

Estágio Curricular na Aquacria Piscícolas S.A.

*Implementação de um plano de garantia de bem-estar na
Aquacria Piscícolas S.A.*

*Avaliação do impacto em Solea senegalensis expostos a luz
de diferentes comprimentos de onda: crescimento, indicadores de
stress e na pigmentação*

Pedro de Jesus Pires



Estágio Curricular na Aquacria Piscícolas S.A.

*Implementação de um plano de garantia de bem-estar na
Aquacria Piscícolas S.A.*

*Avaliação do impacto em Solea senegalensis expostos a luz
de diferentes comprimentos de onda: crescimento, indicadores de
stress e na pigmentação*

Pedro de Jesus Pires

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação de:
Licenciada (Pré-Bolonha) em Ciências do Meio Aquático Renata Serradeiro
Especialista em Pescas-Aquacultura Teresa Baptista

2015

Direitos de Cópia

Autorizo os direitos de copyright do presente relatório de estágio de mestrado.

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Para terminar este trabalho, contei com a disponibilidade, apoio e colaboração de um grande grupo de pessoas, que se tornaram minhas amigas. Dentro de muitas, a toda a equipa da SEA8, em especial ao pessoal da Aquacria Piscícolas S.A. por me receberem tão bem e que me integraram melhor do que poderia imaginar. Para elas o meu reconhecimento, sobretudo para me incentivarem a ultrapassar grandes dificuldades, nesta fase da minha vida.

Manifesto a minha gratidão à Professora Teresa Baptista, orientadora desta tese, pela sua disponibilidade desde o primeiro dia até o último, pelas críticas e conselhos na escrita deste relatório de estágio, mas sobretudo pelo estímulo e ajuda na concretização do mesmo.

Agradeço também à Renata Serradeiro, diretora de I+D do grupo SEA8, pela sua simpatia desde o nosso primeiro encontro e por todas as oportunidades gratificantes que me permitiu alcançar, pautadas por uma convivência saudável.

Agradeço ao Doutor Hans van de Vis pela revisão de todos os documentos e pela orientação fundamental na elaboração deste projeto.

Por fim, agradeço aos meus pais, namorada e amigos, pela ajuda e pelo incentivo dado durante todo este longo trajeto, por vezes difícil, por vezes sem vontade.

Muito Obrigado a todos.

Resumo

A sobre pesca, o aumento da procura de proteína e o crescimento da população levam a que o aumento na produção animal seja crucial, para combater estes problemas. Hoje em dia, muitas autoridades apoiam que a aquacultura é uma maneira de ultrapassar estes problemas, esta atividade apresenta a maior taxa de expansão a nível global, no entanto com este crescimento novos obstáculos emergem, quer pela pressão para corresponder aos padrões da sociedade, quer pela pressão de autoridades reguladoras. Atualmente e cada vez mais, a sociedade preocupa-se com as condições de bem-estar animal em produção, isto foi primeiramente direcionado para a produção de animais terrestres, mas, com o aumento da aquacultura esta preocupação é agora aumentada para este sector. Por isso, existem agora autoridades especializadas em bem-estar animal em produção, inclusive no sector da aquacultura, que pode certificar que a produção preenche os padrões de bem-estar animal. Contudo, esta certificação acontece, principalmente, nos países nórdicos da Europa e é esperado que esta preocupação crie pressão em produtores de outros países desenvolvidos. Devido a isso a direção da Aquacria Piscícolas S.A. estava interessada na implementação de um plano *Fish Welfare Assurance System (FWAS)*, com o intuito de melhorar as condições de produção para salvaguardar o bem-estar animal, este plano irá ajudar a instalação na obtenção de uma futura certificação para o bem-estar e na competição em mercados internacionais. O linguado tem um grande potencial para a aquacultura, pois apresenta um valor económico elevado contudo apresenta diversas dificuldades entre as quais, a suscetibilidade a doenças, requisitos nutricionais, grande dispersão no tamanho, entre outros. Para esclarecer alguns destes parâmetros este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de luz de diferentes comprimentos de onda no crescimento, bem como parâmetros hematológicos e imunológicos e ainda alterações na coloração da pele em *Solea senegalensis*. Este ensaio realizou-se nas instalações da Aquacria Piscícolas S.A. Vinte e sete mil juvenis foram divididos em seis tanques com um sistema de recirculação de água e mantidos sobre um regime intensivo de produção. Foram utilizadas lâmpadas azuis com um comprimento de onda de 400nm, lâmpadas brancas com um comprimento de onda de 450nm e lâmpadas revestidas com uma película vermelha como controlo. Para analisar o crescimento foram realizadas amostragens de duzentos peixes por tanque. Já para os parâmetros

hematológicos e imunológicos retirou-se sangue de seis peixes por tanque e quanto à coloração da pele a amostragem foi de cinquenta peixes por tratamento.

Em todos os aspetos calculados relacionados com o crescimento, a luz branca parece ser a que promove um maior desenvolvimento, alcançando uma percentagem de 112 % comparando com a curva modelo da SEA8. Quanto aos parâmetros hematológicos, os resultados mostram que existe uma diminuição da percentagem de trombócitos e linfócitos, sendo que isto significa que os peixes se encontram em *stress*, quanto aos dados imunológicos, a glucose elevada pode ser indício para agentes stressantes. A análise à coloração da pele mostra que os peixes mantidos no controlo apresentam a cor com mais brilho, tornando-a mais clara.

Concluindo, a luz azul parece não ter um efeito benéfico tanto no crescimento como na coloração da cor da pele, sendo que a luz branca é aquela que influencia positivamente no crescimento. O controlo é aquele que tem os resultados mais satisfatórios para a coloração da pele.

Ao longo destes trabalhos, havia também o objetivo de realizar um estágio nesta instalação, com a finalidade de perceber como é o trabalho rotineiro numa aquacultura.

Palavras-chaves: FWAS, Bem-estar, comprimento de onda, Pigmentação, *stress*, *Solea senegalensis*

Abstract

The overfishing, the increased protein demand and growth of the population, mean that the increase in animal production is crucial to combat these problems. Nowadays, many authorities support that aquaculture is a way to overcome these problems and this activity has the highest global expansion rate. However new obstacles arrive with this expansion, either the pressure to correspond to society's standards and regulatory authorities.

Currently, society is concerned about the animal welfare conditions in production. It was first directed to the production of land animals, but with increasing aquaculture this concern is now extended to this sector. So there are now specialized authorities in animal welfare at aquaculture sector which can make sure that the production meets the animal welfare standards. However, this certification takes place mainly in the Nordic countries of Europe and it is expected that this concern create pressure on producers in other developed countries. Because of this, the direction of Aquacria Piscícolas SA was interested in implementing a Fish Welfare Assurance System Plan (FWAs), in order to improve production conditions to ensure animal welfare. This plan will help the facility in obtaining future certification for the well-being and be able to compete in international markets. Additionally, the Senegalese sole has a great potential for aquaculture, since it has a high economic value. However presents several problems including, susceptibility to disease, nutritional requirements and great dispersion in the size among others. To clarify some of these parameters this study took place to evaluate the effect of light of different wavelengths in growth as well as haematological and immunological parameters and further changes in skin colouring at *Solea senegalensis*. This test was carried out at Aquacria Piscícolas S.A. facilities using twenty-seven thousand young fishes which were divided into six tanks with a water recirculation system and maintained on an intensive system of production. Blue light was used with a wavelength of 400nm, white light with a wavelength of 450nm and a red light coated film as a control. To analyse the growth, samples of two hundred fish per tank were made. For haematological and immunological parameters withdrew blood from six fish per tank. With regard to skin coloration fifty fishes per treatment were used.

In all aspects related to the calculated growth in white light appears to be promoting a higher development, reaching a percentage of 112% compared with the model SEA8 curve. In haematological and immunological parameters, the results show

that there is a decrease in the percentage of lymphocytes and thrombocytes and high glucose levels means that the fish are under stress. The analysis of the staining of the skin shows that the fish held in the control exhibit the colour brighter, making it clearer.

In conclusion, the blue light appears to have no beneficial effect on both fish growth and coloration of the skin. The white light seems to influence positively the fish growth and the control is one that has the most satisfactory results for the coloration of the skin.

Throughout these studies, there was also the aim of performing one stage in this installation, in order to realize it as a routine work in aquaculture.

Key words: FWAS, welfare, wavelength, pigmentation, *stress*, *Solea senegalensis*

Índice

I – Relatório de estágio na Aquacria Piscícolas S.A.	1
A empresa	3
<i>Pré-engorda</i>	5
<i>Crescimento</i>	6
<i>Embalagem e acondicionamento do pescado</i>	11
II - Introdução	13
Estado da aquacultura mundial	15
Aquacultura em Portugal	16
<i>A produção aquícola</i>	18
Bem-Estar Animal	19
<i>Saúde: Fundamental para o bem-estar</i>	21
<i>Procedimentos que comprometem o bem-estar</i>	21
Biologia da Espécie: <i>Solea senegalensis</i>	28
III – Implementação de um plano de garantia de bem-estar na Aquacria Piscícolas S.A.	31
Implementação do FWAS.....	35
1. <i>Reunir uma equipa</i>	35
2. <i>Descrição da espécie</i>	35
3. <i>Identificação do uso do produto</i>	36
4. <i>Construção de um fluxograma</i>	36
5. <i>Verificação do fluxograma no local</i>	38
1. <i>Condução de uma análise de perigos e avaliação de riscos</i>	38
2. <i>Determinação de pontos críticos de controlo (PCC)</i>	39
3. <i>Estabelecer níveis-alvo (TLS) e limites críticos (CLS) para cada PCC</i>	39
4. <i>Estabelecer procedimentos de monitorização</i>	46
5. <i>Estabelecer medidas corretivas</i>	47

