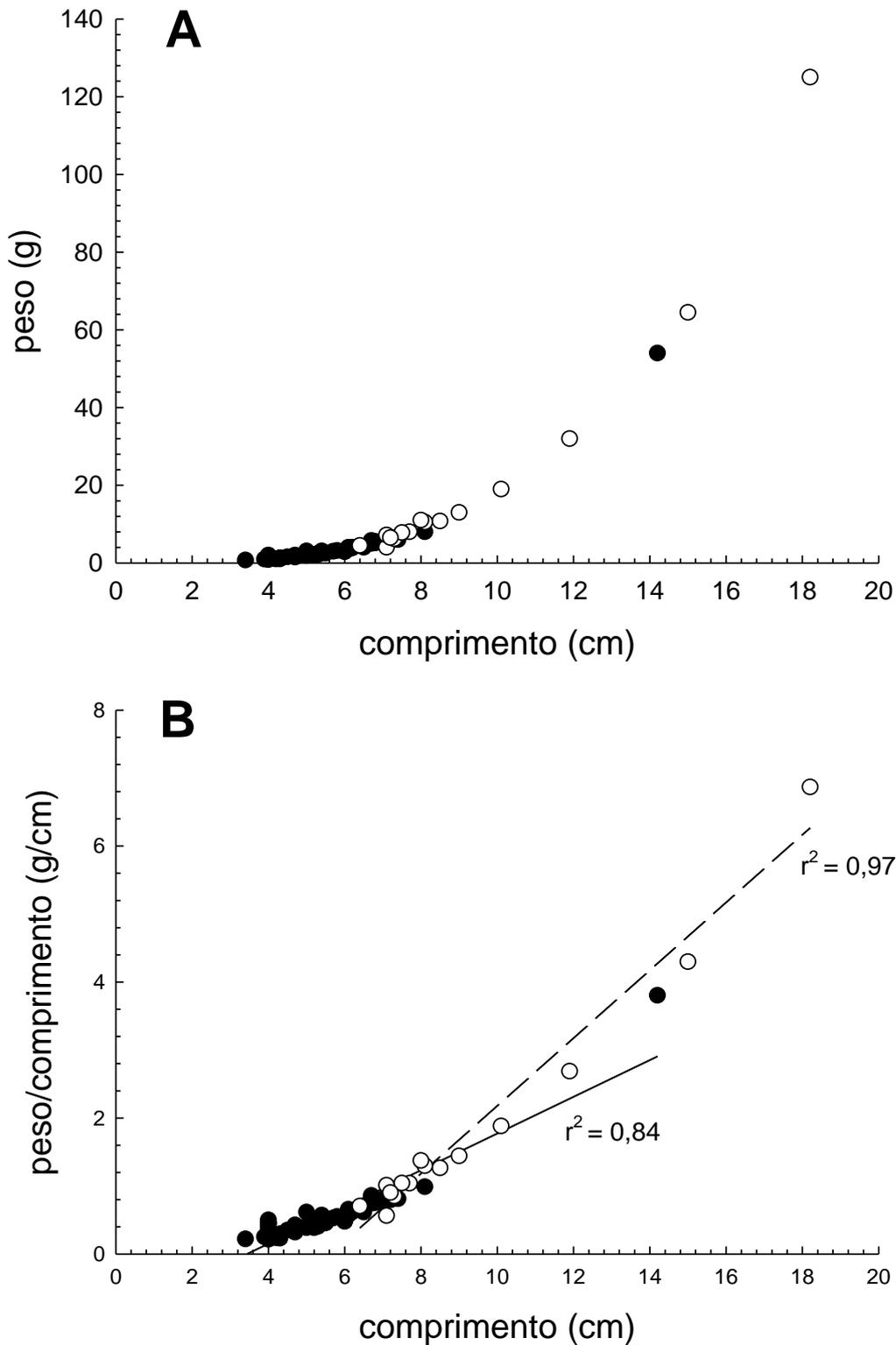


FIGURA 3.6: Relação entre peso total (g) e comprimento total (cm) dos *Abudedefduf saxatilis* utilizados neste estudo. A: peso (g) em função do comprimento (cm) dos peixes. Círculos pretos, animais vivos (n= 53) ao final dos experimentos; círculos brancos, animais mortos (n= 15). B: relação peso/comprimento versus comprimento dos peixes, com retas de regressão linear traçadas para os vivos e os mortos, separadamente, e indicação do coeficiente r^2 das retas.

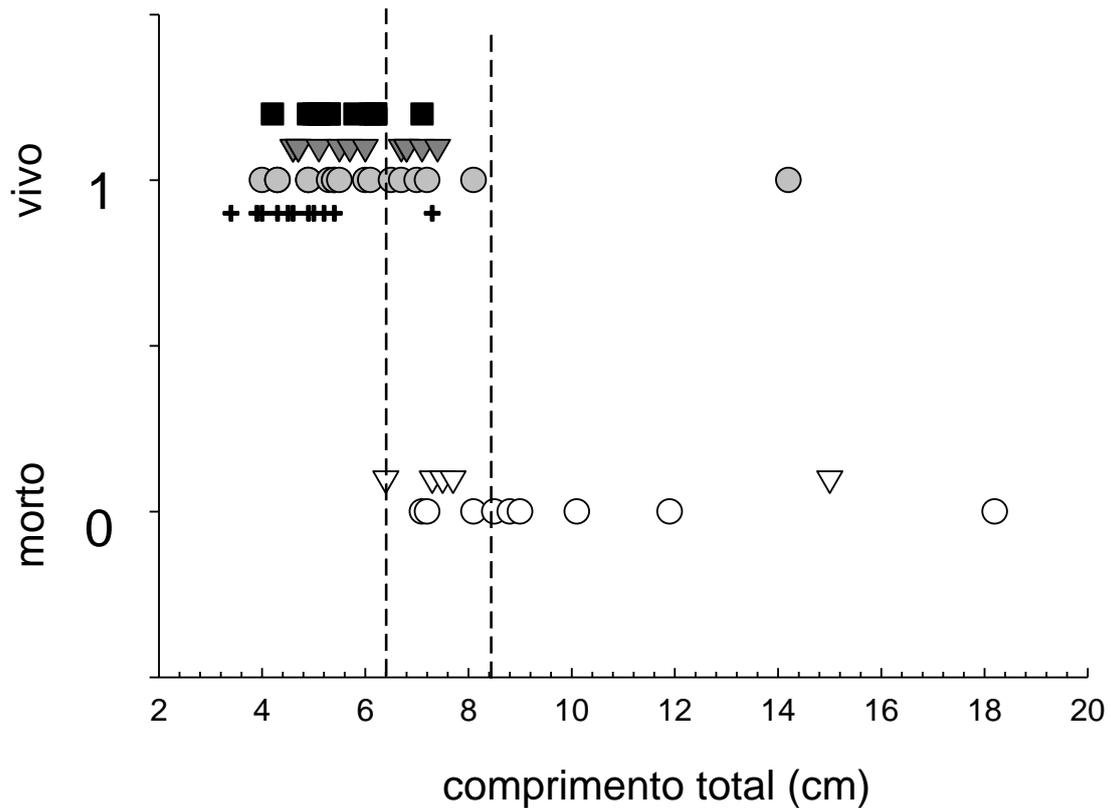


FIGURA 3.7: Comparação entre o comprimento total dos peixes *Abudedefduf saxatilis* vivos (n= 53) e mortos (n= 15). As linhas tracejadas indicam a faixa de tamanho acima da qual os peixes passam a não tolerar o transporte (~6-8 cm de comprimento total), ou a chance de morrerem é muito grande. Símbolos brancos, animais mortos, símbolos preenchidos, animais vivos. Círculos, Vivos 24 h, triângulos invertidos, 48 h, quadrados, e 72h. Mortos entre 0-24h e entre 24-48 h.

3.3.2 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DURANTE O TRANSPORTE

A amônia ($N-NH_3$), o oxigênio dissolvido (OD) e o pH foram medidos na água da embalagem de cada animal utilizado durante o experimento, incluindo os que morreram, logo após a retirada do animal. Os valores de amônia variaram entre 0,075 e 0,162 mg/L para o grupo referência, 0,205 e 2,1065 mg/L para os peixes vivos e 0,190 e 1,269 mg/L para os mortos. Os valores de OD para o grupo referência variaram de 4,4 a 8,3 mg/L, 2,1 a 8,7 mg/L para o grupo de 24 h, 3,1 a 7,3 mg/L para o grupo de 48 h e 2,7 a 6,8 mg/L para o grupo de 72 h. Os peixes mortos tiveram uma variação de OD entre 1,1 a 8,5 mg/L. O pH para o grupo referência se manteve em 7,6, e variou de 5,7 a 7 para o grupo de 24 h, 5,9 a 6,8 para o grupo de 48 h e 6,1 a 7 para o grupo de 72 h. Para os peixes que morreram o pH variou de 5,6 a 6,6.

A Figura 8 apresenta os valores dos 3 parâmetros analisados (amônia, OD e pH) em relação ao comprimento dos animais. Foram traçadas retas de regressão linear e calculadas as correlações de Pearson entre cada variável e o comprimento dos peixes, separadamente para os vivos e os mortos. As correlações significativas foram apenas da amônia x cm, para os mortos, e do pH x cm, para os vivos. Em ambos os casos, correlações negativas.

Os parâmetros da água foram ainda analisados par a par, na Figura 9. Nesta análise foram calculadas apenas as correlações de Pearson, novamente de forma separada entre os peixes vivos e os mortos. As correlações significativas ocorreram apenas para os peixes vivos, e com o parâmetro pH. Houve correlação positiva entre o pH e o OD, e negativa entre o pH e a amônia (Figura 9). Os 3 parâmetros foram ainda plotados, novamente separadamente os peixes vivos dos mortos, em gráfico 3-D. Na Figura 10, com dados dos 3 tempos de exposição nos sacos plásticos, e na Figura 11, apenas com os peixes vivos e os mortos após 24 horas nos sacos plásticos.

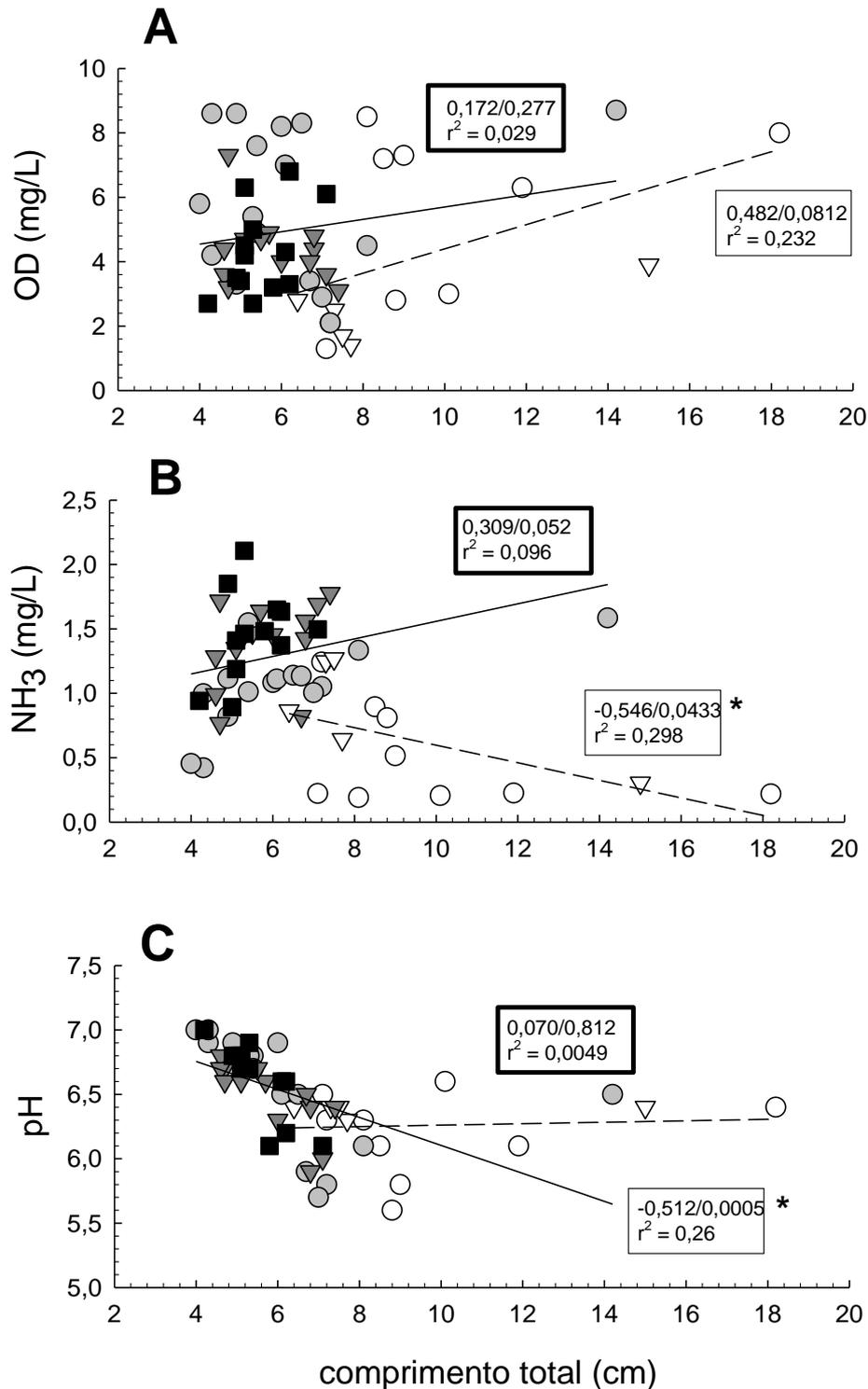


FIGURA 3.8: Relação entre o comprimento total dos peixes *Abudefduf saxatilis* analisados e os valores de oxigênio dissolvido em mg/L (A), amônia em mg/L (B) e pH (C) na água da embalagem plástica. Símbolos brancos: animais mortos (n= 15), símbolos preenchidos: animais vivos (n= 53). Círculos, 24 h; triângulos invertidos, 48 h; e quadrados, 72h. A linha contínua indica a regressão linear entre o parâmetro ambiental da água e o comprimento dos peixes vivos; a linha tracejada indica a regressão linear para os peixes que morreram. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson e da probabilidade estão mostrados junto das retas de regressão, nas caixas de texto. As caixas de texto com linhas mais espessas indicam os valores dos peixes vivos. O asterisco indica onde a correlação foi significativa.