6. <i>Estabelecer procedimentos de verificação</i>	48
7. <i>Estabelecer um sistema de registo</i>	49
IV - Avaliação do impacto em <i>Solea senegalensis</i> expostos a luz de diferentes comprimentos de onda: crescimento, indicadores de stress e na pigmentação	51
Introdução	53
<i>Alterações na Pigmentação</i>	53
<i>Stress: Indicador de bem-estar</i>	56
<i>Imunologia</i>	58
Materiais e métodos	59
<i>Desenho Experimental</i>	59
<i>Amostragens</i>	61
<i>Parâmetros estudados</i>	61
Resultados	63
Discussão	72
Conclusão	77
Referências	79
Anexos	87

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Localização da empresa Aquacria Piscícolas S.A. (Fonte: Google maps).....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 - Ala da pré-engorda (Fonte: própria).....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3- Módulos cinco e seis da área da engorda (Fonte: própria).....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4 - Esquema da vista lateral do crescimento, adaptado do panfleto Aquacria.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 5- O alimentador automático (Esquerda) e o programa que o controla (Direita). (Fonte: Própria).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 6 - Constituintes do sistema de tratamento de água. A) Tanques circulares da receção da água proveniente do furo; B) Filtro de areia; C) Escumadores de proteínas; D) Torre de oxigénio; E) Sedimentadores; F) Tanques de produção. (Fonte: Própria).....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 7- Determinação da concentração de amónia e nitritos (Esquerda) e computador responsável pelos alarmes de oxigénio (Direita). (Fonte: própria).....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 8 - Carro para distribuição de ração ao longo dos corredores (Fonte: própria).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 9 - Mesa de calibragem (Fonte: própria).....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 10- Máquina calibradora na sala de abate e embalamento (Fonte: própria).....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 11 - Capturas mundiais na pesca e produção mundial em aquacultura (Fonte: FAO 2014).</i>	<i>16</i>
<i>Figura 12 - Tipos de estabelecimentos em águas marinhas e salobras em Portugal (Fonte: INE/DGRM 2014).</i>	<i>17</i>
<i>Figura 13 - O plano FWAS é implementado quando os pré-requisitos são cumpridos, adaptado de Van de Vis et al., 2012.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 14 - Grupo de símbolos que podem ser usados na elaboração de um fluxograma, adaptado de van de Vis et al. (2012).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 15 - Fluxograma da Aquacria Piscícolas S.A., adaptado de van de Vis et al. (2012)....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 16 - Identificação dos pontos críticos de controlo (PCC), adaptado de Van de Vis et al. (2012).</i>	<i>39</i>
<i>Figura 17 - Esquema para explicar o limite crítico (M) e o limite operacional (m), adaptado de van de Vis et al., (2012).....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 18 - Trajetos realizados na triagem no dia 5 de Maio.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 19- A esfera CIELAB (Fonte: Van der Salm, 2004)</i>	<i>54</i>
<i>Figura 20- Esquema dos tanques</i>	<i>60</i>
<i>Figura 21 - Locais na pele do peixe onde o colorímetro fez as medições.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 22- Diagrama da análise de componentes principais (ACP) para parâmetros hematológicos e imunológicos para os diferentes tratamentos luminosos. Cada vetor representa um parâmetro hematológico (NEUT – Neutrófilos; MON – Monócitos; THROM – trombócitos e LYM – Linfócitos) e imunológico (Prot – Proteínas; Trigl – triglicéridos; Lisoz – Lisozima; Lact</i>	

– Lactato; ActB – Atividade Bacteriana; Perox – Peroxidase e Gluc – Glucose), e cada ponto representa os tanques (W1 – Tratamento com Luz branca no tempo 1, W2 – tratamento com luz branca no tempo 2; B1 – Tratamento com luz azul no tempo 1, B2 – tratamento com luz azul no tempo 2; C1 – Controlo no tempo 1, C2 – Controlo no tempo 2) com diferentes tratamentos luminosos..... 71

Índice de Tabelas

<i>Tabela I - Composição analítica da ração SKRETTING ELITE, adaptado do folheto SKRETTING</i>	10
<i>Tabela II- Evolução da produção aquícola (toneladas) por meios de cultura (Fonte INE/DGRM 2014).</i>	18
<i>Tabela III - Exemplos de estudos com diferentes densidades e espécies.</i>	23
<i>Tabela IV - Dados obtidos durante o abate</i>	42
<i>Tabela V - Média de tempos de exposição ao ar</i>	44
<i>Tabela VI - Relação entre o desperdício e o aumento de ração disponibilizada vs stress</i>	44
<i>Tabela VII - Percentagem de tanques adjacentes afetados</i>	45
<i>Tabela VIII - Relação entre diferentes tempos de exposição ao ar e desperdício de ração</i>	46
<i>Tabela IX - Sistema de monitorização numa instalação aquícola, adaptado de van de Vis et al., (2012).</i>	47
<i>Tabela X - Ações corretivas que podem ser aplicadas numa aquacultura, adaptado de van de Vis et al., (2012).</i>	48
<i>Tabela XI - Procedimentos de verificação numa aquacultura, adaptado de van de Vis et al., (2012).</i>	49
<i>Tabela XII - Constituição de um plano FWAS, adaptado de van de Vis et al., (2012).</i>	50
<i>Tabela XIII- Comparação do peso médio final (g) entre tanques com o mesmo regime luminoso.</i>	64
<i>Tabela XIV- Pesos médios finais comparando tratamentos, individualizando os tanques A e B de cada regime luminoso (Azul, Branco e Controlo).</i>	65
<i>Tabela XV- Comparação da soma dos tanques com a curva modelo da SEA 8, agrupando por tratamento (Azul, Branco e Controlo).</i>	65
<i>Tabela XVI- Comparação entre tanques com a curva modelo da SEA 8.</i>	66
<i>Tabela XVII- Condições do ensaio experimental - Número de peixes, peso médio (PM), biomassa, densidade e comprimento standard, no dia inicial (8 Maio) e no dia final (22 Junho).</i>	66
<i>Tabela XVIII- Parâmetros calculados com base nas amostragens efetuadas – Peso, RGR and SGR.</i>	67
<i>Tabela XIX- Valores da leitura do colorímetro à superfície da pele de Solea senegalensis</i>	67
<i>Tabela XX- Proporção relativa de células no sangue (trombócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos) de Solea senegalensis de diferentes tratamentos durante 46 dias.</i>	68
<i>Tabela XXI- Parâmetros da resposta imune inata de Solea senegalensis com diferentes tratamentos luminosos durante 46 dias.</i>	69

Lista de Abreviaturas

- FAO** – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura;
- INE/DGRM** – Instituto Nacional de Estatística/Direção Geral dos Recursos Marinhos
- RSPCA** – Sociedade Real para a Prevenção da Crueldade contra os Animais;
- HACCP** – Análise de perigos e controlo de pontos críticos;
- FWAS** – Sistema de garantia de bem-estar;
- QA** – Controlo de qualidade
- CQ** – Garantia de qualidade
- GMP** – Boas práticas de produção;
- BCP** – Plano de Biossegurança;
- PCC** – Pontos críticos de controlo;
- RA** – Avaliação de riscos;
- OWI** – Indicadores operacionais de bem-estar;
- RAS** – Sistema de Recirculação de água;
- RGR** – Taxa de crescimento relativo;
- SGR** – Taxa de crescimento específico;
- HPA** – Complexo Hipotálamo-Hipófise-Células interrenais;
- α MSH** – Hormona estimulante α melanócito;
- MCH** – Hormona concentradora de melanina;
- ACTH** – Hormona adrenocorticotropica.

I – Relatório de estágio na Aquacria Piscícolas S.A.

A empresa

A “SEA8” é uma empresa de capital Espanhol que desde o início de 2012 se dedica à produção sustentável de linguado em Aquacultura. Tem como convicção que a aquacultura pode ser o 8º mar, aquele que pode dar resposta às necessidades alimentares de uma população em crescimento confrontada com a realidade que é a depleção dos *stocks* naturais nos sete mares.

Presentemente a “SEA 8” dispõe de instalações produtivas no norte e no centro de Portugal: uma maternidade, Safiestela - Sustainable Aqua Farming Investments, Lda., localizada no Lugar do Rio Alto, Póvoa do Varzim, com capacidade para produzir anualmente mais de 5 milhões de juvenis e uma unidade de crescimento, Aquacria Piscícolas S.A. sediada nas Quintas do Norte, Torreira (Figura 1) dimensionada para produzir 200 toneladas por ano de linguado para consumo.



Figura 1 - Localização da empresa Aquacria Piscícolas S.A. (Fonte: Google maps)

O objetivo do grupo “SEA 8” é a produção em massa de juvenis na sua unidade da Safiestela, seguida da fase de crescimento nas instalações da Aquacria. A produção é iniciada na Safiestela, onde é feita a reprodução e a manutenção das larvas até à fase de pré-engorda. Posteriormente os juvenis são transportados para a Aquacria, onde se efetua o crescimento dos indivíduos.

Aquando do início desta empresa em 1997, esta empresa dedicava-se ao crescimento de pregado (*Psetta maxima*), sendo os juvenis adquiridos a fornecedores de Espanha. No entanto, a instalação da Acuinova, empresa pertencente ao grupo PESCANOVA com cerca de 206 hectares, produzindo também pregado, inviabilizou do ponto de vista financeiro, a produção de pregado. Por este motivo, a estratégia de expansão da empresa passou pela requalificação das instalações, passando a produzir adicionalmente o linguado senegalês

(*Solea senegalensis*). O enorme investimento na modernização e requalificação da unidade da Safiestela – Sustainable Aqua Farming Investments, Lda. e da Aquacria Piscícolas S.A colocam-nas na vanguarda da aquacultura em Portugal. É de prever, que num curto espaço de tempo esta empresa passe a ser a número um, na produção de linguado da Península Ibérica. O domínio completo de todo o ciclo produtivo do linguado dará uma enorme vantagem económica e competitiva a esta empresa.

A empresa optou por apostar na inovação, na tecnologia de ponta e métodos inovadores para proporcionar aos peixes as melhores condições de estabulação e a estabilidade ambiental de que necessitam para fazer uma utilização ótima dos recursos disponíveis. Ambas as instalações operam em regime de recirculação, ou seja a maioria da água utilizada é continuamente tratada através de uma combinação de processos físicos e biológicos. Isto permite por um lado tratar o pequeno volume de água adicionada a um nível que inviabiliza a entrada na instalação de agentes patogénicos e por outro lado permite também tratar o efluente gerado e reaproveitar nutrientes que de outra forma seriam desperdiçados. Em paralelo esta tecnologia permite ainda manter os peixes num ambiente de qualidade adequada e muito estável, maximizando o seu bem-estar e otimizando o seu crescimento e a utilização dos recursos necessários, como sejam o alimento, a energia e o oxigénio (Bravo, 2015).

Na unidade de crescimento, os juvenis produzidos na maternidade são recebidos com o maior cuidado, para facilitar a sua ambientação às novas instalações. Durante mais de um ano os linguados vão ser mantidos num ambiente estável e confortável e são alimentados com dietas especialmente formuladas para a espécie, as quais asseguram as excelentes características nutricionais e sensoriais do produto acabado. Periodicamente, são calibrados por tamanho (triagem), de forma a garantir que fazem o melhor uso possível do espaço e do alimento, otimizando o seu bem-estar e a utilização dos recursos consumidos. Cerca de um ano e meio depois de nasceram, estão finalmente prontos para o mercado. Na “SEA 8” pesca-se exclusivamente para o fornecimento de servir encomendas confirmadas, de forma a garantir a máxima frescura do produto e a total satisfação do cliente. A embalagem é feita na unidade de embalamento e acondicionamento do pescado, sendo que as caixas com o produto final são expedidas para os clientes até 12h após a captura. Não havendo como tal, *stock* de produto acabado: o peixe capturado é enviado no mesmo dia para o cliente que o encomendou. Esta combinação de processos garante a máxima frescura, higiene e qualidade

do produto, bom como a sua conservação por um período de tempo adequado para que o consumidor final possa disfrutar de todas as qualidades (Bravo, 2015).

Pré-engorda

A ala da pré-engorda é assim denominada porque no início da empresa quando ainda produzia pregado era nesta ala que se realizava a quarentena dos animais recebidos de maternidades externas, só depois eram movidas para a unidade de crescimento.



Figura 2 - Ala da pré-engorda (Fonte: própria).

A pré-engorda é constituída por três sistemas em que cada um possui dois tanques (racks). Os tanques são retangulares de fibra de vidro e estão distribuídos verticalmente (Figura 2). Os tanques são designados por “*shallow raceways*” e têm particularidades positivas tais como: nível de água entre 1 e 20 cm dependendo do tamanho do peixe; elevada densidade de cultivo, entre 100 e 300% onde os peixes usam toda a área disponível no fundo e funciona com um regime de recirculação de água (RAS). No decorrer do estágio, esta ala foi utilizada para a normal produção de linguado e ainda nestas mesmas instalações, decorreu um ensaio para testar luzes de diferentes comprimentos de onda.

Crescimento



Figura 3- Módulos cinco e seis da área da engorda (Fonte: própria).

Durante o período de estágio, os seis módulos da empresa estavam a funcionar. Cada módulo é constituído por um conjunto de cinco tanques, dispostos verticalmente (Figura 3). Entre módulos existe um corredor que os divide e que ainda divide os tanques Norte dos tanques Sul. No total existem sessenta tanques a funcionar (Figura 4). Cada tanque possui 3,20 metros de largura, 30 cm de altura e 30 metros de comprimento. A água contida no interior dos tanques tem por volta de 20 cm de altura.

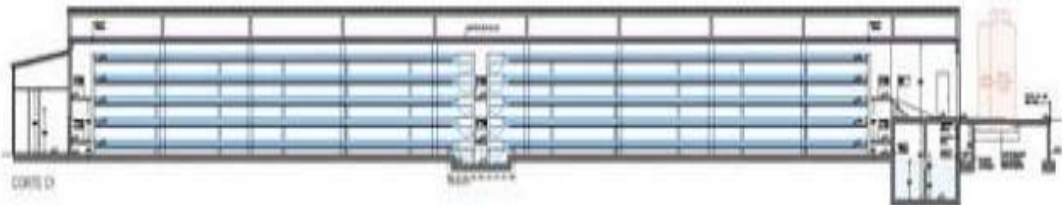


Figura 4 - Esquema da vista lateral do crescimento, adaptado do panfleto Aquacria

Na tentativa de otimizar o processo de alimentação a empresa optou pela aquisição de um alimentador automático controlado por um programa adaptado à realidade da empresa (Figura 5)



Figura 5- O alimentador automático (Esquerda) e o programa que o controla (Direita). (Fonte: Própria)

A captação de água é feita através de dois furos que se localizam nas imediações da empresa, mais precisamente nas dunas localizadas a sul do pavilhão do crescimento. Os furos encontram-se a uma profundidade de cerca de 40 metros. Entretanto a água é encaminhada para vários tanques circulares exteriores com capacidade de 9m³ (Figura 6) por onde passa por um processo de arejamento para oxidação do ferro dissolvido. Depois deste sistema de arejamento existe um filtro de areia que retém o ferro precipitado e outros sólidos em suspensão (Figura 6). A existência deste passo no tratamento de água é de extrema importância, uma vez que aqui ocorre a oxidação de Fe²⁺ para Fe³⁺ provocando um precipitado. A água captada no local possui uma grande concentração de ferro, que tem de ser removido porque se não o fosse, iria provocar mortalidade na produção, uma vez que o ferro acumula-se nas brânquias dos peixes.

Em seguida a água segue para o bio filtro, depois deste, ela segue para os escumadores de proteínas (Figura 6) em que a água vai ser misturada com a água proveniente da coluna de ozonação e segue para os tanques de produção (Figura 6). A utilização dos escumadores de proteínas deve-se à necessidade de retirar da água partículas finas que estão dissolvidas na água e que por métodos mecânicos estas não seriam removidas.

Para maximizar a produção e evitar níveis baixos de oxigénio na água a empresa possui uma torre de oxigénio (Figura 6). A entrada de água depois de tratada e efetuada pelas entradas dos tanques, que se situam opostamente, percorre toda a superfície do tanque levando consigo todos os desperdícios e produtos de excreção, saindo na zona de saída do tanque, estas que se situam no meio do pavilhão do crescimento. De seguida a água segue para os sedimentadores (Figura 6) onde as partículas provenientes do tanque são filtradas,

sendo a água depois direcionada para os filtros mecânicos começando assim todo o processo de tratamento de água (RAS).

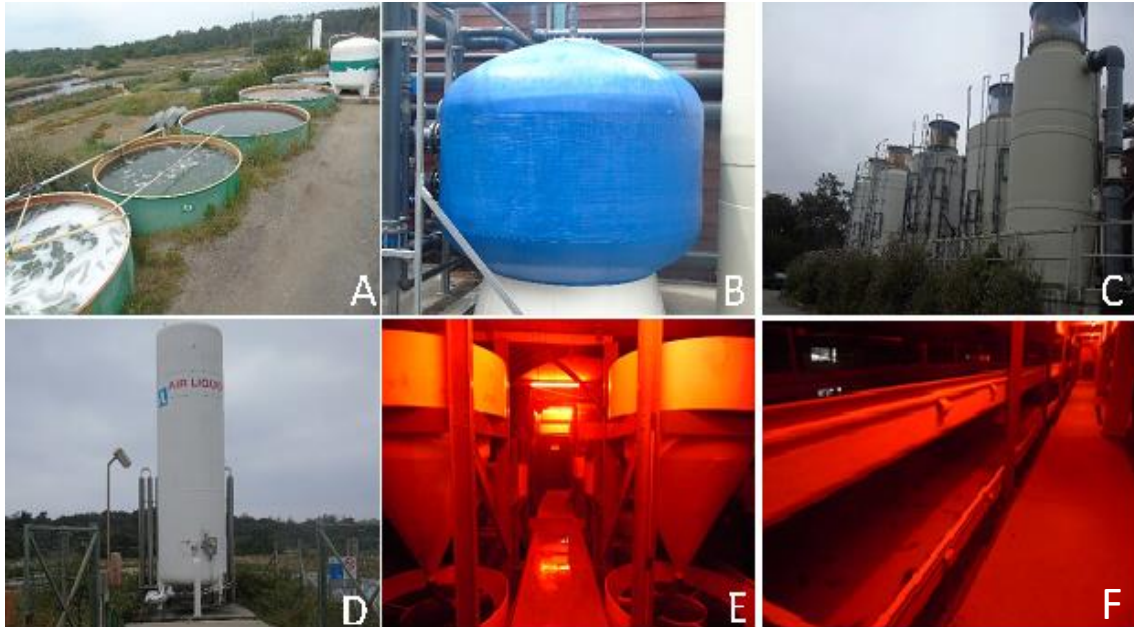


Figura 6 - Constituintes do sistema de tratamento de água. A) Tanques circulares da recepção da água proveniente do furo; B) Filtro de areia; C) Escumadores de proteínas; D) Torre de oxigénio; E) Sedimentadores; F) Tanques de produção. (Fonte: Própria).

Outra etapa bastante importante é a limpeza do circuito. Esta realiza-se diariamente e consiste na sifonagem das áreas de sedimentação criadas em cada tanque e na limpeza dos sedimentadores. Estas duas zonas são aquelas que no circuito mais necessitam de proteção em termos de limpeza. A análise da mortalidade é feita uma vez ao dia com a ajuda de um camaroeiro e de uma lanterna, em que os operadores correm todos os tanques recolhendo os mortos.

Para um bom desenvolvimento dos organismos aquáticos é fulcral ter o controlo do meio ambiente onde estão inseridos, neste caso, a água dos tanques onde se vão desenvolver. De modo a ter um maior controlo da qualidade da água, são realizadas análises diárias aos parâmetros mais importantes como amónia, nitritos e bromos, tanto na zona de crescimento como na pré-engorda (Figura 7). Procede-se ainda ao controlo da temperatura e do potencial redox através de sondas que se encontram no tanque. O controlo do oxigénio é feito usando sondas, caso as concentrações de oxigénio varie para valores críticos é acionado um alarme sonoro (Figura 7).