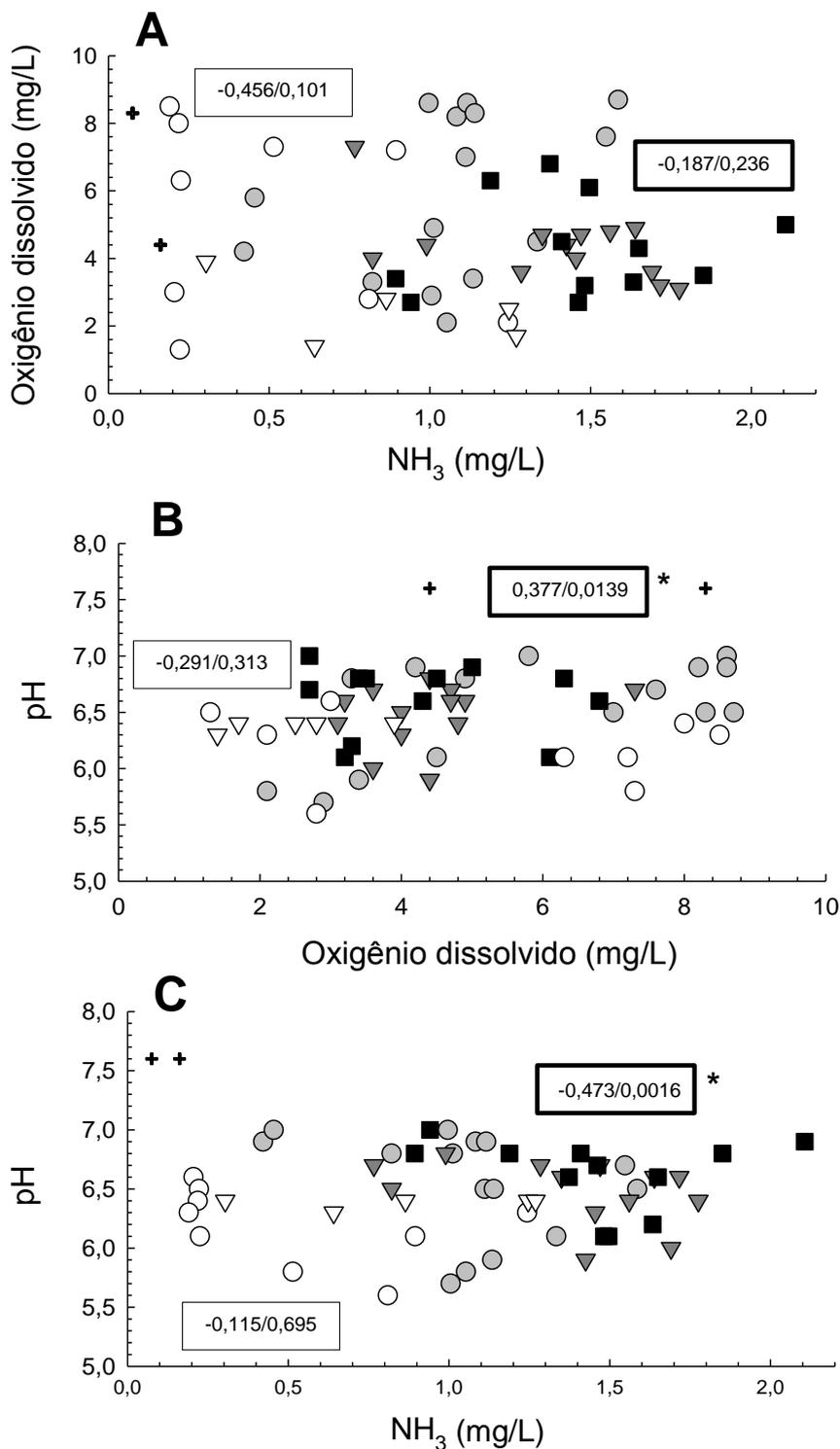


FIGURA 3.9: Relação entre os pares de parâmetros ambientais avaliados na água da embalagem plástica. A: oxigênio dissolvido (OD, mg/L) x amônia (NH₃, mg/L); B: pH x OD; C: pH x NH₃. Símbolos brancos: animais mortos (n= 15), símbolos preenchidos: animais vivos (n= 53). Círculos, 24 h; triângulos invertidos, 48 h; e quadrados, 72h. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson e da probabilidade de significância estão mostrados nas caixas de texto junto aos símbolos. As caixas de texto com linhas mais espessas indicam os valores dos peixes vivos. Os asteriscos indicam as correlações significativas.

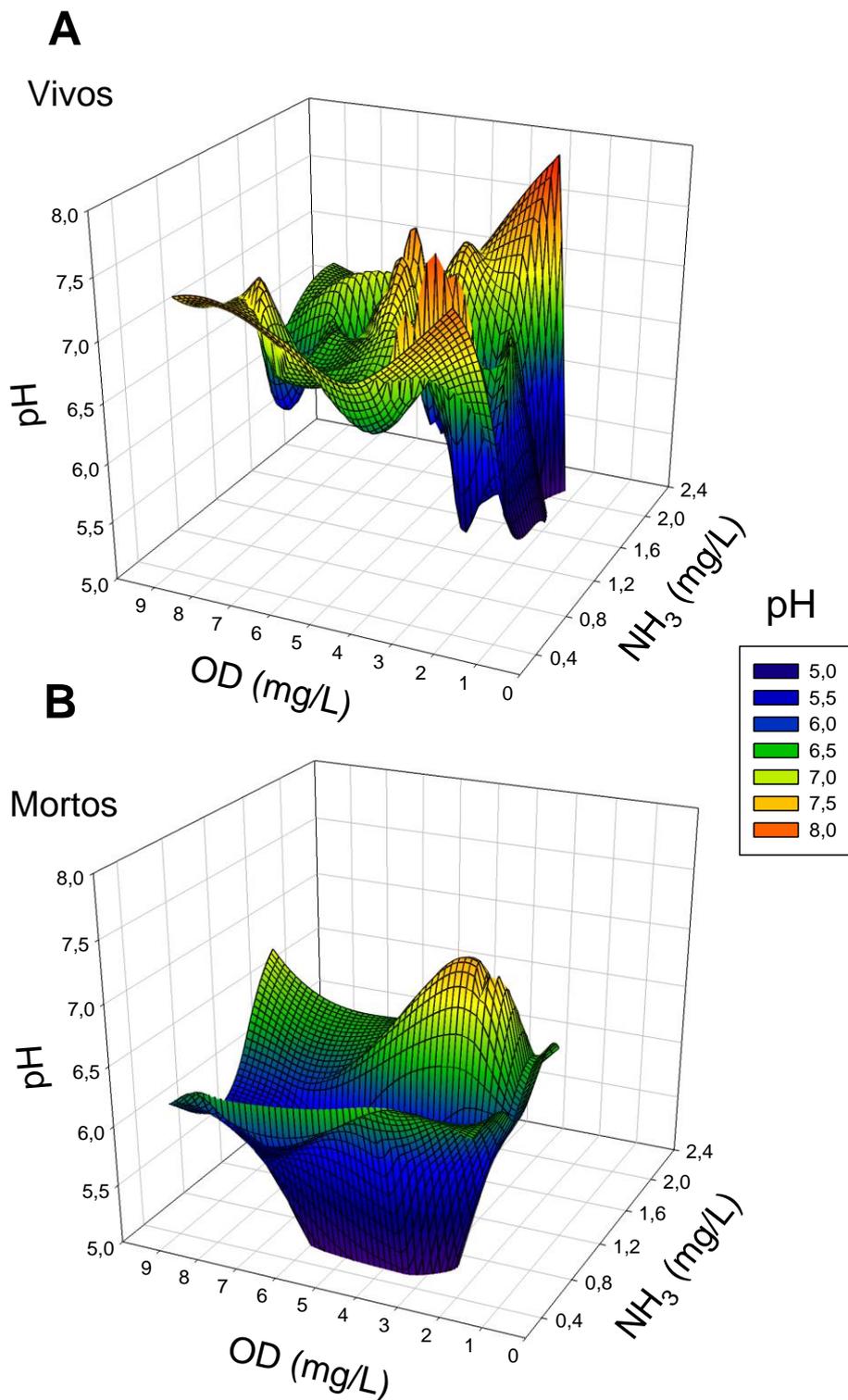


FIGURA 3.10: Gráficos tri-dimensionais com valores de NH_3 x OD x pH da água das embalagens de transporte, para peixes vivos (A) ($n=53$) e mortos (B) ($n=15$), utilizando todos os dados do estudo. A legenda indica o código de cores para as interpolações dos valores de pH.

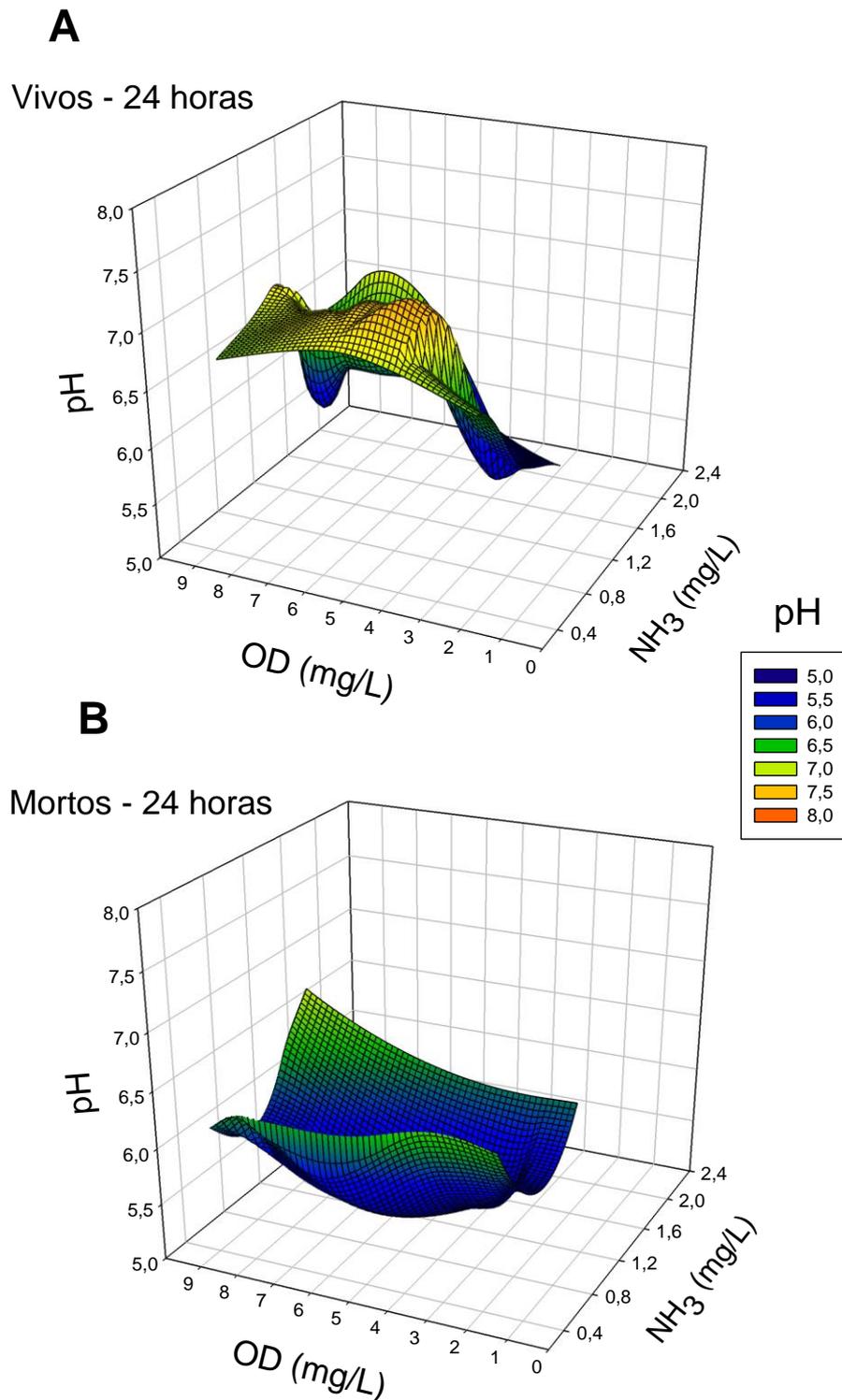


FIGURA 3.11: Gráficos tri-dimensionais com valores de NH₃ x OD x pH da água das embalagens de transporte, para peixes vivos (A) (n= 14) e mortos (B) (n= 9), apenas para os dados de 24 horas dentro da embalagem plástica. A legenda indica o código de cores para as interpolações dos valores de pH.