Figura 7- Determinação da concentração de amônia e nitritos (Esquerda) e computador responsável pelos alarmes de oxigênio (Direita). (Fonte: própria)

O principal produto do metabolismo dos peixes, a amônia, é removida dos tanques por nitrificação, este processo consiste na conversão da amônia em nitritos e posteriormente em nitratos. A amônia proveniente da decomposição da matéria orgânica, ração, excrementos é tóxica e deve ser medida com frequência. A medição de amônia baseia-se na reação dos compostos de amônia com o cloro. Os nitritos como a amônia, é tóxica para os peixes, daí ser necessário monitorizar a sua concentração. As amostras são retiradas individualmente de cada módulo. Os valores referentes às amostras obtêm-se pela leitura de um colorímetro.

Uma vez que é usado ozono para o tratamento da água a medição do bromo é fulcral uma vez que este em concentrações altas pode ser prejudicial para a saúde dos peixes. Dessa forma o controlo diário dos níveis de bromo previne riscos para a saúde dos peixes e para as instalações e contribuiu para melhorar a sua função na água e a sua medição é feita com a utilização do reagente *DPD total chlorine*.

Na Aquacria Piscícolas S.A., como acima referido, todo o alimento é dado aos peixes com o auxílio de alimentadores automáticos. Os peixes na empresa Aquacria Piscícolas S.A. são alimentados com ração seca *SKRETTING ELITE*. (Figura 8).



Figura 8 - Carro para distribuição de ração ao longo dos corredores (Fonte: própria).

Esta ração tem como principais ingredientes a farinha de peixe, óleo de peixe, óleo vegetal, produtos e subprodutos de cereais, produtos e subprodutos de leguminosas, vitaminas e minerais (Tabela I). Sendo que o tamanho da grão da ração depende do peso do peixe. À medida que o peixe cresce, torna-se necessário aumentar a granulometria da ração. No entanto esta transição não é imediata, uma vez que durante um período de tempo (aproximadamente duas semanas) misturam-se dois tamanhos. A ração é armazenada numa divisão separada do pavilhão do crescimento.

Tabela I - Composição analítica da ração SKRETTING ELITE, adaptado do folheto SKRETTING.

Produto	Proteína Bruta	Lípidos	Cinzas	Fibra	Total P	Energia Digestível
ELITE	57%	16%	10%	0,5%	1,6%	19,5 MJ/kg.

Para otimizar o rendimento da empresa é fundamental realizar amostragens e calibragens para agrupar os peixes por classes de peso. As amostragens têm como objetivo obter o peso e comprimento médios por tanque, sendo que estes valores vão ser uteis para atualizar o programa que controla as biomassas e por sua vez ajustar a quantidade de ração administrada. Os índices de crescimento são calculados pelo programa tendo em conta os valores obtidos nas amostragens. Esta técnica consiste em capturar aleatoriamente um

número conhecido de peixes de uma divisão com o auxílio de um camaroeiro e depois proceder a pesagem e medição dos peixes.

A calibragem é usada para agrupar os peixes por classes de tamanhos o que vai maximizar o consumo de ração. Para isso são criadas várias categorias de pesos que são introduzidas no sistema de balança que se encontra na mesa de calibragem. Na prática os peixes são capturados com o camaroeiro, são levados para a mesa de calibragem (Figura 9) e mediante um sistema de portas que abrem de acordo com o peso do peixe, estes são separados para diferentes unidades.



Figura 9 - Mesa de calibragem (Fonte: própria)

Embalagem e acondicionamento do pescado

Por último, a empresa possui uma própria sala de embalagem e acondicionamento do pescado (Figura 10). Os linguados que atingiram os pesos mínimos de comercialização são capturados dos tanques e são colocados nos tanques de jejum, onde irão permanecer pelo menos durante 48 horas. Após estar cumprido o tempo de jejum os peixes são capturados e abatidos. O método de abate realizado é por choque térmico e consiste em introduzir os peixes numa mistura de água e gelo.



Figura 10- Máquina calibradora na sala de abate e embalagem (Fonte: própria)

Depois de mortos os peixes são introduzidos numa máquina calibradora (Figura 10), que os vai separar, por tamanhos e para as caixas. Os peixes são acondicionados em caixas de poliestireno e são envoltos numa folha de filme plástico e coberto com uma camada de gelo. O uso de plástico é importante para que o gelo não esteja em contato direto com o peixe e dessa forma evite causar queimaduras que possam afetar a qualidade do produto. Seguidamente a serem embalados as caixas são dispostas em paletes e seguem para a câmara de frio até serem transportadas para o seu destino.

O objetivo principal do estágio na empresa Aquacria Piscícolas S.A. baseou-se na implementação de um plano de garantia de bem-estar, uma vez que os valores éticos deste tema têm vindo a ganhar uma extrema importância por todo o mundo, proporcionando uma busca intensa dos produtos certificados por parte de alguns países desenvolvidos. Deste modo, a Aquacria Piscícolas S.A. está a conduzir os seus esforços para a implementação de um plano de garantia de bem-estar para futuramente certificar o seu produto, *Solea senegalensis*.

E ainda, foi proposto pela Aquacria Piscícolas S.A. um segundo projeto com o objetivo de determinar o efeito da luz, com comprimentos de onda diferentes, em vários parâmetros referentes ao desenvolvimento do peixe.

II - Introdução

Estado da aquacultura mundial

A aquacultura consiste na produção de organismos aquáticos (peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios e plantas aquáticas), tanto em água doce como em água salgada. Esta atividade remonta há mais de 3500-4000 anos. Nas últimas duas décadas a aquacultura foi ocupando uma parte cada vez mais importante no suprimento das necessidades alimentares da população mundial devido ao estado de sobre-exploração da maior parte dos recursos pesqueiros tradicionais. A aquacultura é uma atividade muito diversificada, que abrange uma vasta gama de espécies, sistemas e práticas. A expansão económica do sector nos últimos vinte anos contribuiu para a criação de emprego, para uma utilização mais eficiente dos recursos locais e para o aumento de oportunidades de investimento no sector produtivo. Esta expansão refletiu-se também num aumento da contribuição da aquacultura para o comércio regional e mundial (FAO, 2014). A produção mundial de peixes de aquicultura tem crescido rapidamente ao longo das últimas quatro décadas, contribuindo significativamente para abastecer o mundo de peixe para consumo humano (FAO, 2014). Em 2012, a produção total da aquacultura rondou os 66 milhões de toneladas (excluindo a produção de plantas aquáticas e de produtos não alimentares) (FAO, 2014). Estima-se que esta participação da aquacultura, no fornecimento de peixe para o consumo humano, atinja 65%, até 2030 (Fisheries - European Commission, 2012).

Independentemente da variedade de espécies produzidas em todo o mundo, cerca de 567, apenas 20 espécies representam 74% de toda a produção. Da mesma forma do que aconteceu com a produção animal terrestre, espera-se que a produção de aquacultura fique restringida a um número limitado de espécies (Bostock *et al.*, 2010; Diana *et al.*, 2013; FAO, 2014).

Atualmente, a aquacultura é uma das mais importantes indústrias de produção de alimento de elevado teor nutritivo. Em todo o mundo, a aquacultura tem contribuído para o bem-estar das populações, representando uma importante fonte de riqueza e um meio de subsistência (FAO, 2014). Paralelamente constitui uma alternativa às formas tradicionais de abastecimento de peixe para consumo, sendo que atualmente existe uma preocupação face à atual estabilização das capturas na pesca e no aumento da população mundial (FAO, 2014).

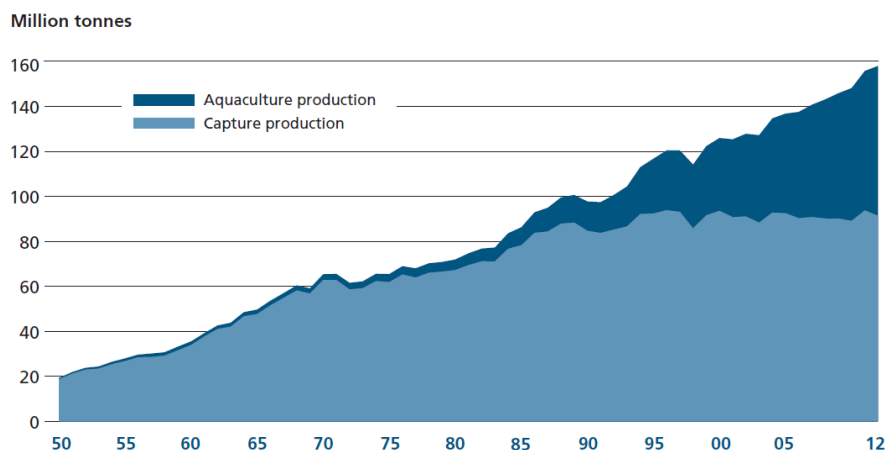


Figura 11 - Capturas mundiais na pesca e produção mundial em aquacultura (Fonte: FAO 2014).

O desenvolvimento mundial da aquacultura foi bastante importante para o suprimento de necessidades da população mundial sendo que o peixe de aquacultura contribuiu com 42,2% de um total de 158 milhões de toneladas (Figura 11). Em comparação, 13,4 % em 1990 e 25,7% em 2000.

O crescimento mundial da Aquacultura permanece relativamente forte, existindo uma crescente procura dos produtos aquícolas por todos os países. Contudo, as regiões industrializadas que mais produziam como os Estados Unidos da América, Espanha, França, Itália, Japão e Coreia estão a sofrer quebras na sua produção. A disponibilidade de peixe produzido noutros países, com custos relativamente mais baixos, foi a causa da rutura na produção dos países acima mencionados. O facto de ter havido essa quebra, permitiu que outros países produzissem, focando-se em espécies para exportação (FAO, 2014). A produção de proteína derivada da aquacultura expandiu 6,2% anualmente no período de 2000-2012, mais lentamente do que no período de 1980-1990 (10,8%) e no período de 1990-2000 (9,5%). Entre 1980 e 2012, a produção da aquacultura mundial aumentou 8,6% por ano. A produção de proteína proveniente da aquacultura aumentou mais do que o dobro, de 32,4 milhões de toneladas em 2000 para 66,6 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2014).

Aquacultura em Portugal

Os estabelecimentos aquícolas de culturas marinhas estão localizados nas zonas entre marés e em terra, fora das zonas de influência direta das marés mas suficientemente próximas

do mar para efeitos de captação de água (Plano estratégico para a aquicultura portuguesa, 2014). A aquicultura em Portugal caracteriza-se pela existência de um elevado número de estabelecimentos de pequena dimensão, nomeadamente viveiros de bivalves em zonas estuarinas ou de ria. Em 2012 existiam 1432 estabelecimentos ativos, ou seja, 96% dos 1492 estabelecimentos licenciados. Daqueles, 94,2% são viveiros para produção de moluscos bivalves; 4,7% são viveiros para a produção de peixe e 1 % são estruturas flutuantes, também destinadas à produção de moluscos bivalves (Figura 12).

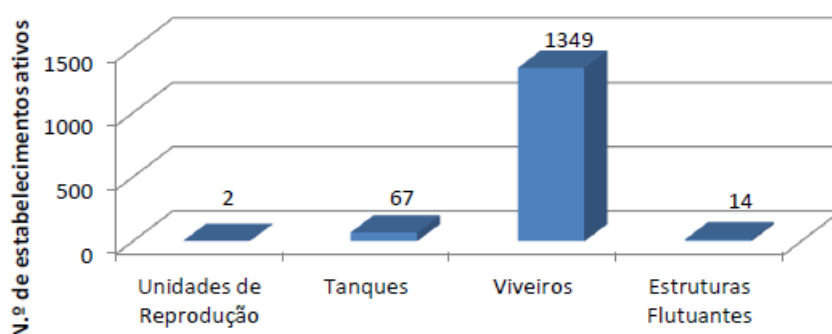


Figura 12 - Tipos de estabelecimentos em águas marinhas e salobras em Portugal (Fonte: INE/DGRM 2014).

O facto de as salinas estarem desativadas, proporcionou aos produtores de peixe uma forma alternativa de as usar, sendo que estas surgem como um processo barato e fácil para as converter em pisciculturas. Contudo apresenta uma produtividade limitada devido ao tamanho, tipo de fundos e os baixos fluxos de água, sendo por isso classificados como “semi-extensiva”, nestes sistemas é usado um regime alimentar misto, ou seja, alimento natural complementado com alimento inerte, dando por isso, um sabor e textura peculiar que os diferencia de outros produtos de aquicultura. Em regime extensivo ainda podemos encontrar nas zonas entre marés viveiros de bivalves.

Ultimamente, em Portugal foram criadas algumas instalações em regime intensivo na orla costeira, em que estas captam água do mar tendo como objetivo a produção de pregado e linguado. Em questão à instalação de estabelecimentos em mar aberto, estes apenas se localizam na costa algarvia, porque é onde as condições são mais favoráveis à prática de aquicultura, tem vindo a ser promovida para a produção de bivalves (Plano estratégico para a aquicultura portuguesa, 2014).

A produção aquícola

Desde o início dos anos 90 a produção aquícola aumentou de 4457 toneladas em 1990 para 10317 toneladas em 2012, representando um valor de 54 milhões de euros neste último ano (Tabela II).

Tabela II- Evolução da produção aquícola (toneladas) por meios de cultura (Fonte INE/DGRM 2014).

<i>Meios de cultura</i>	1990	1995	2000	2005	2010	2012
<i>Águas doces</i>	2266	958	1296	845	950	479
<i>Águas Marinhas e salobras</i>	2191	4081	6240	5850	7063	9839
Total	4457	5039	7536	6695	8013	10317

Nos últimos 25 anos verificou-se uma grande abertura por parte dos produtores a iniciação de novas espécies, enquanto em 1990 a produção se limitava a duas espécies, truta e amêijoas, sendo que até 2012 verificou-se uma abertura para outras espécies tendo isso aumentado a produção significativamente de várias espécies quer de peixes, quer de bivalves, destacando-se a produção de pregado com 4,4 mil toneladas, seguido da amêijoas boa, com 2,3 mil toneladas (Plano estratégico para a aquicultura portuguesa, 2014). A produção em águas marinhas e salobras tem mostrado uma tendência de crescimento, verificando-se que as espécies atualmente mais produzidas são o pregado, dourada/robalo, amêijoas e ostras.

A produção de peixe registou um aumento ao longo do período considerado, sendo de salientar o aumento significativo da produção de pregado que compensou a quebra acentuada verificada na produção de robalo e dourada. A redução verificada na produção destas duas espécies deveu-se à desativação de alguns estabelecimentos e, também, à passagem de regimes de produção semi-intensivo a regimes de produção extensivos (Plano estratégico para a aquicultura portuguesa, 2014).

Bem-Estar Animal

Atualmente, uma crescente preocupação social, que ocorre predominantemente na Europa, Canadá, Austrália e Nova Zelândia, resulta num crescente interesse no bem-estar dos peixes em aquacultura (Kiessling *et al.*, 2012). Os seres humanos afetam de muitas formas o bem-estar dos peixes, através das pescas, aquacultura e uma série de outras atividades contudo não existe uma medida para quantificar o bem-estar dos peixes (Huntingford *et al.*, 2006). Um dos problemas é que o bem-estar animal por vezes vai contra os interesses humanos, mas recentemente, estruturas éticas estão a tentar inverter essa tendência valorizando a importância do bem-estar (Huntingford *et al.*, 2006).

O termo bem-estar foi possivelmente usado pela primeira vez em 1975 em *Shelbourne* quando se discutia como aclimatar os reprodutores selvagens de *Peuronectes platessa*. O conceito de bem-estar espalhou-se para outros países e por outras áreas em que exista interação entre homem-peixe, como por exemplo, aquaculturas, oceanários, animais de estimação, pesca para alimento ou pesca desportiva, indústria, consumidores, organizações não-governamentais, distribuidores, cientistas e a classe governamental (Ellis *et al.*, 2012). Esta nova tendência tem vindo a ser alvo de pesquisa e investigação por parte da comunidade científica para ver se os peixes têm a capacidade fisiológica para sentir o sofrimento .

Uma questão surge quando se fala em bem-estar em peixes, esta passa por saber se os animais expostos a condições adversas, tais como danos físicos ou outros, sofrem tal como os humanos (Huntingford *et al.*, 2006). O neocórtex, que nos seres humanos é uma parte importante do mecanismo que gera a experiência subjetiva do sofrimento, nos peixes e em animais não-mamíferos não existe, o que leva a ser pensado que estes grupos de animais podem não sofrer. Uma forte visão alternativa, no entanto, afirma que os peixes são animais complexos e possuem comportamentos sofisticados, logo, provavelmente têm a capacidade de sofrimento, embora isso possa ser diferente em intensidade e tipo do que é vivido na experiência humana (Huntingford *et al.*, 2006). Em comum com todos os vertebrados, os peixes respondem aos desafios ambientais, ou aos desafios impostos pelo homem, com uma série de ajustes neuro-endócrinos adaptativos que são vulgarmente denominados de, resposta ao *stress*. Estes por sua vez induzem alterações reversíveis, tanto comportamentais como metabólicas que ajudam o peixe a superar ou evitar os desafios. Em contraste, a permanência

prolongada em estados adversos para o peixe faz com que a resposta ao *stress* seja prejudicial, uma vez que as respostas são mais prolongadas levando à imunossupressão, redução no crescimento e disfunção reprodutiva. Os indicadores associados à resposta ao *stress* crónico fornece uma fonte de informação sobre o estado de bem-estar de um peixe.

Não existe uma definição clara para o bem-estar animal contudo a saúde física é a medida de bem-estar mais universalmente aceite e é sem dúvida, um requisito necessário e essencial para o bem-estar. É importante lembrar que os problemas de saúde podem ser simultaneamente uma causa e uma consequência de mal-estar (Arlinghaus *et al.*, 2007; Ashley, 2007; Barber, 2007). Bem-estar pode ser definido como a qualidade de vida que um animal pode vivenciar (Torgersen *et al.*, 2011). Huntingford *et al* (2006) afirma que não é fácil criar uma definição precisa, porque o conceito é complexo e o termo é usado com vários sentidos contudo, a maioria das definições enquadra-se numa das três categorias e que nenhuma delas é errada nem certa do ponto de vista científico.