3.3.3 OSMOLALIDADE

Para os valores de osmolalidade plasmática, a variação geral ficou entre 187 e 354 mOsm/kg H₂O. No grupo referência os valores foram entre 187 e 317 mOsm/kg H₂O, no 24 h entre 232 e 312 mOsm/kg H₂O, no 48 h entre 188 e 354 mOsm/kg H₂O e no 72 h entre 187 e 295 mOsm/kg H₂O. Não houve diferença significativa entre o grupo referência e os tempos experimentais e nem entre os tempos experimentais entre si (Figura 11 A).

3.3.4. TEOR HÍDRICO MUSCULAR

A porcentagem de hidratação muscular variou entre 75,43 e 83,67%. No grupo referência a variação foi entre 75,43 e 80,76%, no 24 h entre 76,91 e 81,29% , no 48 h entre 76,71 e 83,67% e no 72 h entre 76,93 e 79,87%. Assim como ocorreu para osmolalidade, não houve diferença significativa entre o grupo referência e os tempos experimentais e nem entre os tempos experimentais entre si (Figura11 B).

3.3.5. GLICEMIA

Os valores de glicemia apresentaram uma variação geral entre 45 e 458 mg/dL. Para grupo referência a variação foi entre 45 e 90 mg/dL, no 24 h entre 31 e 458 mg/dL , no 48 h entre 32 e 250 mg/dL e no 72 h entre 35 e 103 mg/dL. Pode-se verificar a mesma situação ocorrida para osmolalidade e teor hídrico muscular: a ausência de diferença significativa entre o grupo referência e os tempos experimentais e entre os tempos experimentais entre si (Figura 11 C). Foi possível observar, entretanto, que para a glicemia os valores de maior variação no tempo de 24 h foram mais acentuados, acarretando um erro padrão maior do que para os outros parâmetros.

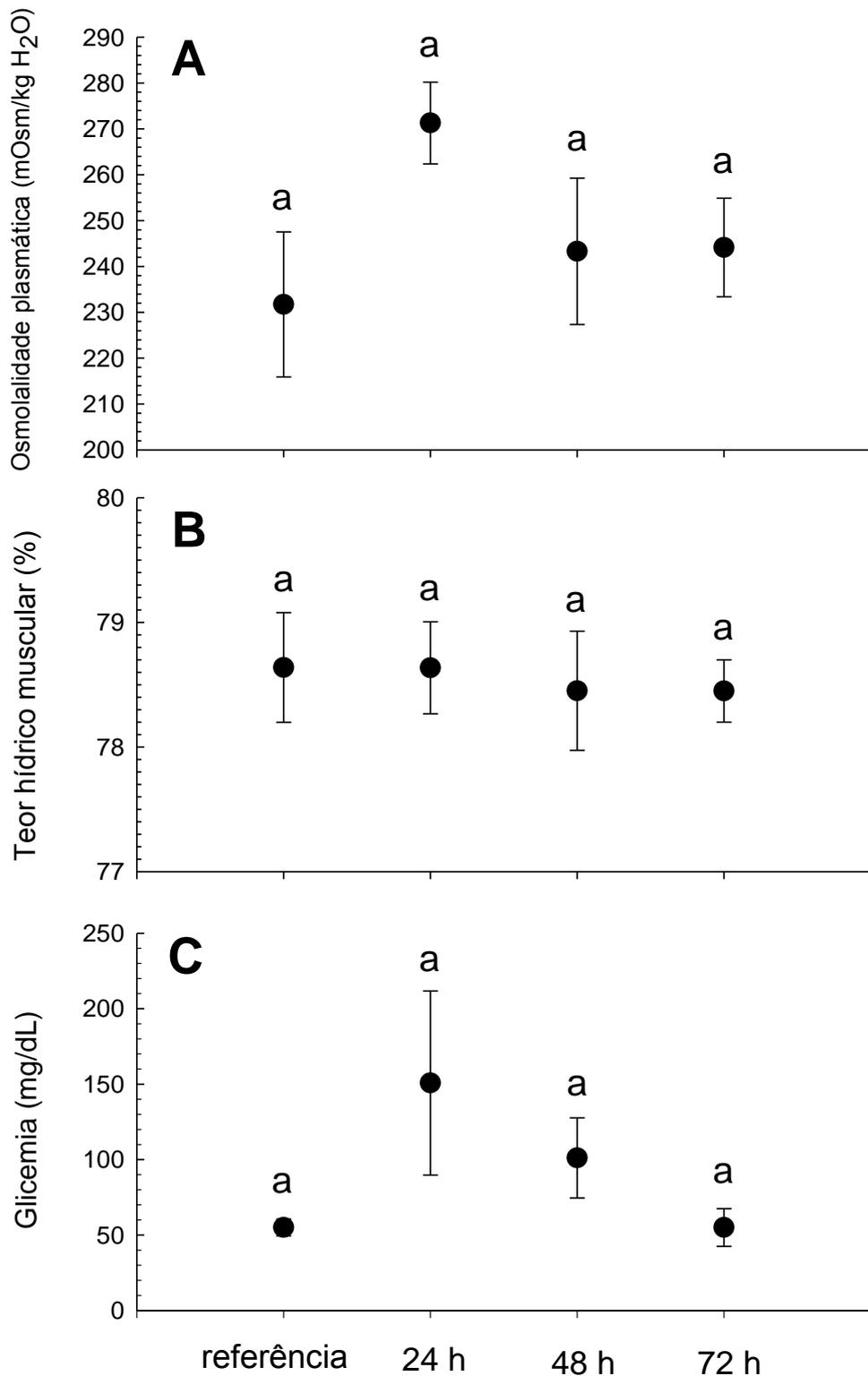


FIGURA 3.12: Parâmetros fisiológicos em *Abudedefduf saxatilis*, no grupo referência (n=) e nos grupos mantidos vivos por 24, 48 ou 72 horas nas embalagens plásticas simulando transporte. A: Osmolalidade plasmática (mOsm/kg H₂O) (Referência n= 7; 24 h n= 7; 48 h n=10; 72 h n=6), B: teor hídrico muscular (%) (Referência n= 11; 24 h n= 13; 48 h n=13; 72 h n=12), C: glicemia (mg/dL) (Referência n= 7; 24 h n= 7; 48 h n= 10; 72 h n= 6).

3.3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.3.6.1 ANIDRASE CARBÔNICA

A atividade específica da anidrase carbônica branquial variou entre 15,45 e 70,76/mg proteína, e não foi alterada pelo tempo de permanência nas embalagens plásticas simulando o transporte. Os valores para o grupo referência variaram entre 17,22 e 70,76/mg proteína, para o grupo de 24 h entre 16,72 e 58,52/mg proteína, para o grupo de 48 h entre 15,49 e 26,19/mg proteína e para o grupo de 72 h entre 15,45 e 28,22 /mg proteína.

3.3.6.2 ENZIMAS ANTI-OXIDANTES

As atividades enzimáticas de glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram analisadas no fígado dos peixes no grupo referência e nos três tempos experimentais (24, 48 e 72 horas).

Os resultados das atividades específicas das enzimas glutathione-S-transferase (GST) e catalase (CAT) indicaram que não houve diferenças significativas entre os animais do grupo referência e dos três tempos experimentais. As unidades para GST e CAT estão expressas em ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) e para SOD em ($\text{U}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$). Os valores de GST variaram entre no geral 140,81 e 309,31; para o grupo referência entre 140,81 e 261,09; para o tempo experimental de 24 h entre 186,05 e 309,31; para o tempo experimental de 48 h entre 141,30 e 265,33; e para o tempo experimental de 72 h entre 140,81 e 261,57. Os valores de CAT variaram entre no geral 23,23 e 198,03; para o grupo referência entre 37,06 e 122,6; para o tempo experimental de 24 h entre 42,18 e 198,03; para o tempo experimental de 48 h entre 50,68 e 69,53; e para o tempo experimental de 72 h entre 23,23 e 70,38. Para a enzima super-óxidodismutase (SOD) houve diferença significativa entre o grupo referência e os grupos experimentais, porém não houve diferença entre os grupos em si. Apenas a SOD hepática foi afetada pelo tempo de permanência nas embalagens plásticas. Os valores de SOD variaram

entre no geral 36,75 e 195,52; para o grupo referência entre 82,76 e 195,52; para o tempo experimental de 24 h entre 36,75 e 103,92; para o tempo experimental de 48 h entre 68,74 e 100,52; e para o tempo experimental de 72 h entre 49,61 e 90,48.

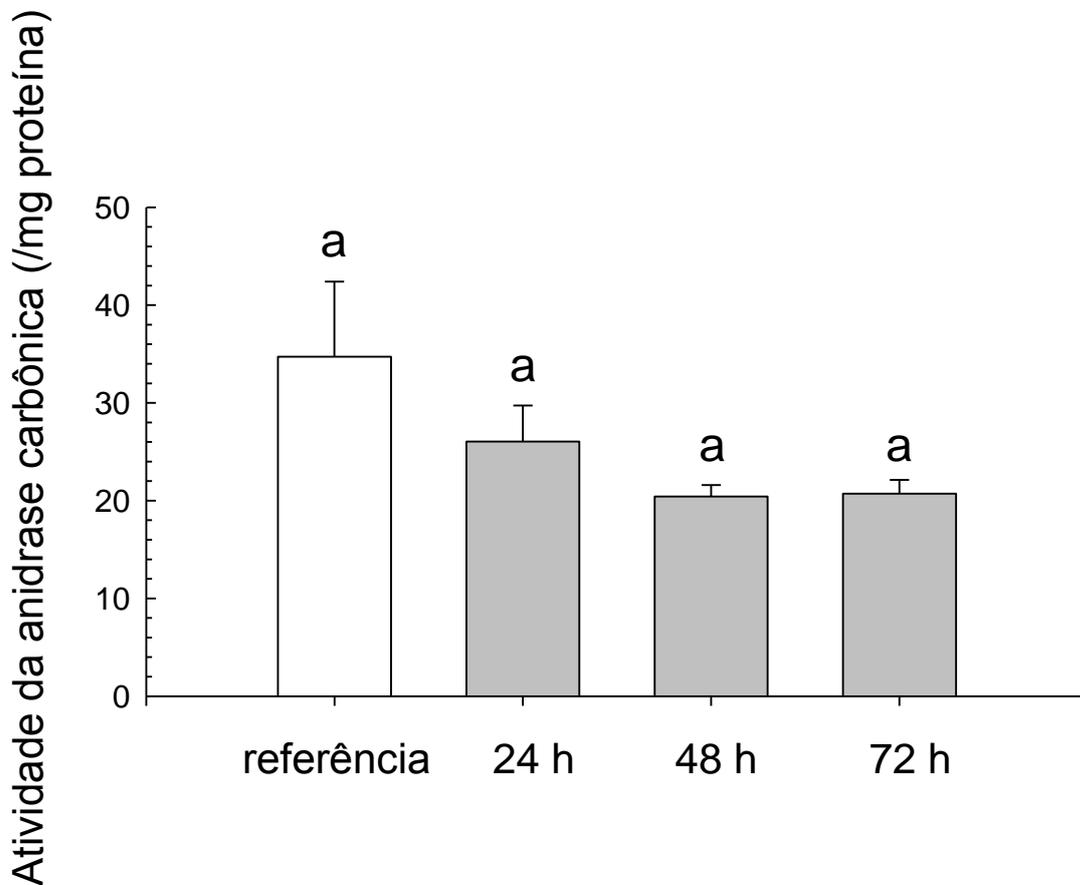


FIGURA 3.13: Atividade específica da anidrase carbônica branquial (/mg proteína) em *Abudedefduf saxatilis* do grupo referência e após 24, 48 e 72 horas de permanência em embalagens plásticas, simulando transporte (Referência n= 8; 24 h n= 12; 48 h n=10; 72 h n=10). Não houve diferença significativa entre os 4 grupos.

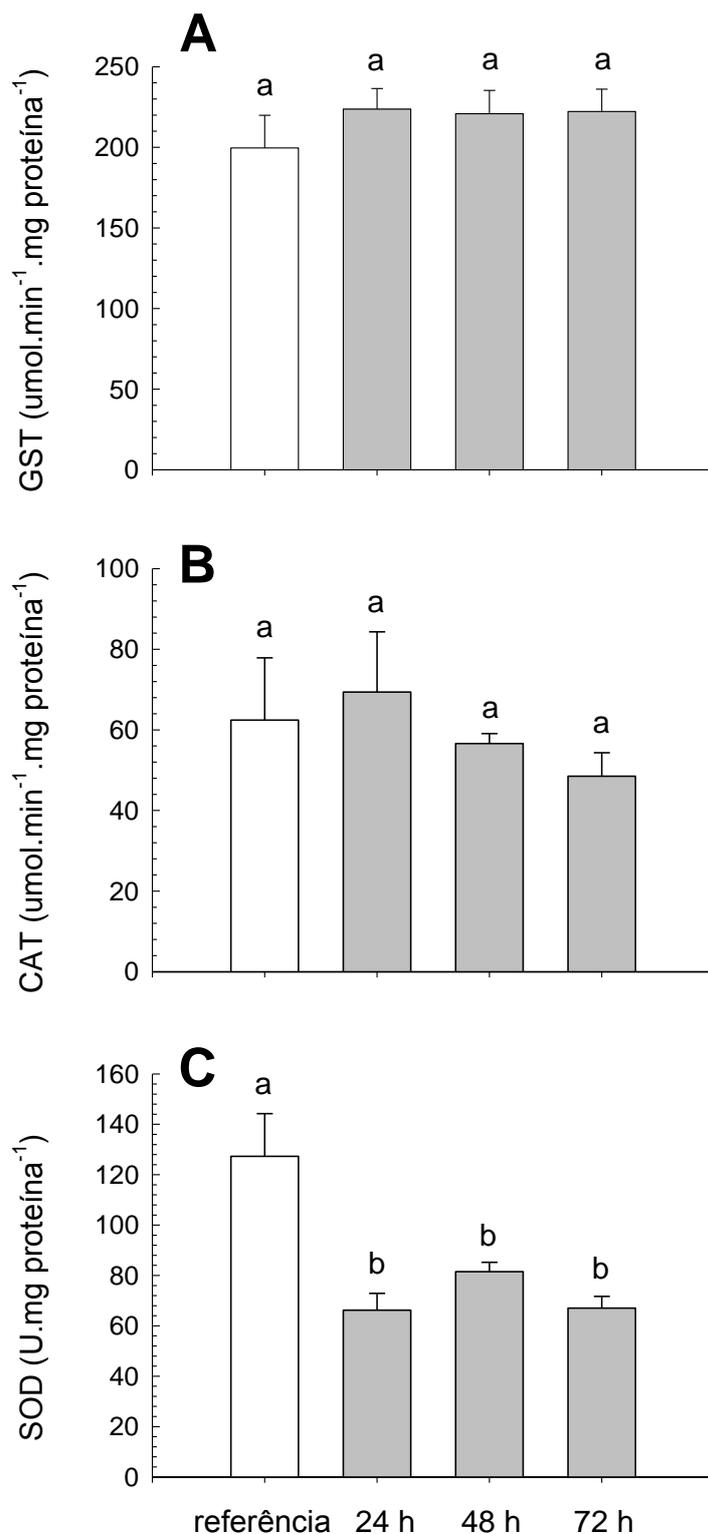


FIGURA 3.14: Enzimas do sistema antioxidante no fígado de *Abudedefduf saxatilis* após diferentes tempos de transporte (24, 48 e 72 horas). As barras indicam média \pm erro padrão da média. (A) Atividade da Glutaciona S-transferase (Referência n= 5; 24 h n= 10; 48 h n=8; 72 h n=9). (B) Atividade da Catalase (Referência n= 5; 24 h n= 10; 48 h n=7; 72 h n=8). (C) Atividade da Superóxido dismutase (Referência n= 6; 24 h n= 9; 48 h n=7; 72 h n=8); "b" indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo referência.

3.4 DISCUSSÃO

O sargento (*Abudefduf saxatilis*) tem sido estudado em relação a 1) seu comportamento reprodutivo (Foster 1989; Prappas 1991), 2) ecologia de populações (Fishelson 1970) e, mais recentemente, 3) monitoramento ambiental através de ensaios de colinesterases (Rodríguez-Fuentes et al. 2013), que podem ser utilizadas como biomarcadores de pesticidas organofosforados e carbamatos, e 4) otólitos (Herrera-Reveles et al. 2013), que servem para indicar a presença de metais pesados. Não foram encontradas pesquisas relativas a marcadores fisiológicos, de forma geral, e nem ao estresse de transporte, de forma particular.

3.4.1 MORTALIDADE DURANTE OS EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE

A mortalidade apresentada neste estudo foi de 20% dos sargentos utilizados. Houve a percepção imediata de que a mortalidade ocorreu com os peixes de maior porte, e que seu peso era proporcionalmente muito maior do que o dos peixes pequenos. Plotando-se o peso em função do comprimento de todos os peixes utilizados, fica bastante clara a mortalidade a partir de ~6-8 cm de comprimento, e forma-se uma curva clara de crescimento. Quando retas de regressão são ajustadas à relação peso/comprimento versus comprimento, confirma-se a mudança no padrão de ganho de peso destes peixes a partir deste intervalo de comprimento de ~6-8 cm. Tem-se assim que o comprimento máximo para o transporte individual de *A. saxatilis*, para uma relação volume de água/peso de peixe de ~100, é por segurança de 6 cm de comprimento total. Quando simplesmente o comprimento dos peixes é plotado em relação ao resultado de morte ou sobrevivência, fica patente a variabilidade intra-específica; vê-se que na faixa entre 6-8 cm, alguns sobreviveram, enquanto outros não. Além disso, é interessante a sobrevivência do indivíduo de 14,2 cm, totalmente dentro da faixa de tamanho que apresentou mortalidade. Este tipo de análise simples pode ser feita com qualquer espécie de interesse comercial para aquariofilia, e já resultaria em vantagens comerciais. Através da análise

neste estudo, sugere-se não comercializar peixes “grandes”, de 7,5-11 cm, o que de fato é feito (Aquariums 2013; Aquatics. 2013; Corrie 2012).

Dados de mortalidade estão entre as informações essenciais para o desenvolvimento de medidas para gestão da pesca de peixes ornamentais marinhos (Bruckner 2005). Uma avaliação feita na cadeia produtiva de peixes ornamentais marinhos nas Filipinas indicou que existe uma taxa de mortalidade menor do que 10% entre a retirada do recife até o varejista quando os peixes são coletados sem o uso de cianeto (Rubec et al. 2001). Não são conhecidos casos de utilização de cianeto no Brasil para a coleta de peixes ornamentais marinhos, porém pouco se sabe a respeito de como esta coleta é de fato realizada. Os fatores para a alta mortalidade tardia de peixes ornamentais marinhos ainda são controversos (Rubec et al. 2001). A melhora nos procedimentos de coleta, manuseio e transporte tende a diminuir a mortalidade ao longo de toda a cadeia produtiva (Bruckner 2005). Nas Filipinas foi verificado que a mortalidade é em torno de 30% quando os peixes são mantidos em embalagens plásticas ou baldes por até 5 (cinco) dias entre a coleta e o envio para os exportadores, mesmo com a troca de água (Rubec et al. 2001). No Brasil a cadeia produtiva costuma envolver o pescador, que geralmente não dispõe de um sistema adequado para manutenção dos peixes, e um atravessador que recebe os animais e os prepara para a venda.

3.4.2 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DURANTE O TRANSPORTE

Além do conhecimento prático do limite de tamanho para um dado protocolo de transporte, é essencial investigar os motivos da mortalidade ou morbidade apresentados. No presente estudo foi avaliada a água dos peixes após o transporte na tentativa de elucidar porque os sargentos maiores morreram. Foi feita análise da relação entre as variáveis ambientais da água do saco de transporte e o comprimento dos peixes, considerando os que viveram até o final dos experimentos de 24, 48 e 72 horas, e os que morreram após 24-48 horas. Fazendo-se a correlação de Pearson entre os 3 parâmetros na água e o comprimento dos peixes, apenas em 2 casos houve correlação significativa,

em ambos negativa: com amônia para os mortos, e com pH, para os vivos. Esta análise é interessante, pois os maiores peixes morrem, mas quanto maior o tamanho, menor a concentração de amônia na água, o que não seria esperado. O outro aspecto relevante desta análise é que, entre os vivos, quanto maior o comprimento, menor o pH da água.

Analisando dois parâmetros da água de cada vez, também separando os peixes vivos dos mortos, verificou-se correlação significativa entre o pH e o OD, e o pH e a amônia. Queda de OD acompanha a queda de pH, e o aumento da amônia acompanha a queda de pH, para os vivos. Para os mortos não houve correlação significativa. Vê-se então que a queda de pH nos animais vivos está associada ao consumo de oxigênio e produção de amônia, ao longo das horas de transporte em sacos plásticos. A ausência de significância para os mortos pode refletir o fato de os peixes poderem estar mortos por tempos variados até terem sido retirados dos sacos (24 ou 48 horas) e sua água coletada e avaliada.

O gráfico do OD x NH_3 , de forma interessante, não foi compatível com o esperado teórico (Figura 5 do Capítulo 2). Peixes mortos apresentaram baixa amônia e variável OD na água, sem caracterizar um quadro de hipóxia na água da embalagem (Figura 10A). Peixes vivos foram representados no lado direito do gráfico, ou seja, com altos níveis de amônia e também OD bastante variável. A literatura relata amplamente a queda de OD na água como sendo um dos fatores mais limitantes para o transporte de peixes (Harmon 2009). Em paralelo, a outra preocupação em relação ao transporte é com o aumento da amônia na água, em decorrência do metabolismo dos peixes, agindo de forma conjunta com demais estressores (Harmon 2009; Lim et al. 2003; Singh et al. 2004).

Decidiu-se então analisar o comportamento dos 3 parâmetros em conjunto. A análise no gráfico tridimensional (“mesh-plot”) mostrou claramente a relevância da queda do pH para a mortalidade dos maiores, e, associada ao consumo de oxigênio e aumento de amônia, significando o desafio ambiental aos peixes, mesmo permanecendo vivos. Esta análise, incluindo o pH, mostrou que a homeostasia foi mantida enquanto desde que o pH da água não caísse. Seguindo a análise do Capítulo 2, a queda do OD com queda do pH da água

representou carga alostática para os peixes. Para os indivíduos mortos, a queda do pH é mais evidente, indicando sobrecarga alostática (Figuras 4 e 5 do Capítulo 2).

Uma vez que na presente pesquisa não houve relação entre a mortalidade e a queda do oxigênio e a toxicidade causada pela amônia, serão apresentadas abaixo algumas ideias que nortearam o raciocínio na tentativa de compreender como a espécie reage ao confinamento decorrente da embalagem de transporte. Um dos fatores que podem estar relacionados é que os peixes ósseos apresentarem a maior tolerância a elevados níveis de amônia no plasma dentre os vertebrados, além de apresentarem uma maior variedade de padrões de síntese e excreção (Walsh 1997). Como não foi medida a ureia na água das embalagens e como não se sabe ao certo o padrão de excreção que a espécie possui, são indicadas pesquisas posteriores no intuito de elucidar o papel da amônia no transporte destes organismos.

Quanto ao oxigênio dissolvido foi observada uma condição de hipóxia (OD <1,8 mg/L) apenas em 4 embalagens de peixes que morreram. Todos os demais peixes utilizados no experimento, incluindo os outros 10 mortos, não apresentaram um consumo do oxigênio capaz de caracterizar uma situação de hipóxia. Sabe-se que dentre os vertebrados os peixes possuem o maior número de espécies tolerantes à hipóxia em função das flutuações naturais de oxigênio no ambiente aquático (Richards 2011). *A. saxatilis* é uma espécie que habita poças de maré (Barreiros et al. 2004; Cunha et al. 2008; Cunha et al. 2007; Freitas et al. 2009) além de formações rochosas como a que serviu de base para os espécimes coletados. Tal característica pode ter relação com o fato da espécie apresentar mecanismos de resposta à queda do oxigênio, uma vez que as condições ambientais em poças de maré são altamente variáveis. Peixes que residem na zona intertidal são confrontados com o estresse da hipóxia que ocorre de forma cíclica durante as oscilações diárias de maré (Craig et al. 2014).