1. *Definições baseadas em sentimentos* – Estas são definidas em estados mentais subjetivos. Nestas, a exigência de um bom bem-estar é que o animal deve sentir-se livre, livre de experiências negativas, como dor ou medo e ter acesso a experiências positivas, tais como o companheirismo, no caso das espécies sociais (Dawkins, 1998).
2. *Definições baseadas em funções* – Estas são definidas sobre a capacidade de um animal em se adaptar ao ambiente presente. Para um bom bem-estar, exige que o animal esteja saudável, com o seu sistema biológico esteja a funcionar adequadamente e não ser forçado a responder além da sua capacidade (Dawkins, 1998)
3. *Definições baseadas na natureza* – Estas surgem a partir da visão em que cada espécie de animal tem uma natureza biológica inerente que deve expressar. Para um bom bem-estar, este exige que o animal seja capaz de levar uma vida natural e expressar o seu comportamento natural (Dawkins, 1998)

Com o crescente interesse no bem-estar nos peixes dentro da comunidade científica, produtores e Governo Europeu, surgiu a *European cost action 867 wellfish*. Durante a reunião científica inaugural em 2006, reconheceu-se que o *stress* é uma questão-chave nas discussões sobre o bem-estar dos peixes e que o cortisol é o indicador mais utilizado (Ellis

et al., 2012). Contudo sendo uma área crescente de pesquisa, não significa que exista uma avaliação abrangente, cobrindo todas as espécies de peixes de aquacultura e todas as interações que possam por em causa do bem-estar (Ashley, 2007). Um dos principais temas deste assunto é que diferentes espécies têm necessidades biológicas e ambientais diferentes e apresentam respostas diferentes às condições em aquacultura (Arlinghaus *et al.*, 2007; Ashley, 2007; Barber, 2007; Ellis *et al.*, 2012; Segner *et al.*, 2012)

Saúde: Fundamental para o bem-estar

A saúde é uma medida fundamental do bem-estar (Ashley, 2007). Se existem problemas de saúde, este estado pode levar a mais complicações que interferem com um bom bem-estar, incluindo respostas agudas (adaptativas) a agentes de *stress*, a supressão do sistema imunitário, menor taxa de alimentação e por fim as interações sociais também podem ser afetadas (Ashley, 2007; Damsgard *et al.*, 2004)

O *stress* é, portanto, um fator importante para a saúde dos peixes (Ashley, 2007). Embora a saúde não esteja sempre relacionado com más condições ambientais, o objetivo da aquacultura é minimizar a exposição dos seus produtos a agentes patogénicos e parasitas e minimizar as fontes de dano físico, contudo existem muitas práticas em aquacultura que potenciam o *stress* e a lesão física, o que aumenta a suscetibilidade a patógenos. A prevenção é a forma ideal para evitar cenários de doença, e para isso ser alcançado é necessário ter uma boa gestão de protocolos e ter um sistema otimizado (Ashley, 2007; Conte, 2004).

Procedimentos que comprometem o bem-estar

Para a aquacultura é fundamental reduzir os efeitos de certos procedimentos que aumentam o *stress* nos peixes, apesar de alguns serem inevitáveis. Os efeitos de uma grande variedade de práticas de aquacultura sobre os peixes estão muito bem documentados (Andrade *et al.*, 2015; Conte, 2004; Crețu *et al.*, 2014; Iguchi *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2013; van de Nieuwegiessen *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2013; Wunderink *et al.*, 2011). Diferentes espécies apresentam uma grande variação nas respostas

fisiológicas ao *stress* associados a práticas de aquacultura, por exemplo, elevações dos níveis de cortisol no plasma podem diferir até duas ordens de magnitude em espécies diferentes e tendo o mesmo agente stressantes a atuar (Ashley, 2007; Barton, 2000, 2002; Congleton *et al.*, 2000; Conte, 2004).

Densidade

A aquacultura intensiva, por definição, é um tipo de produção que utiliza elevada densidade sendo que esta é apenas viável porque utilizam RAS o que lhes permite manipular alguns parâmetros da qualidade de água, tais como a temperatura, oxigénio, alimentação, amónia e nitritos. (Colson *et al.*, 2015; Kolarevic *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011).

Não existe legislação que determine a área mínima para as necessidades de cada animal o que poderia favorecer as condições de produção. No entanto a rentabilidade de uma aquacultura, em particular naquelas com regime intensivo, é estritamente ligado às boas condições de produção. Assim o produtor tem o maior interesse em saber as melhores condições de produção, sendo que isso é imperativo para uma maior rentabilidade e qualidade (Andrade *et al.*, 2015; Iguchi *et al.*, 2003; Richard and Flemming, 2007; Saillant *et al.*, 2003).

De acordo com a espécie e com o estágio de vida, deve haver sempre um plano de produção com base em estudos, a fim de, implementar as melhores densidades de produção. Na literatura é descrito que existem espécies que não são afetadas em densidade elevada como o contrário, e ainda de certas espécies que preferem baixas densidades, no entanto, de acordo com vários estudos, densidades demasiado elevadas ou demasiado baixas afetam negativamente o bem-estar e consequentemente a produção (Andrade *et al.*, 2015; Daniels *et al.*, 1996; Iguchi *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2015; Saillant *et al.*, 2003; Salas-Leiton *et al.*, 2011; Turnbull *et al.*, 2005). Comumente uma elevada densidade de produção está associada ao bem-estar prejudicial, no entanto, existem estudos que provam que, dependendo do estágio de vida, a densidade elevada de produção melhora o bem-estar animal, por exemplo, nos juvenis de peixe-gato africano, refletindo-se no aumento da taxa de crescimento e diminuição da agressão entre espécimes (van de Nieuwegiessen *et al.*, 2009). Outra espécie que aparentemente não é afetada pela densidade elevada é o linguado senegalês (Andrade *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2010, 2013; Wunderink *et al.*, 2011).

Na Tabela III, existem alguns exemplos de espécies e efeitos que diferentes níveis de densidade causam.

Tabela III - Exemplos de estudos com diferentes densidades e espécies.

Espécie	Densidade inicial	Parâmetro	Conclusão
<i>Solea senegalensis</i>	7, 17, 24 kg m ⁻²	Crescimento e parâmetros imunológicos	Densidade elevada não afetou a taxa de crescimento e os parâmetros imunológicos (Andrade <i>et al.</i> , 2015).
<i>Scortum barcoo</i>	120, 180, 270 peixe m ⁻³	Fisiológicos	A densidade de 180 peixes m ⁻³ apresentou os melhores resultados (Luo <i>et al.</i> , 2013).
<i>Plecoglossus altivelis</i>	100, 400, 1250 fish m ⁻³	Parâmetros Imunológicos	Densidades moderadas apresentaram resultados positivos para esta espécie (Iguchi <i>et al.</i> , 2003).
<i>Rhamdia quelen</i>	8, 16, 32 kg m ⁻³	Fisiológicos	As densidades moderadas e elevadas são mais adequadas para esta espécie (Menezes <i>et al.</i> , 2015).

Triagem

A triagem é uma operação que pode comprometer a produção e o bem-estar animal. No entanto, esta operação é fundamental na aquicultura intensiva, já que em densidades de produção elevadas, comumente encontradas nestes sistemas, há uma concorrência crescente por alimento entre os animais, existindo o risco de propagação de doenças, danos acidentais devido ao contato com outros indivíduos, o que pode levar a um aumento da agressividade e competição pelo espaço (Barron *et al.*, 2013; Daly *et al.*, 2012; González *et al.*, 2011; Overton *et al.*, 2010; Petrović *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2009; Saillant *et al.*, 2003; Slavík *et al.*, 2011). Todas estas problemáticas podem ser melhoradas tendo implementado um sistema de

auto controlo que controlem por exemplo, o tamanho dos espécimes nas jaulas, tanques e/ou lagoas.

Contudo, a triagem é benéfica para a produtividade uma vez que a dispersão de tamanhos é evitada contribuindo para um melhor controlo da alimentação e existe o total controlo sobre os tamanhos dos peixes em cada tanque. Este controlo é bastante útil também na monitorização da biomassa na produção, podendo assim recalculer o nível de carga do tanque (Barron *et al.*, 2013; Lekang, 2013; Petrović *et al.*, 2011; Saillant *et al.*, 2003). Como já referido acima, a triagem pode comprometer o bem-estar, uma vez que esta prática coloca os peixes em contacto com utensílios abrasivos, como por exemplo, camaroeiros e também os coloca por determinados períodos de tempo, fora de água. Isto pode causar danos físicos e juntamente com as questões de *stress*, pode criar um foco para a entrada de doenças e consequentemente diminuir a produtividade (Mustapha, 2014; Qu *et al.*, 2009; Slavík *et al.*, 2011). O facto de a triagem separar indivíduos por classes de tamanhos compromete as interações sociais entre peixes, como Slavik *et al.* (2011) comprovou. Este, utilizando peixe-gato europeu concluiu que os peixes-gato desviavam mais energia do crescimento para respostas ao *stress* por essas mesmas interações sociais se terem desfeito ao invés daqueles que não eram sujeitos a quebra da interação social. Barro *et al.* (2013) mostrou também que a triagem, aumenta em cerca de 15% a sobrevivência de larvas de *Lota Lota maculosa*. Por fim, Salas-Leiton *et al.* (2010) mostrou que indivíduos da espécie *Solea senegalensis* têm uma taxa de crescimento maior quando houve uma heterogeneidade nos tamanhos dos indivíduos. Isto explica-se devido a relações sociais e hierarquia presentes nesta espécie, isto é, a distribuição de tamanhos é causada pela hierarquia estabelecida.

Estes estudos comprovam a ambiguidade desta operação no processo de produção, uma vez que é essencial para aumentar a produtividade mas no entanto se não for bem executada pode comprometer o bem-estar e também a produtividade.

Alimentação

Um ponto que dita o sucesso e/ou o insucesso em todas as aquaculturas é a alimentação. Esta operação, não só exige o conhecimento de quais são os requisitos nutricionais da espécie em produção mas também é importante conhecer os processos fisiológicos da mesma (Bogolino *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; López-Olmeda *et al.*, 2012;

Marinho *et al.*, 2014; Mesquita, 2011; Trejchel *et al.*, 2014; Turnbull and Huntingford, 2012). Alimentação, geralmente, está fortemente relacionada com o bem-estar, uma vez que em condições de produção intensiva, um dos primeiros sinais de quando o bem-estar é comprometido é a falta de consumo de ração pelos animais ou o aumento da quantidade de resíduos. Assim, a alimentação, como as outras operações de produção, estão relacionadas e é importante saber como variam para as diferentes espécies de produção (Liu *et al.*, 2014; Mesquita, 2011; Mustapha, 2014; Turnbull and Huntingford, 2012).