Em geral os peixes respondem à hipóxia com um conjunto de mecanismos fisiológicos, comportamentais, bioquímicos e moleculares que tanto servem para melhorar a absorção de oxigênio a partir de sua diminuição no ambiente quanto para limitar as consequências potencialmente

devastadoras da falta de oxigênio nos tecidos (Richards 2011). Por definição oxiconformadores são aqueles que mantêm a taxa respiratória constante diante do declínio do oxigênio na água ao passo que para os oxiregularores a taxa respiratória decai em paralelo à queda da tensão do oxigênio (Craig et al. 2014). É razoável especular que a espécie é capaz de regular a taxa respiratória diante do estresse do transporte, evitando assim a queda brusca do oxigênio dissolvido. Para machos da espécie *Porichthys notatus* existem evidências de que diante do aparecimento de condições de hipóxia seria vantajoso para o peixe atuar como conformador e reduzir o metabolismo rapidamente ao invés de gastar energia para regular o consumo de oxigênio através de meios fisiológicos ou comportamentais (Craig et al. 2014). A manutenção da quantidade de oxigênio dissolvido nos tempos 48 e 72 h mesmo com o aumento da amônia pode ser decorrente ainda do Efeito Raiz uma vez que, através dele, ocorre a melhor disponibilização de O₂ para os tecidos metabolicamente ativos em peixes teleósteos (Brittain 2005; Wells and Dunphy 2009).

O terceiro parâmetro avaliado na água do transporte foi o pH, que aparentemente foi o que teve relação direta com a mortalidade. Ao que tudo indica a espécie não possui mecanismos fisiológicos para regular a queda de pH e tolera uma variação estreita dos valores. Peixes e outros animais de respiração aquática, por causa da grande solubilidade do CO₂ na água, não acumulam CO₂ no líquido extracelular e por isso não possuem o sistema tampão bicarbonato como animais de respiração aérea (Hill et al. 2008; Schmidt-Nielsen 1996). Com isso, pode-se esperar que a geração de lactato por metabolismo anaeróbico e/ou o acúmulo de CO₂ na água, liberado pelo peixe, acarretem acidose metabólica nos peixes, acidificando a água, e acarretando a morte dos animais. Por seu pequeno porte não foi possível medir lactato ou o pH do sangue, que teriam sido parâmetros extremamente relevantes para a confirmação destas hipóteses. A ausência de uma resposta de regulação ácido-básica nestes peixes é também observada pelos dados de pH da água, que não foram caindo progressivamente ao longo do tempo de permanência na embalagem (24, 48, 72 horas), aliados à manutenção da atividade da anidrase carbônica branquial observada nos indivíduos.

A adição de CO₂ à água através da respiração dos peixes acarreta a queda do pH da água, sendo que para alevinos do bacalhau *Gadus morhua* o pH diminuiu acentuadamente em 1 hora de transporte simulado em sistema fechado (Treasurer 2012). Para o peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris*) também foi observada a relação entre a queda do pH e a mortalidade, sendo que os animais morriam quando o pH ficava abaixo de 6,3 (Chow et al. 1994). Para a perca gigante (*Lates calcarifer*) submetida ao experimento de transporte simulado, foi observado que a mortalidade teve maior relação com o aumento do CO₂ na água do que com o aumento da amônia (Paterson et al. 2003). Em função disso recomenda-se a utilização de substâncias com efeito tampão (Paterson et al. 2003; Treasurer 2012). Entretanto são necessárias mais pesquisas para verificar se a utilização de tampão não piora a condição da água do transporte por proporcionar níveis mais elevados de amônia (Paterson et al. 2003; Treasurer 2012). Sugere-se ainda a utilização conjunta de substâncias com efeito tampão e removedores de amônia (Chow et al. 1994).

Considerando-se os 3 parâmetros medidos neste trabalho (amônia, oxigênio dissolvido e pH) é possível inferir para esta espécie que: 1) a liberação da amônia no embalagem não chega a ser um fator responsável pela mortalidade; 2) o oxigênio puro adicionado à embalagem de transporte, procedimento comumente utilizado pelos comerciantes, consegue evitar que os peixes que os peixes atinjam uma situação de hipóxia; 3) o baixo pH foi o fator que se mostrou mais diretamente relacionado com a mortalidade, necessitando de pesquisas posteriores para elucidar se a queda deste parâmetros é decorrente da acidose do peixe ou do aumento de CO₂ na água. Além disso, é importante ainda compreender qual é o limite tolerado para todas as espécies que são transportadas através deste sistema.

3.4.3 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

De um modo geral, os parâmetros fisiológicos medidos neste trabalho (osmolalidade, teor hídrico muscular e glicemia) tiveram um comportamento similar. Mesmo não havendo diferença significativa, os valores subiram entre o grupo referência e o tempo de 24 h, apresentando uma tendência a retornarem

aos valores próximos de 24 h em 72 h. Porém, não houve diferença significativa entre os três tempos experimentais avaliados. A utilização de outros parâmetros fisiológicos, tais como cortisol e lactato, também pode ser útil para se ter uma visão mais global das respostas fisiológicas destes peixes ao estresse do transporte.

Os indicadores de estresse utilizados parecem sugerir que os indivíduos que toleram as primeiras 24 horas do estresse conseguem se reequilibrar fisiologicamente e suportam bem o período entre 48 e 72 horas. A alta variabilidade no tempo experimental em 24 horas reflete o estresse maior. Portanto, para pesquisas futuras seria importante compreender o que ocorre nestas primeiras horas a fim que minimizar os efeitos adversos.

A pouca variabilidade entre os valores do teor hídrico muscular reflete a capacidade de regular a água tecidual, típica de peixes em geral, ainda mais em situação de estabilidade de salinidade da água, mas ainda mais provável em teleósteos de grupo marinho relacionado a ambientes instáveis como poças de marés, como o caso desta família (Freire et al. 2008). Relacionar a origem evolutiva destes peixes que possuem interesse comercial e que são retirados da natureza também pode fornecer indícios das espécies que toleram melhor fisiologicamente o transporte.

A alta variabilidade nos valores de glicemia pode ser decorrente da não só da própria variabilidade individual, mas também do fato de, na metodologia adotada, não ter sido feito o controle do horário de alimentação. Os peixes eram coletados no ambiente e diretamente embalados não sendo possível verificar se haviam se alimentado ou não. Para a melhor compreensão do efeito da glicemia em relação ao estresse do transporte, são necessárias pesquisas que avaliem os animais alimentados e em jejum.

Assim como mencionado no Capítulo 2, a verificação da glicemia em pesquisas posteriores pode contribuir para elucidar se é melhor transportar os peixes alimentados ou em jejum.

3.4.4 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.4.4.1 ANIDRASE CARBÔNICA

Não foram encontrados trabalhos que medissem a atividade da anidrase carbônica em peixes marinhos submetidos ao estresse do transporte. Foi buscada então uma possível relação para o papel desta enzima e as condições verificadas nos parâmetros da água do transporte.

Em teleósteos a redução do pH no sangue diminui a capacidade de transporte do O₂, fenômeno conhecido como Efeito Raiz (Rummer et al. 2013). O papel do efeito Raiz já foi bem estudado na manutenção da quantidade de O₂ para a retina e a bexiga natatória, sendo que estes tecidos ampliam a acidose promovendo a descarga de O₂ através do Efeito Raiz (Brittain 2005). Porém se o sangue do peixe se tornar muito ácido, poderá haver o comprometimento da absorção de O₂ pelas brânquias. Como a AC catalisa a conversão do HCO₃⁻ e H⁺ em CO₂, sua diminuição no tecido branquial é entendida como um mecanismo para assegurar o aporte de O₂ durante situações de estresse (Rummer et al. 2013). O papel do Efeito Raiz em outros tecidos e em condições de estresse dos peixes ainda não foi devidamente estudado. A queda da AC nos três tempos experimentais (24, 48 e 72 h) pode ser decorrente do Efeito Raiz, uma vez que a presença da AC nas brânquias poderia comprometer a absorção do O₂.

3.4.4.2 ENZIMAS DE ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de EROs é positivamente correlacionada com a concentração do oxigênio no ambiente onde condições de hiperóxia podem levar ao aumento da produção de EROs (Felton 1995). Uma vez que estes organismos são comumente transportados com a adição de oxigênio à embalagem, é relevante caracterizar a resposta fisiológica decorrente do transporte.

A catalase é uma enzima que elimina as espécies reativas de oxigênio (EROs) pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Felton 1995). O fígado é um dos tecidos que mais apresenta atividade da CAT em peixes, sendo que esta atividade pode variar em até 4 vezes para espécies

da mesma família, como é o caso da família Gadidae (Aksnes and Njaa 1981). Quando comparados com espécies de água doce, peixes marinhos parecem possuir até o dobro da quantidade de CAT nos tecidos (Filho et al. 1993).

Machos da espécie *Porich thysnotatus* enfrentam prolongada exposição à hipóxia na maré baixa por cuidarem dos seus ninhos em poças e uma das reações é a queda da atividade da enzima catalase nas brânquias (Craig et al. 2014). A queda da enzima indica o estresse oxidativo e nos ensaios com o *A. saxatilis* não foi observada uma condição de hipóxia mesmos após 72 horas de permanência na embalagem. A não alteração da catalase no fígado de *A. saxatilis* pode estar relacionada ao fato de não haver uma condição de hipóxia nas embalagens. Experimentos posteriores realizados sem a adição de oxigênio puro à embalagem poderão comprovar se a hipóxia reduz a atividade desta enzima para a espécie.

Dentre as 3 enzimas de estresse oxidativo utilizadas nesta pesquisa apenas a SOD hepática foi afetada pelo tempo de permanência nas embalagens plásticas. Segundo Fridovich (1974) citado por Aksnes e Njaa(1981) a SOD é provavelmente a enzima mais importante para proteger contra a toxicidade do oxigênio. A literatura não contém estudos sistemáticos sobre a atividade da SOD para diferentes espécies de peixes (Aksnes and Njaa 1981). O aumento da atividade da SOD em peixes pode ser causado por um metabolismo mais elevado e um maior consumo de oxigênio (Aksnes and Njaa 1981). O fato de neste experimento a SOD diminuir significativamente entre o grupo referência e as primeiras 24 horas dos peixes embalados reforça a ideia que estes organismos apresentam mecanismos para minimizar o consumo de oxigênio em situações de estresse. A diferença ocorrida entre o grupo referência e os tempos experimentais ressalta o fato de que pesquisas posteriores devem ser realizadas nas primeiras 24 horas de transporte para uma melhor compreensão dos mecanismos enzimáticos de resposta ao estresse.

As enzimas de estresse oxidativo são comumente utilizadas em peixes para medir o estresse causado por fármacos, metais pesados e outros poluentes e não foram encontrados trabalhos com a utilização para avaliar o estresse do transporte. Outra contribuição importante que pode ser elucidada

através da utilização destas enzimas é a investigação do retorno dos peixes transportados a um ambiente rico em oxigênio. Isto se dá porque provavelmente há redução do metabolismo aeróbico até certo tempo de confinamento, e depois aumento do consumo de oxigênio e quando o peixe chega ao seu destino ele tem que ser colocado em uma água saturada de oxigênio, podendo acarretar um quadro de estresse oxidativo. Um fato concreto que pode ter relação com esta situação é que os comerciantes adotam um protocolo para aclimação dos peixes recém chegados no qual eles gotejam água do novo sistema à embalagem do peixe por períodos de até 4 horas.

3.5 CONCLUSÃO

Uma vez que o transporte de POM envolve, em geral, a coleta e exportação dos organismos, deve-se evitar o transporte superior a 24 horas para esta espécie. Considerando a conservação dos estoques naturais, cabe ressaltar que transportes superiores a este período acarretam alta mortalidade.

Considerando que estes animais são vendidos por faixas de tamanho, sendo que enquanto maior o animal maior o seu valor de mercado, é importante ressaltar que para o *A. saxatilis* o tamanho máximo para coleta deve ser 6 cm. Para as demais espécies de POM, deve ser feita a curva de crescimento para se otimizar o volume de água que deverá ser colocado na embalagem a fim de minimizar os custos e diminuir o estresse aumentando a chance de sobrevivência.

Enquanto o comércio de POM depender da retirada do ambiente natural, deve-se privilegiar espécies com a estória evolutiva relacionada à ambientes instáveis tais como poças de maré e estuários. Desta forma é possível garantir um maior sucesso durante o processo de transporte. Deve-se buscar aprofundar as pesquisas relativas a reprodução de espécies oriundas de ambientes marinhos estáveis com interesse ornamental, pois peixes provenientes de cativeiro tendem a tolerar melhor o estresse do transporte do que animais retirados da natureza.

Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos utilizados na presente pesquisa não se mostraram eficazes no sentido da caracterização do estresse do transporte desta espécie. Ao passo que a avaliação das alterações da qualidade da água durante o transporte possibilitou uma melhor compreensão dos fatores que podem afetar a homeostasia dos peixes. Assim como a frase contida no início do capítulo anterior, conclui-se que o entendimento da influência do ambiente de transporte para os peixes é relevante para interpretar as respostas fisiológicas do animal, bem como minimizar os efeitos adversos. A manutenção dos parâmetros da água, garante um transporte menos estressante a estes organismos e sua sobrevivência mesmo em transportes longos.

REFERÊNCIAS (CAPÍTULO 3)

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Aksnes A., Njaa L.R. (1981) Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **69**, 893-896.
- Aquariums S.W. (2013) Sergeant Major Damselfish (*Abudefduf saxatilis*).
- Aquatics. B.Z. (2013) Sergeant Major Damselfish.
- Barreiros J.P., Bertoncini Á., Machado L., Hostim-Silva M., Santos R.S. (2004) Diversity and seasonal changes in the ichthyofauna of rocky tidal pools from Praia Vermelha and São Roque, Santa Catarina. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**, 291-299.
- Bradford M.M. (1976) A rapid e sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brinn R.P., Marcon J.L., McComb D.M., Gomes L.C., Abreu J.S., Baldisseroto B. (2012) Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **162**, 139-145.
- Brittain T. (2005) Root effect hemoglobins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**, 120-129.
- Bruckner A.W. (2005) The importance of the marine ornamental reef fish trade in the wider Caribbean. *Revista de Biología Tropical* **53**, 127-137.

Carneiro P.C.F., Urbinati E.C. (2002) Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International* **10**, 221-229.

Chow P.S., Chen T.W., Teo L.H. (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.

Corrie D. (2012) CARIBBEAN SELECT MARINE EXOTICS - BUY DIRECT FROM THE DIVERS!

Craig P., Fitzpatrick J., Walsh P., Wood C., McClelland G. (2014) Coping with aquatic hypoxia: how the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*) tolerates the intertidal zone. *Environ Biol Fish* **97**, 163-172.

Cunha E.A., Carvalho R.A.A., Monteiro-Neto C., Moraes L.E.S., Araújo M.E. (2008) Comparative analysis of tidepool fish species composition on tropical coastal rocky reefs at State of Ceará, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* **98**, 379-390.

Cunha F.E.d.A., Monteiro-Neto C., Nottingham M.C. (2007) Temporal and spatial variations in tidepool fish assemblages of the northeast coast of Brazil. *Biota Neotropica* **7**, 0-0.

Felton G. (1995) Oxidative Stress of Vertebrates and Invertebrates. pp. 356-434 in S. Ahmad editor. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Springer US.

Filho D.W., Giulivi C., Boveris A. (1993) Antioxidant defences in marine fish—I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **106**, 409-413.

Fishelson L. (1970) Behaviour and ecology of a population of *Abudefduf saxatilis* (Pomacentridae, Teleostei) at Eilat (Red Sea). *Animal Behaviour* **18**, Part 2, 225-237.

Foster S.A. (1989) The implications of divergence in spatial nesting patterns in the geminate Caribbean and Pacific sergeant major damselfishes. *Animal Behaviour* **37**, Part 3, 465-476.

Freire C.A., Amado E.M., Souza L.R. *et al.* (2008) Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **149**, 435-446.

Freitas M.C.d., Vieira R.H.S.d.F., Araújo M.E.d. (2009) Impact of the construction of the harbor at pecém (Ceará, Brazil) upon reef fish communities in tide pools. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **52**, 187-195.

Gao R., Yuan Z., Zhao Z., Gao X. (1998) Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **45**, 41-45.

Harmon T.S. (2009) Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* **1**, 58-66.

Herrera-Reveles A.T., Lemus M., Marín B., Prin J.L. (2013) Trace metal incorporation in otoliths of a territorial coral reef fish (*Abudefduf saxatilis*) as an environmental monitoring tool. *E3S Web of Conferences* **1**, 34007.

Hill R.W., Wyse G.A., Anderson M. (2008) *Animal Physiology*. Sinauer Associates.

Keen J.H., Habig W.H., Jakoby W.B. (1976) Mechanism for several activities for the Glutathione S-Transferase. *J Biol Chem* **251**, 6183 – 6188.

Lim L.C., Dhert P., Sorgeloos P. (2003) Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research* **34**, 923-935.

Parodi T., Cunha M., Becker A. *et al.* (2014) Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem* **40**, 323-334.

Paterson B.D., Rimmer M.A., Meikle G.M., Semmens G.L. (2003) Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture* **218**, 717-728.

Prappas J.M.G., L.E.; White, R. (1991) Reproductive behavior of the sergeant major, *Abudefduf saxatilis*, within a closed system aquarium. *Environ Biol Fish* **31**, 33-40.

Richards J.G. (2011) Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 191-199.

Rodríguez-Fuentes G., Soto M., Luna-Ramírez K. (2013) Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **96**, 99-102.

Rubec P., Cruz F., Pratt V., Oellers R., McCullough B., Lallo F. (2001) Cyanide-free Net-caught Fish for the Marine Aquarium Trade. *Aquarium Sciences and Conservation* **3**, 37-51.

Rummer J.L., McKenzie D.J., Innocenti A., Supuran C.T., Brauner C.J. (2013) Root Effect Hemoglobin May Have Evolved to Enhance General Tissue Oxygen Delivery. *Science* **340**, 1327-1329.

Schmidt-Nielsen K. (1996) *Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente.*, 5 ed. Livraria Santos Editora, São Paulo.

Schreck C.B., Jonsson L., Feist G., Reno P. (1995) Conditioning improves performance of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. *Aquaculture* **135**, 99-110.

Singh R.K., Vartak V.R., Balange A.K., Ghughuskar M.M. (2004) Water quality management during transportation of fry of Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture* **235**, 297-302.

Tenningen M., Vold A., Olsen R.E. (2012) The response of herring to high crowding densities in purse-seines: survival and stress reaction. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **69**, 1523-1531.

Tondolo J.S.M., Amaral L.d.P., Simoes L.N. *et al.* (2013) Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology* **11**, 667-674.

Treasurer J.W. (2012) Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L. and stabilisation using buffering agents. *Aquaculture* **330–333**, 92-99.

Urbinati E.C., de Abreu J.S., da Silva Camargo A.C., Landinez Parra M.A. (2004) Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* **229**, 389-400.

Vitale A.M., Monserrat J.M., Castilho P., Rodriguez E.M. (1999) Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Physiol* **122**, 121-129.

Walsh P.J. (1997) Evolution and regulation of urea synthesis and ureotely in (Batrachoidid) fishes. *Annual Review of Physiology* **59**, 299-323.

Wells R.M.G., Dunphy B.J. (2009) Potential impact of metabolic acidosis on the fixed-acid Bohr effect in snapper (*Pagrus auratus*) following angling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **154**, 56-60.

Zeppenfeld C.C., Toni C., Becker A.G. *et al.* (2014) Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* **418–419**, 101-107.

CONCLUSÃO GERAL

Atualmente no Brasil a legislação permite que peixes ornamentais sejam coletados e exportados sendo que os órgãos governamentais não fornecem suporte técnico adequado para a gestão da atividade. Esta situação coloca em risco as populações selvagens e também se torna uma barreira ao desenvolvimento econômico da atividade comercial que envolve a coleta e comercialização destes organismos.

Ao longo da cadeia produtiva, os desafios fisiológicos impostos aos peixes são constantes e diversos. Em relação ao transporte, a informação científica disponível ainda não é capaz de responder o que acontece fisiologicamente com os peixes. São necessários protocolos que sejam capazes de reduzir o estresse, causado principalmente pela alteração dos parâmetros da água do transporte, a fim de aumentar a sobrevivência dos animais ao chegarem ao destino final.

Para o estabelecimento destes protocolos são necessárias informações fisiológicas básicas das espécies com interesse comercial, que ainda não existem na literatura científica. Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos utilizados no estudo de caso do peixe sargento não se mostraram eficazes no sentido da caracterização do estresse do seu transporte. A avaliação das alterações da qualidade da água durante o transporte possibilitou uma melhor compreensão dos fatores que podem afetar a homeostasia dos peixes, levando à carga e sobrecarga alostática e eventual morte.

A médio e longo prazo, o aumento de pesquisas relativas ao transporte de peixes ornamentais marinhos juntamente com os ajustes necessários à legislação baseados em informações científicas contribuirá para a realização comercial da atividade com menor comprometimento dos estoques naturais.

REFERÊNCIAS

- (2013) Protozoal Ectoparasites (Ciliated and Flagellated). pp. 33-34. *Clinical Veterinary Advisor*. W.B. Saunders, Saint Louis.
- Abreu J.S.d., Sanabria-Ochoa A.I., Gonçalves F.D., Urbinati E.C. (2008) Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. *Ciência Rural* **38**, 1413-1417.
- Acerete L., Balasch J.C., Espinosa E., Josa A., Tort L. (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* **237**, 167-178.
- Ackermann G.E., Paw B.H. (2003) Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8**, d1227-1253.
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Aksnes A., Njaa L.R. (1981) Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **69**, 893-896.
- Almeida E.A., Bainy A.C.D., Loureiro A.P.M. *et al.* (2007) Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **146**, 588-600.
- Anderson P.A., Berzins I.K., Fogarty F., Hamlin H.J., Guillette Jr L.J. (2011) Sound, stress, and seahorses: The consequences of a noisy environment to animal health. *Aquaculture* **311**, 129-138.
- Antunes P.B., editor. (2012) *Direito Ambiental*. Atlas, São Paulo.
- Aquariums S.W. (2013) Sergeant Major Damselfish (*Abudefduf saxatilis*).
- Aquatics. B.Z. (2013) Sergeant Major Damselfish.
- Baldisserotto B., editor. (2009) *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. Editora UFSM, Santa Maria.
- Barreiros J.P., Bertoncini Á., Machado L., Hostim-Silva M., Santos R.S. (2004) Diversity and seasonal changes in the ichthyofauna of rocky tidal pools from Praia Vermelha and São Roque, Santa Catarina. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**, 291-299.
- Bartley D.M., Bondad-Reantaso M.G., Subasinghe R.P. (2006) A risk analysis framework for aquatic animal health management in marine stock enhancement programmes. *Fisheries Research* **80**, 28-36.

Barton B.A. (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 517-525.

Bender M.G., Floeter S.R., Mayer F.P. *et al.* (2013) Biological attributes and major threats as predictors of the vulnerability of species: a case study with Brazilian reef fishes. *Oryx* **47**, 259-265.

Berka R. (1986) The transport of live fish. A review. *EIFAC TECHNICAL PAPER* **48**.

Bernoth E.-M., Crane M.S.J. (1995) Viral diseases of aquarium fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **4**, 103-110.

Boutin S., Bernatchez L., Audet C., Derôme N. (2013) Network Analysis Highlights Complex Interactions between Pathogen, Host and Commensal Microbiota. *PLoS ONE* **8**, e84772.

Bradford M.M. (1976) A rapid e sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* **72**, 248-254.

Brasil. (1988) Constituição da República Federativa do Brasil.

Braun N., Nuñez A.P.d.O. (2014) Stress in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) at different densities and times in a simulated transport. *Zoologia (Curitiba)* **31**, 101-104.

Brier J.W. (1992) Emerging problems in seafood-borne parasitic zoonoses: Jeffrey W. Brier summarizes reports presented at the First International Conference on Foodborne Parasitic Zoonoses, Chiang Mai, Thailand. *Food Control* **3**, 2-7.

Brinn R.P., Marcon J., Tavares-Dias M., Brinn I.M. (2009) Fluorescence Detection of the Ornamental Fish Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *Photochemistry and Photobiology* **85**, 358-364.

Brinn R.P., Marcon J.L., McComb D.M., Gomes L.C., Abreu J.S., Baldisseroto B. (2012) Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **162**, 139-145.

Brittain T. (2005) Root effect hemoglobins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**, 120-129.

Bruckner A.W. (2005) The importance of the marine ornamental reef fish trade in the wider Caribbean. *Revista de Biología Tropical* **53**, 127-137.

Bui T.M., Phuong N.T., Nguyen G.H., De Silva S.S. (2013) Fry and fingerling transportation in the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, farming

sector, Mekong Delta, Vietnam: A pivotal link in the production chain. *Aquaculture* **388–391**, 70-75.

Burggren W.C., J. W.; DeVillez, E. J.; Farrel, A.P.; Heath, J.; Hochachka, P. W.; Kirschner, L.B. (1991) *Environmental and Metabolic Animal Physiology*, 4 ed. Wiley-Liss, New York.

Canotilho J.J.G., Leite J.R.M. (2011) *Direito Constitucional Ambiental Brasileiro*, 4 ed. Saraiva, São Paulo.

Carneiro P.C.F., Urbinati E.C. (2002) Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International* **10**, 221-229.

Carneiro P.C.F.U., E.C.; Bendhack, F. (2007) Osmoregulation and Fish Transportation. *Fish Osmoregulation*. Science Publishers, New Hampshire.