O consumo de ração é regulado pelo hipotálamo, esta parte do cérebro é responsável por receber e interpretar estímulos internos e externos e, em seguida, transmitir a resposta adequada. Estas respostas são, nomeadamente, regulação da secreção hormonal e temperatura entre outros (Kulczykowska and Sánchez Vázquez, 2010). Portanto, o sistema endócrino é fortemente regulado e afetado por estímulos externos. De uma forma geral, todas as espécies, incluindo as de aquacultura, são controladas pelo seu ciclo circadiano. Assim, este ciclo controla um conjunto de comportamentos tais como ritmos de alimentação. Em praticamente todos os peixes este comportamento ocorre apenas de dia ou de noite, dependendo da espécie, classificando assim como espécies noturnas e/ou diurnas. No entanto, em muitas espécies, o ciclo circadiano é flexível e pode ser alterado em condições de produção, através de manipulação das condições ambientais (Ganzon-Naret, 2013; Kulczykowska and Sánchez Vázquez, 2010; Liu *et al.*, 2014; López-Olmeda *et al.*, 2012).

Em aquacultura, nomeadamente em sistemas intensivos, a ingestão de alimentos está condicionada por uma série de operações que ocorrem numa produção, uma delas é a habituação ao alimento inerte. Estas operações podem afetar o bem-estar e consequentemente a ingestão de alimento levando ao aumento da quantidade de resíduos o que pode potencialmente alterar a qualidade da água para níveis não aceitáveis para a biologia da espécie (Bonaldo *et al.*, 2015; Ganzon-Naret, 2013; Kulczykowska and Sánchez Vázquez, 2010; Liu *et al.*, 2014; López-Olmeda *et al.*, 2012; Marinho *et al.*, 2014; Mesquita, 2011; Nilsson and Torgersen, 2010; Summerfelt *et al.*, 2015; Turnbull and Huntingford, 2012). Na maioria das instalações de aquacultura, a distribuição do alimento é feita de forma manual uma vez que este, a curto prazo, é mais barato do que os sistemas automáticos, embora exija mais trabalho. O sistema manual de distribuição do alimento pode ser menos eficaz, uma vez que depende da regularidade das distribuições, da quantidade de alimento e do conhecimento por parte do operador (Mesquita, 2011).

Por todas as razões acima mencionadas, existem cada vez mais aquaculturas que estão a investir em sistemas automáticos. Existem pelo menos dois tipos de sistemas, aqueles que fornecem alimento quando o peixe vai acionar o mecanismo e aquele sistema que liberta o alimento quando o produtor assim o deseja, podendo ser cronometrado. Este sistema requer que a quantidade e o tipo de alimento sejam adequados para a fase de vida em causa, requer ainda, um plano de gestão excelente, uma vez que o alimento dado é dependente da biomassa presente em cada tanque. Se o plano de gestão não for adequado para a exploração, há o risco de disponibilizar alimento a mais, o que pode causar a diminuição da qualidade da água e um aumento da quantidade de partículas em suspensão na água, conduzindo a um risco para a saúde dos peixes. Apesar destas desvantagens dos alimentadores automáticos, estes requerem menos mão-de-obra, (Atoum *et al.*, 2015; Bostock *et al.*, 2010; Mesquita, 2011; Nilsson and Torgersen, 2010).

Transporte de animais vivos

Este tipo de operação é indispensável numa aquacultura, no entanto, esta é a prática que potencialmente induz mais *stress* nos organismos. Esta operação permite que os peixes possam ser transferidos entre estabelecimentos aquícolas (transporte externo) e dentro (transporte interno) de uma aquacultura. O transporte é visto como uma ameaça para o bem-estar durante e após a operação, e é provável que exista um aumento da mortalidade, lesões e deterioração da qualidade dos animais e da água (Barton and Peter, 1982; Dobsikova *et al.*, 2009; Iversen *et al.*, 2009; King, 2009; Lekang, 2013; Mustapha, 2014; Tacchi *et al.*, 2015). Hoje em dia nalguns países existem veículos específicos para estas operações que melhoram as condições de transporte e que cumprem certas regras para proteger o bem-estar animal, tais como: densidade por cuba de transporte, *design* dos equipamentos envolvidos e parâmetros da qualidade de água (FAO, 2014; Håstein, 2007; Ignacio Martín and Rasines, 2014; King, 2009; Lekang, 2013).

Os animais devem estar em jejum durante pelo menos 24 horas, antes do transporte de forma a reduzir o metabolismo evitando a deterioração da qualidade da água durante o transporte por aumento de resíduos metabólicos assim como diminuição do consumo de oxigénio (Dobsikova *et al.*, 2009; King, 2009; Lekang, 2013; Mustapha, 2014).

Para proceder ao transporte, os animais devem estar triados, esta operação, tal como descrito acima, induz *stress*, sendo como tal necessário que os animais recuperem antes do transporte (Lekang, 2013). Embora seja possível o transporte sem água (Ignacio Martín and Rasines, 2014), na maior parte dos casos, o transporte dos animais aquáticos, requer a utilização de água, assim a água utilizada é outro ponto crítico que deve ser tomado em conta para o bem-estar animal. Esta deve ter as propriedades físico-químicas semelhantes da água onde os peixes estavam, evitando choques térmicos, osmóticos entre outros. Contudo se alterarmos a temperatura para valores mais baixos, desde que a variação não seja muita brusca, pode beneficiar o bem-estar animal (Daniel *et al.*, 2014; Farrell *et al.*, 2010; Lekang, 2013; Tang *et al.*, 2009). As temperaturas mais baixas diminuem a taxa metabólica dos peixes, e conseqüentemente, diminui os resíduos metabólicos e de consumo de oxigénio. Para *Solea senegalensis* foram feitos estudos no âmbito da realização de transportes sem água, sendo este viável até 28 horas apenas com uma esponja que humedece a pele do animal (Ignacio Martín and Rasines, 2014).

Alguns transportes utilizam alguns aditivos na água, como por exemplo, sal para evitar problemas osmorregulatórios, cloreto de sódio que evita a formação de espuma em água doce (Lekang, 2013; Tacchi *et al.*, 2015). Existem outros compostos, nomeadamente os sedativos, que podem ser usados de forma a melhorar o bem-estar durante o transporte, como por exemplo o óleo de cravinho ou óleo de *Aloysia triphylla* (Daniel *et al.*, 2014; Iversen *et al.*, 2009). O fornecimento de ar/oxigénio durante o transporte deve ser garantido, a fim de garantir o bem-estar, neste caso, o ar pode ser fornecido por garrafas presas ao veículo, desde que o veículo esteja equipado para tal (FAO, 2014; Lekang, 2013).

Quando os transportes são de longo curso, para garantir a qualidade há que implementar rotinas para minimizar o *stress* nos peixes. Pode ser necessário realizar uma troca parcial da água do tanque de transporte sendo que a nova água tem de ser em tudo semelhante à antiga para evitar vários choques, ou fazer a reciclagem da água, sendo que isto só é possível se o camião que realiza o transporte tiver equipamentos para esse efeito.

A biomassa e a densidade por tanque de transporte são em função da espécie. Para maximizar a eficiência do transporte, a qualidade da água deve ser monitorizada durante o transporte, com a ajuda de uma sonda paramétrica. Normalmente a primeira paragem é realizada após 15 minutos e depois realizam-se a cada 2 horas. Isto acontece apenas quando o camião não possui um sistema de alarmes para parâmetros da água (Lekang, 2013).

Jejum

Os peixes muitas vezes são privados de alimento antes da realização de certos procedimentos numa aquacultura, com vista a reduzir o *stress* fisiológico durante esse mesmo procedimento. Antes de um transporte, triagem, tratamento para determinada doença e abate, os peixes são mantidos em jejum para esvaziar o trato intestinal, para reduzir o seu metabolismo, e a produção de resíduos (Ashley, 2007; Lopez-Olmeda *et al.*, 2012). A relação entre jejum e *stress* ou comportamento é desconhecida (Ashley, 2007) e a maioria os trabalhos nesta área diz respeito ao efeito do jejum prolongado sobre o crescimento, a proteína muscular e composição da gordura (Lemieux *et al.*, 2004; Pirhonen *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 2002). O impacto sobre o bem-estar em privar um peixe de se alimentar, quando ele foi previamente alimentado regularmente não é conhecido. Portanto, a privação alimentar em peixes de aquacultura por curtos períodos, em condições adequadas pode não causar problemas de bem-estar (Ashley, 2007).

Biologia da Espécie: *Solea senegalensis*

O linguado da espécie *Solea senegalensis* é da ordem dos Pleuronectiformes e é vulgarmente conhecido como peixe chato e não apresenta simetria bilateral, sendo assimétrico. Possui boca redonda em posição inferior e arqueada (Castelo Branco *et al.*, 2010). Alguns aspetos relativamente a este peixe é o fato de os adultos possuírem ambos os olhos na face direita do corpo, a face dorsal ou ocular. A fase ocular apresenta uma coloração cinzenta – acastanhada e a face cega é totalmente branca. A metamorfose ocorre durante a fase larvar. Esta metamorfose é caracterizada por grandes transformações anatómicas durante o desenvolvimento que envolve a rotação de 90 graus na posição do corpo e a migração de um olho para junto do outro olho. Estas transformações estão associadas á fixação das larvas no substrato e a mudança do habitat pelágico para bentónico, como consequência, há também a alteração da alimentação e fisiologia digestiva (Arjona *et al.*, 2010; Castelo Branco *et al.*, 2010).

Esta espécie em Portugal é comum nos estuários do Tejo, Sado e na costa algarvia (Castelo Branco *et al.*, 2010). Adapta-se facilmente a ambientes de salinidade elevada, como

acontece nos reservatórios das salinas durante a época estival e faz parte das espécies exploradas na aquacultura tradicional (Arjona *et al.*, 2010; Castelo Branco *et al.*, 2010)

O linguado, *Solea senegalensis*, distribui-se desde o Senegal – costa Atlântica de África – até ao Golfo da Biscaia (Arjona *et al.*, 2010). Os linguados adultos vivem em águas marinhas próximo da costa a 80 metros de profundidade e preferem substrato de areia ou vasa. É um peixe gonocórico, ovíparo, sendo os ovos fertilizados externamente (Castelo Branco *et al.*, 2010). O ciclo biológico do linguado começa com a desova dos reprodutores, quando estes atingem a maturidade sexual, que ocorre aos três anos de idade, tendo as fêmeas cerca de 32cm e 0.95kg de peso. As fêmeas apresentam uma fecundidade entre 1150000 a 1650000 ovos/kg/ano. Os períodos de reprodução são anuais e a desova escalonada. A época de postura estende-se por um período de 4 meses, Abril a Julho com um máximo de emissão de ovos em Maio. A reprodução ocorre no mar e a desova em águas costeiras. As larvas entram para os estuários e lagoas costeiras por processos de transporte, quer passivos quer ativos (Castelo Branco *et al.*, 2010). No meio natural, alimenta-se sobretudo de poliquetas (principalmente a espécie *Hediste diversicolor*), podendo ainda alimentar-se de anfípodes, copépodes ou isópodes (Dinis *et al.*, 1999).