Chong V.C., Lee P.K.Y., Lau C.M. (2010) Diversity, extinction risk and conservation of Malaysian fishes. *Journal of Fish Biology* **76**, 2009-2066.

Chow P.S., Chen T.W., Teo L.H. (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 T.D., Donaldson M.R., Pieperhoff S. *et al.* (2012) Physiological Benefits of Being Small in a Changing World: Responses of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to an Acute Thermal Challenge and a Simulated Capture Event. *PLoS ONE* **7**, e39079.

Cnaani A., McLean E., Hallerman E.M. (2013) Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **412–413**, 107-116.

Cook K.V., McConnachie, S.H., Gilmour, K.M., Hinch, S.G., Cooke, S.J. (2011) Fitness and behavioral correlates of pre-stress and stress-induced plasma cortisol titers in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) upon arrival at spawning grounds. *Hormones and Behavior* **60**, 489-497.

Corrêa L., Souza G.R., Takemoto R., Ceccarelli P., Adriano E. (2014) Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp. in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil. *Parasitol Res* **113**, 499-503.

Corrie D. (2012) CARIBBEAN SELECT MARINE EXOTICS - BUY DIRECT FROM THE DIVERS!

Craig P., Fitzpatrick J., Walsh P., Wood C., McClelland G. (2014) Coping with aquatic hypoxia: how the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*) tolerates the intertidal zone. *Environ Biol Fish* **97**, 163-172.

Cunha E.A., Carvalho R.A.A., Monteiro-Neto C., Moraes L.E.S., Araújo M.E. (2008) Comparative analysis of tidepool fish species composition on tropical

coastal rocky reefs at State of Ceará, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* **98**, 379-390.

Cunha F.E.d.A., Monteiro-Neto C., Nottingham M.C. (2007) Temporal and spatial variations in tidepool fish assemblages of the northeast coast of Brazil. *Biota Neotropica* **7**, 0-0.

Cunha M.A., Silva, B.F., Delunardo, F.A.C., Benovit, S.C., Gomes, L.C., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. (2011) Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology* **9**, 683-688.

Dhanasiri A.K.S., Fernandes J.M.O., Kiron V. (2013a) Acclimation of Zebrafish to Transport Stress. *Zebrafish* **10**, 87-98.

Dhanasiri A.K.S., Fernandes J.M.O., Kiron V. (2013b) Liver Transcriptome Changes in Zebrafish during Acclimation to Transport-Associated Stress. *PLoS ONE* **8**, e65028.

Dhanasiri A.K.S., Kiron V., Fernandes J.M.O., Bergh O., Powell M.D. (2011) Novel application of nitrifying bacterial consortia to ease ammonia toxicity in ornamental fish transport units: trials with zebrafish. *Journal of Applied Microbiology* **111**, 278-292.

Dob-Íková R., Svobodová Z., Blahová J., Modrá H., Velí-Ek J. (2006) Stress Response to Long Distance Transportation of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno* **75**, 437-448.

El-Khaldi A.T.F. (2010) Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi Journal of Biological Sciences* **17**, 241-246.

Fabinyi M., Dalabajan D. (2011) Policy and practice in the live reef fish for food trade: A case study from Palawan, Philippines. *Marine Policy* **35**, 371-378.

Farley C.A. (1992) Mass mortalities and infectious lethal diseases in bivalve molluscs and associations with geographic transfers of populations. pp. 139–154 in A. Rosenfield, Mann, R. editor. *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*. University of Maryland, College Park.

Farrell A.P., Tang S., Nomura M., Brauner C.J. (2010) Toward Improved Public Confidence in Farmed Fish: A Canadian Perspective on Fish Welfare during Marine Transport. *Journal of the World Aquaculture Society* **41**, 225-239.

Feitosa K.C.d.O., Povh J.A., Abreu J.S.d. (2013) Physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) treated with homeopathic product and submitted to transport stress. *Homeopathy* **102**, 268-273.

Felton G. (1995) Oxidative Stress of Vertebrates and Invertebrates. pp. 356-434 in S. Ahmad editor. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Springer US.

Fernandes R.G., L.C.; Agostinho, A. A. (2003) Pesque e pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? *Acta Scientiarum: Biological Sciences* **25**, 115-120.

Figueiredo H.C. P C.E.A.P., Delphino M.K.V.C, Blume L.R, Machado D.P, Oliveira P.H.S. (2012) Análise de Risco de Importação: Metodologia Básica. in MPA editor., Brasília.

Filho D.W., Giulivi C., Boveris A. (1993) Antioxidant defences in marine fish—I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **106**, 409-413.

Fiorillo C.A.P., editor. (2012) *Curso de direito ambiental brasileiro*. Saraiva, São Paulo.

Fishelson L. (1970) Behaviour and ecology of a population of *Abudefduf saxatilis* (Pomacentridae, Teleostei) at Eilat (Red Sea). *Animal Behaviour* **18**, Part 2, 225-237.

Floeter S.R., Halpern B.S., Ferreira C.E.L. (2006) Effects of fishing and protection on Brazilian reef fishes. *Biological Conservation* **128**, 391-402.

Foster S.A. (1989) The implications of divergence in spatial nesting patterns in the geminate Caribbean and Pacific sergeant major damselfishes. *Animal Behaviour* **37**, Part 3, 465-476.

Freire C.A., Amado E.M., Souza L.R. *et al.* (2008) Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **149**, 435-446.

Freire C.A., Souza-Bastos L.R., Amado E.M., Prodocimo V., Souza M.M. (2013) Regulation of Muscle Hydration Upon Hypo- or Hyper-Osmotic Shocks: Differences Related to Invasion of the Freshwater Habitat by Decapod Crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **319**, 297-309.

Freitas M.C.d., Vieira R.H.S.d.F., Araújo M.E.d. (2009) Impact of the construction of the harbor at pecém (Ceará, Brazil) upon reef fish communities in tide pools. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **52**, 187-195.

Ganzhorn J.R., J.S.; Fryer, J.L. (1992) Dissemination of microbial pathogens through introductions and transfers of finfish. pp. 175–192 in A.M. Rosenfield, R. editor. *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*. University of Maryland.

Gao R., Yuan Z., Zhao Z., Gao X. (1998) Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **45**, 41-45.

Gasparini J.L., Floeter S.R., Ferreira C.E.L., Sazima I. (2005) Marine Ornamental Trade in Brazil. *Biodiversity and Conservation* **14**, 2883-2899.

George N., Peter V.S., Peter M.C.S. (2013) Physiologic implications of inter-hormonal interference in fish: Lessons from the interaction of adrenaline with cortisol and thyroid hormones in climbing perch (*Anabas testudineus* Bloch). *General and Comparative Endocrinology* **181**, 122-129.

Gomes L.C., Brinn R.P., Marcon J.L. *et al.* (2009) Benefits of using the probiotic Efinol((R))L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquaculture Research* **40**, 157-165.

Gomes L.C., Chagas E.C., Brinn R.P., Roubach R., Coppati C.E., Baldisserotto B. (2006) Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture* **256**, 521-528.

Gomes L.C., Roubach R., Araujo-Lima C.A.R.M., Chippari-Gomes A.R., Lopes N.P., Urbinati E.C. (2003) Effect of Fish Density During Transportation on Stress and Mortality of Juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society* **34**, 76-84.

González-Laxe F. (2005) The precautionary principle in fisheries management. *Marine Policy* **29**, 495-505.

Hadfield C.A., Whitaker B.R., Clayton L.A. (2007) Emergency and Critical Care of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **10**, 647-675.

Hardin G. (1968) The Tragedy of the Commons. *Science* **162**, 1243-1248.

Harmon T.S. (2009) Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* **1**, 58-66.

Harms C.A. (1996) Treatments for parasitic diseases of aquarium and ornamental fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **5**, 54-63.

Haux C., Sjöbeck M.-L., Larsson Å. (1985) Physiological stress responses in a wild fish population of perch (*Perca fluviatilis*) after capture and during subsequent recovery. *Marine Environmental Research* **15**, 77-95.

Hermes-Lima M., Storey J.M., Storey K.B. (2001) Chapter 20 Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. pp. 263-287 in K.B. Storey, J.M. Storey editors. *Cell and Molecular Response to Stress*. Elsevier.

Hermes-Lima M., Zenteno-Savín T. (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **133**, 537-556.

Herrera-Reveles A.T., Lemus M., Marín B., Prin J.L. (2013) Trace metal incorporation in otoliths of a territorial coral reef fish (*Abudefduf saxatilis*) as an environmental monitoring tool. *E3S Web of Conferences* **1**, 34007.

Hickman-Jr C.P., Roberts L.S., Larson A. (2004) *Princípios Integrados de Zoologia.*, 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Hill R.W., Wyse G.A., Anderson M. (2008) *Animal Physiology.* Sinauer Associates.

Howarth W. (2008) The Interpretation of 'Precaution' in the European Community Common Fisheries Policy. *Journal of Environmental Law* **20**, 213-244.

IBAMA. (2008a) Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariorfilia. . in IBAMA editor.

IBAMA. (2008b) Instrução Normativa Nº 202. Diário Oficial da União.

IBAMA. (2011) Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de Cavalos-Marinheiros do Brasil. in IBAMA editor., Brasília.

IBAMA. (2013a) Estatísticas de exportação de peixes de águas marinhas 2006 e 2007., Brasil.

IBAMA. (2013b) Exportação de peixes Ornamentais de Águas Marinhas - Perguntas frequentes - IBAMA.

Ings J.S., Oakes K.D., Vijayan M.M., Servos M.R. (2012) Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **156**, 67-74.

Iversen M., Finstad B., Nilssen K.J. (1998) Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* **168**, 387-394.

Iwama G.K., Afonso L.O.B., Vijayan M.M. (2006) Stress in Fishes in D.H. Evans, C.J.B. . editors. *The Physiology of Fishes* Taylor and Francis, Florida.

James Cooper W., Smith L.L., Westneat M.W. (2009) Exploring the radiation of a diverse reef fish family: Phylogenetics of the damselfishes (Pomacentridae), with new classifications based on molecular analyses of all genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**, 1-16.

Jones B., Tensen M.C. (2009) RSPCA Australia Scientific Seminar 2008 Animals in transit: The journey ahead. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **4**, 145-147.

Keen J.H., Habig W.H., Jakoby W.B. (1976) Mechanism for several activities for the Glutathione S-Transferase. *J Biol Chem* **251**, 6183 – 6188.

Keller R.P., Lodge D.M., Finnoff D.C. (2007) Risk assessment for invasive species produces net bioeconomic benefits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 203-207.

Kent M.L., Feist S.W., Harper C. *et al.* (2009) Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **149**, 240-248.

King H.R. (2009) Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **4**, 163-168.

Korte S.M., Olivier B., Koolhaas J.M. (2007) A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology & Behavior* **92**, 422-428.

Krebs C.J. (2009) *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance.*, 6 ed, San Francisco.

Kvamme B.O., Gadan K., Finne-Fridell F. *et al.* (2013) Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. *Fish & Shellfish Immunology* **34**, 55-65.

Lehane L. (1993) Risks of fish imports--the 1993 aquatic animal quarantine review. *Australian veterinary journal* **70**, 202-204.

Leong H., Ros A.F.H., Oliveira R.F. (2009) Effects of putative stressors in public aquaria on locomotor activity, metabolic rate and cortisol levels in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* **74**, 1549-1561.

Lewbart G.A. (2001) Bacteria and ornamental fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **10**, 48-56.

Lightner D.V.R., R.M.; Bell, T.A.; Thurman, R.B. . (1992) Geographic dispersion of the viruses IHHN, MBV and HPV as a consequence of transfers and introductions of penaeid shrimp to new regions for aquaculture purposes. pp. 155–173 in A.M. Rosenfield, R. editor. *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*. University of Maryland, College Park.

Lim L.C., Dhert P., Sorgeloos P. (2003) Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research* **34**, 923-935.

Lodge D.M., Williams S., Maclsaac H.J. *et al.* (2006) Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management. *Ecological Applications* **16**, 2035-2054.

Longo G.O., Floeter S.R. (2012) Comparison of remote video and diver's direct observations to quantify reef fishes feeding on benthos in coral and rocky reefs. *J Fish Biol* **81**, 1773-1780.

Luiz O.J., Floeter S.R., Rocha L.A., Ferreira C.E.L. (2013) Perspectives for the lionfish invasion in the South Atlantic: Are Brazilian reefs protected by the currents? *Marine Ecology Progress Series* **485**, 1-7.

Luiz O.J., Madin J.S., Robertson D.R., Rocha L.A., Wirtz P., Floeter S.R. (2011) Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.

Machado P.A.L., editor. (2012) *Direito Ambiental Brasileiro*. Malheiros Editores, São Paulo.

Mak K.K.W., Yanase H., Renneberg R. (2005) Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2581-2593.

Manuel R., Boerrigter J., Roques J. *et al.* (2014) Stress in African catfish (*Clarias gariepinus*) following overland transportation. *Fish Physiol Biochem* **40**, 33-44.

MAPA. (2008) Instrução Normativa Nº 18. Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura, Brasil.

MAPA. (2013a) Estação quarentenária de Cananéia - EQC.

MAPA. (2013b) Ministério - MAPA.

MAPA. (2013c) Trânsito - MAPA.

Marçalo A., Pousão-Ferreira P., Mateus L., Duarte Correia J.H., Stratoudakis Y. (2008) Sardine early survival, physical condition and stress after introduction to captivity. *Journal of Fish Biology* **72**, 103-120.

Marine F. (2012) Sergeant Major Damsel Fish - *Abudefduf saxatilis* - Striped Sergeant Damselfish.

Marshall W.S., Grosell M. (2006) Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. *The Physiology of Fishes*. CRC, Taylor & Francis.

Martínez-Álvarez R.M.H., M. C.; Domezain, A.; Morales, A. E.; García-Gallego, M., Sanz a.A. (2002) Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *The Journal of Experimental Biology* **205**, 3699–3706.

McCormick S.D. (2001) Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *Integrative and Comparative Biology* **41**, 781-794.

McEwen B.S., Wingfield J.C. (2010) What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Hormones and Behavior* **57**, 105-111.

Meinelt T., Schreckenbach K., Pietrock M., Heidrich S., Steinberg C.E.W. (2008) Humic substances - Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environmental Science and Pollution Research* **15**, 17-22.

Miller-Jr G.T. (2008) *Ciência Ambiental*. Cengage Learning, São Paulo.

Miller G.T., Spoolman S.E., editors. (2012) *Ecologia e Sustentabilidade*. Cengage Learning, São Paulo.

Monteiro-Neto C., Cunha F.E.A., Nottingham M.C., Araújo M.E., Rosa I.L., Barros G.M.L. (2003) Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceara' State, northeast Brazil. *Biodiversity and Conservation* **12**, 1287-1295.

Moraes A. (2012) *Direito Constitucional*, 28 ed. Editora Atlas, São Paulo.

MPA. (2010) INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14. Diário Oficial da União.

MPA. (2013a) Lista de quarentenários credenciados para a importação de organismos aquáticos para fins ornamentais

MPA. (2013b) Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA - Competências.

Murphy K.M., Lewbart G.A. (1995) Aquarium fish dermatologic diseases. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **4**, 220-233.

Odum E.P.B., G.W. (2008) *Fundamentos de Ecologia*, 5 ed. Cengage Learning, São Paulo.

Oidtmann B.C., Crane C.N., Thrush M.A., Hill B.J., Peeler E.J. (2011) Ranking freshwater fish farms for the risk of pathogen introduction and spread. *Preventive Veterinary Medicine* **102**, 329-340.

OIE W.O.f.A.H.-. (2013a) Aquatic Animal Health Code.

OIE W.O.f.A.H.-. (2013b) Veterinary legislation.

Oyoo-Okoth E., Cherop L., Ngugi C.C. *et al.* (2011) Survival and physiological response of *Labeo victorinus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient. *Aquaculture* **319**, 226-231.

Pankhurst N.W. (2011) The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology* **170**, 265-275.

Parodi T., Cunha M., Becker A. *et al.* (2014) Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem* **40**, 323-334.

Paterson B.D., Rimmer M.A., Meikle G.M., Semmens G.L. (2003) Physiological responses of the Asian sea bass, *Lateolabrax japonicus* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture* **218**, 717-728.

Pavlidis M., Sundvik M., Chen Y.-C., Panula P. (2011) Adaptive changes in zebrafish brain in dominant-subordinate behavioral context. *Behavioural Brain Research* **225**, 529-537.

Peeler E.J., Murray A.G., Thebault A., Brun E., Giovaninni A., Thrush M.A. (2007) The application of risk analysis in aquatic animal health management. *Preventive Veterinary Medicine* **81**, 3-20.

Peter M.C.S. (2011) The role of thyroid hormones in stress response of fish. *General and Comparative Endocrinology* **172**, 198-210.

Petney T.N., Taraschewski H. (2011) 3.12 - Waterborne Parasitic Diseases: Hydrology, Regional Development, and Control. pp. 303-366 in P. Wilderer editor. *Treatise on Water Science*. Elsevier, Oxford.

Petty B.D., Francis-Floyd R. (2004) Pet fish care and husbandry. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **7**, 397-419.

Pottinger T.G., Carrick T.R. (1999) A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture* **175**, 351-363.

Pough F.H.J., C. M.; Heiser, J. B. (2003) *A Vida dos Vertebrados*, 3 ed. Atheneu São Paulo.

Prappas J.M.G., L.E.; White, R. (1991) Reproductive behavior of the sergeant major, *Abudefduf saxatilis*, within a closed system aquarium. *Environ Biol Fish* **31**, 33-40.

Proelss A., Houghton K. (2012) The EU Common Fisheries Policy in light of the precautionary principle. *Ocean & Coastal Management* **70**, 22-30.

Quimbayo J.P., Floeter S.R., Noguchi R. *et al.* (2012) Cleaning mutualism in Santa Luzia (Cape Verde Archipelago) and São Tomé Islands, Tropical Eastern Atlantic. *Marine Biodiversity Records* **5**, null-null.

Randall D., Burggren W., French K. (2000) *Fisiologia Animal - Mecanismos e Adaptações*, 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Reglero P., Balbín R., Ortega A. *et al.* (2013) *First attempt to assess the viability of bluefin tuna spawning events in offshore cages located in an a priori favourable larval habitat.*

Reid S.G., Bernier N.J., Perry S.F. (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **120**, 1-27.

Reynoso F.L., Castañeda-Chávez M., Zamora-Castro J.E., Hernández-Zárate G., Ramírez-Barragán M.A., Solís-Morán E. (2012) La acuariofilia de especies ornamentales marinas: un mercado de retos y oportunidades. *Latin American Journal of Aquatic Research* **40**, 12-21.

Richards J.G. (2011) Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 191-199.

Roberts H., Palmeiro B.S. (2008) Toxicology of Aquarium Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **11**, 359-374.

Roberts H.E., Palmeiro B., Weber Iii E.S. (2009) Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **12**, 609-638.

Roberts H.E., Smith S.A. (2011) Disorders of the Respiratory System in Pet and Ornamental Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **14**, 179-206.

Rodríguez-Fuentes G., Soto M., Luna-Ramírez K. (2013) Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **96**, 99-102.

Romero L.M., Dickens M.J., Cyr N.E. (2009) The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior* **55**, 375-389.

Rubec P., Cruz F., Pratt V., Oellers R., McCullough B., Lallo F. (2001) Cyanide-free Net-caught Fish for the Marine Aquarium Trade. *Aquarium Sciences and Conservation* **3**, 37-51.

Rummer J.L., McKenzie D.J., Innocenti A., Supuran C.T., Brauner C.J. (2013) Root Effect Hemoglobin May Have Evolved to Enhance General Tissue Oxygen Delivery. *Science* **340**, 1327-1329.

Sales J., Janssens G.P.J. (2003) Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources* **16**, 533-540.

Sampaio F.D.F., Ostrensky A. (2013) Brazilian environmental legislation as tool to conserve marine ornamental fish. *Marine Policy* **42**, 280-285.

Sánchez L.H. (2008) *Avaliação de Impacto Ambiental: conceitos e métodos*. Oficina de Textos, São Paulo.

Schmidt-Nielsen K. (1996) *Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente.*, 5 ed. Livraria Santos Editora, São Paulo.

Scholz T. (1999) Parasites in cultured and feral fish. *Veterinary Parasitology* **84**, 317-335.

Schreck C.B. (2010) Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 549-556.

Schreck C.B., Jonsson L., Feist G., Reno P. (1995) Conditioning improves performance of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. *Aquaculture* **135**, 99-110.

Schulte P.M. (2014) What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *The Journal of Experimental Biology* **217**, 23-34.

Semmens B.X., Buhle E.R., Salomon A.K., Pattengill-Semmens C.V. (2004) A hotspot of non-native marine fishes: evidence for the aquarium trade as an invasion pathway. *Marine Ecology Progress Series* **266**.

Simberloff D. (2005) The politics of assessing risk for biological invasions: the USA as a case study. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 216-222.

Simonovic P., Tomic A., Vassilev M. et al. (2013) Risk assessment of non-native fishes in the Balkans Region using FISK, the invasiveness screening tool for non-native freshwater fishes.

Singh R.K., Vartak V.R., Balange A.K., Ghughuskar M.M. (2004) Water quality management during transportation of fry of Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture* **235**, 297-302.

Skomal G.B., Mandelman J.W. (2012) The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: A review with a focus on the secondary response. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **162**, 146-155.

Smith S.A. (1997) Mycobacterial infections in pet fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **6**, 40-45.

Souza-Bastos L.R., Páscoa M.I., Freire C.A., Wilson J.M. (2014) Ammonia excretion and expression of transport proteins in the gills and skin of the intertidal fish *Lipophrys pholis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **167**, 15-24.

Stieglitz J.D., Benetti D.D., Serafy J.E. (2012) Optimizing transport of live juvenile coho (Rachycentron canadum): Effects of salinity and shipping biomass. *Aquaculture* **364–365**, 293-297.

Stoskopf M.K. (2002) Chapter 20 - Biology and Health of Laboratory Fishes. pp. 885-907 in G.F. James, C.A. Lynn, M.L. Franklin, L.C.A.F.M.L. Fred W. QuimbyA2 - James G. Fox, W.Q. Fred editors. *Laboratory Animal Medicine (Second Edition)*. Academic Press, Burlington.

Tenningen M., Vold A., Olsen R.E. (2012) The response of herring to high crowding densities in purse-seines: survival and stress reaction. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **69**, 1523-1531.

Thomas J.M., Callan S.J. (2010) *Economia Ambiental - Fundamentos, Políticas e Aplicações*. Cengage Learning, São Paulo.

Thomas V.G., Vasarhelyi C., Niimi A.J. (2009) Legislation and the capacity for rapid-response management of nonindigenous species of fish in contiguous waters of Canada and the USA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **19**, 354-364.

- Tissot B.N., Best B.A., Borneman E.H. *et al.* (2010) How U.S. ocean policy and market power can reform the coral reef wildlife trade. *Marine Policy* **34**, 1385-1388.
- Tondolo J.S.M., Amaral L.d.P., Simoes L.N. *et al.* (2013) Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology* **11**, 667-674.
- Treasurer J.W. (2012) Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L. and stabilisation using buffering agents. *Aquaculture* **330–333**, 92-99.
- Urbinati E.C., Carneiro P.C.F. (2006) Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleost: Characidae). *Acta Amazonica* **36**, 569-572.
- Urbinati E.C., de Abreu J.S., da Silva Camargo A.C., Landinez Parra M.A. (2004) Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* **229**, 389-400.
- Van Long N., McWhinnie S.F. (2012) The tragedy of the commons in a fishery when relative performance matters. *Ecological Economics* **81**, 140-154.
- Varsamos S., Flik G., Pepin J.F., Bonga S.E.W., Breuil G. (2006) Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* **20**, 83-96.
- Vincent A.C.J., Foster S.J., Koldewey H.J. (2011) Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. *Journal of Fish Biology* **78**, 1681–1724.
- Vitale A.M., Monserrat J.M., Castilho P., Rodriguez E.M. (1999) Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Physiol* **122**, 121-129.
- Walsh P.J. (1997) Evolution and regulation of urea synthesis and ureotely in (Batrachoidid) fishes. *Annual Review of Physiology* **59**, 299-323.
- Wan Norhana M.N., Dykes G.A., Padilah B., Ahmad Hazizi A.A., Masazurah A.R. (2012) Determination of quarantine period in African catfish (*Clarias gariepinus*) fed with pig (*Sus* sp.) offal to assure compliance with halal standards. *Food Chemistry* **135**, 1268-1272.
- Weber Iii E.S. (2011) Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **14**, 21-32.
- Wells R.M.G., Dunphy B.J. (2009) Potential impact of metabolic acidosis on the fixed-acid Bohr effect in snapper (*Pagrus auratus*) following angling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **154**, 56-60.

Wells R.M.G., Pankhurst N.W. (1999) Evaluation of Simple Instruments for the Measurement of Blood Glucose and Lactate, and Plasma Protein as Stress Indicators in Fish. *Journal of the World Aquaculture Society* **30**, 276-284.

Whittington R.J., Chong R. (2007a) Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine* **81**, 92-116.

Whittington R.J., Chong R. (2007b) Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine* **81**, 92-116.

Willmer P., Stone G., Johnston I.A. (2005) *Environmental physiology of animals*. Blackwell, Malden.

Wood E.M., editor. (2001) *Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies*. Marine Conservation Society, UK.

Wright K.A., Woods C.M.C., Gray B.E., Lokman P.M. (2007) Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Journal of Fish Biology* **70**, 1447-1457.

Zeppenfeld C.C., Toni C., Becker A.G. *et al.* (2014) Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* **418-419**, 101-107.