A reprodução desta espécie em cativeiro tem sido tema de investigação em Espanha e Portugal, desde o início da década de oitenta. A desova natural em unidades de reprodução é atualmente uma rotina e a técnica da cultura larvar é relativamente simples comparada com as outras espécies de peixes marinhos produzidos em maternidade, registando sobrevivências elevadas, entre 60 – 80% sendo que em alguns casos chega a ser de 100% (Castelo Branco *et al.*, 2010).

Esta espécie pode ser facilmente produzida em regime extensivo, alimentando-se da produção natural do meio (Castelo Branco *et al.*, 2010), em tanques de terra ou em antigas salinas (Castelo Branco *et al.*, 2010) aguentando altos níveis de salinidade (Arjona *et al.*, 2010). Esta espécie pode ser produzida em regime de policultura conjuntamente com outras espécies como a dourada (*Sparus aurata*) (Dinis *et al.*, 1999)

Apesar da facilidade de produção em regime extensivo, em relação ao regime intensivo, a produção torna-se mais complicada, uma vez que é necessário capturar os reprodutores em meio natural. Estes têm de ser capturados fora da época da desova, nomeadamente entre julho e dezembro, uma vez durante o período de desova as fêmeas têm poucas probabilidades de sobrevivência ou podem, eventualmente, reabsorver as gónadas (Cabrita *et al.*, 2006; Dinis *et al.*, 1999; Imsland *et al.*, 2003)

À semelhança de outras espécies de água salgada, um dos constrangimentos à produção de linguado centra-se na fase larvar, especialmente aquando a metamorfose ou a passagem do alimento vivo para alimento inerte, que provoca grandes mortalidades (Blanco-Vives *et al.*, 2012; Canavate *et al.*, 2006). Contudo, a produção de linguado está, também, fortemente condicionada pela sua elevada sensibilidade a diferentes agentes de *stress* e a doenças infecciosas, que resultam em perdas económicas para a piscicultura. No que se refere às infeções, as principais que ocorrem no linguado são a pasteurelose, provocada pela *Photobacterium damsela* ssp *piscicida*, e a vibriose, provocada por várias espécies do género *Vibrio*, principalmente a *Listonella anguillarum* e a flexibacteriose, provocada por *Tenacibaculum maritimum* (Imsland *et al.*, 2003).

***III – Implementação de um plano de garantia de bem-estar na
Aquacria Piscícolas S.A.***

Atualmente, a maioria das aquaculturas monitorizam diariamente ou pelo menos de forma rotineira vários parâmetros de qualidade da água, comportamento do peixe, crescimento e estado de saúde (lesões na pele, parasitas etc.). Usando esta abordagem os sintomas de mau-estar são observados, contudo a origem ou causa dos problemas associados ao bem-estar podem não ser detetados.

Existem várias questões éticas na Europa que englobam o bem-estar animal, contudo estas questões são manifestadas nos esquemas de certificação que visam esquemas de produção sustentáveis (Kießling *et al.*, 2012; van de Vis *et al.*, 2012; Veissier *et al.*, 2008), sendo que o bem-estar animal está incluído como parte dos princípios fundamentais, juntamente com a saúde ambiental e humana, segurança e qualidade alimentar (FAO, 2014). Os sistemas de certificação que incluem o bem-estar foram criados por organizações não-governamentais (ONGs), retalhistas e pela indústria da aquacultura (Kießling *et al.*, 2012; van de Vis *et al.*, 2012; Veissier *et al.*, 2008). No Reino Unido a entidade certificadora, a *Freedom Food* é excepcional a este respeito, uma vez que incide unicamente sobre o bem-estar baseando-se nas Cinco Liberdades (van de Vis *et al.*, 2012).

Estas preocupações criaram pressão no mercado de produtos de aquacultura, assim, os produtos certificados com bem-estar estão a ser alvo de uma grande procura por parte dos consumidores. Este aumento verificado já tinha sido evidenciado anteriormente na produção terrestre, contudo com a grande procura de produtos vindos da aquacultura fez surgir também um aumento da preocupação sobre o bem-estar dos peixes. Neste sentido foi criado para peixes de aquacultura, um plano de garantia de bem-estar, FWAS – *Fish welfare assurance system* (van de Vis *et al.*, 2012).

A fim de criar um forte mas simples sistema de garantia de bem-estar (FWAS), este deve ser apoiado por uma base composta por programas de pré-requisito ou seja é preciso ter implementadas boas práticas de produção (GMP) e um plano que biossegurança (BCP), o que significa que a aquacultura possua uma boa higiene, boa manutenção e um controlo sobre todas as práticas que são realizadas nas instalações, uma vez que não é um sistema autónomo (Figura 13). Se estes pré-requisitos já estiverem implementados serão necessários apenas pequenos ajustes para alcançar o objetivo principal.

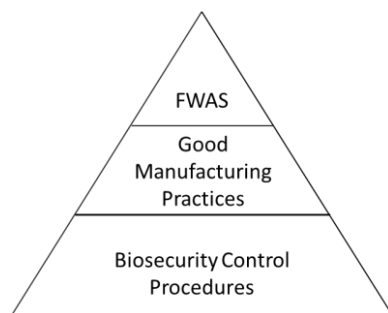


Figura 13 - O plano FWAS é implementado quando os pré-requisitos são cumpridos, adaptado de Van de Vis *et al.*, 2012

Nos mercados Europeus, há um aumento da preocupação com as condições de bem-estar dos peixes, esta pressão fez com que os piscicultores a fim de cumprir essa exigência tenham alterado certas rotinas. Para além disso, os piscicultores estão a investir cada vez mais na certificação de bem-estar, para se tornarem mais competitivos em mercados mais exigentes. Atualmente, a população está disposta a pagar mais por um produto que é certificado com garantia de bem-estar. O Reino Unido foi um dos primeiros países a implementar esta certificação e criar associações como a Sociedade Real para a Prevenção da Crueldade contra os Animais (RSPCA) na tentativa de criar medidas preventivas para garantir o bem-estar em aquacultura (Bovenkerk and Meijboom, 2013a).

É conhecido a partir da indústria alimentar e outras indústrias de fabrico que a garantia de qualidade (QA) é focada na identificação de perigos e estabelecimentos das fases críticas que necessitam de ser controladas de um determinado processo para evitar, eliminar ou minimizar um perigo para um nível aceitável (van de Vis *et al.*, 2012). Antes da introdução do conceito da garantia de qualidade (QA) foram utilizados sistemas de controlo de qualidade (CQ), contudo estes mostraram ser ineficazes na identificação de perigos com uma baixa incidência. Posto isto, o CQ foi substituído por um sistema de garantia de qualidade, conhecida como análise de perigos e pontos críticos de controlo (HACCP). O sistema HACCP é a abordagem internacionalmente aceite para o controlo da segurança alimentar (Comité do Códex sobre Higiene Alimentar, 2009; FAO, 2014).

O FWAS diverge do HACCP uma vez que o FWAS não só comprova a qualidade do produto como também otimiza a produção (Fernández-Segovia *et al.*, 2014; Psomas and Kafetzopoulos, 2015).

O objetivo deste trabalho é implementar na Aquacria Piscícolas S.A. um plano de garantia de bem-estar (FWAS) para potenciar o seu produto em mercados mais exigente,

isto apenas é conseguido devido a uma preocupação por parte da direção da empresa em se expandir para mercados onde empresas mais pequenas jamais conseguiriam competir.

Implementação do FWAS

Para iniciar a implementação de um sistema FWAS é necessário responder a cinco estágios preliminares que antecedem os sete princípios principais. Estas cinco etapas preliminares são consideradas relevantes para a implementação do FWAS.

1. Reunir uma equipa

Dependendo do tamanho da empresa esta equipa pode ser constituída por vários membros, normalmente nunca mais de seis membros, ou por apenas uma pessoa (Dillon *et al.*, 1996). A seleção da equipa pode ser feita não só tendo em conta a experiência de cada um, mas também no conhecimento sobre o controlo de qualidade, trabalhos de rotina, sobre o plano FWAS e na identificação dos riscos, sendo estes pontos essenciais para a escolha da equipa (Dillon *et al.*, 1996; FAO, 2014; Miget, 2004; United *et al.*, 2002; van de Vis *et al.*, 2012).

2. Descrição da espécie

No âmbito da garantia de qualidade, a descrição da espécie implica uma descrição sobre as necessidades do animal no que diz respeito à qualidade da água, regime alimentar e manejo, informações detalhadas sobre a tecnologia usada para efetuar o crescimento e ainda do processo da abate (van de Vis *et al.*, 2012).

3. Identificação do uso do produto

O uso pretendido do peixe é relevante isto é, é necessário que exista a identificação da população alvo e se há algum perigo associado ao produto.

4. Construção de um fluxograma

A construção de um fluxograma é de extrema importância uma vez que vai descrever todo o processo de produção e analisar todos os possíveis riscos ao longo da produção, permitindo assim uma visão clara do ciclo de produção. Existe um conjunto de normas para elaborar um diagrama de fluxo em que cada símbolo simboliza uma etapa diferente no ciclo de produção (Figura 14)(van de Vis *et al.*, 2012).

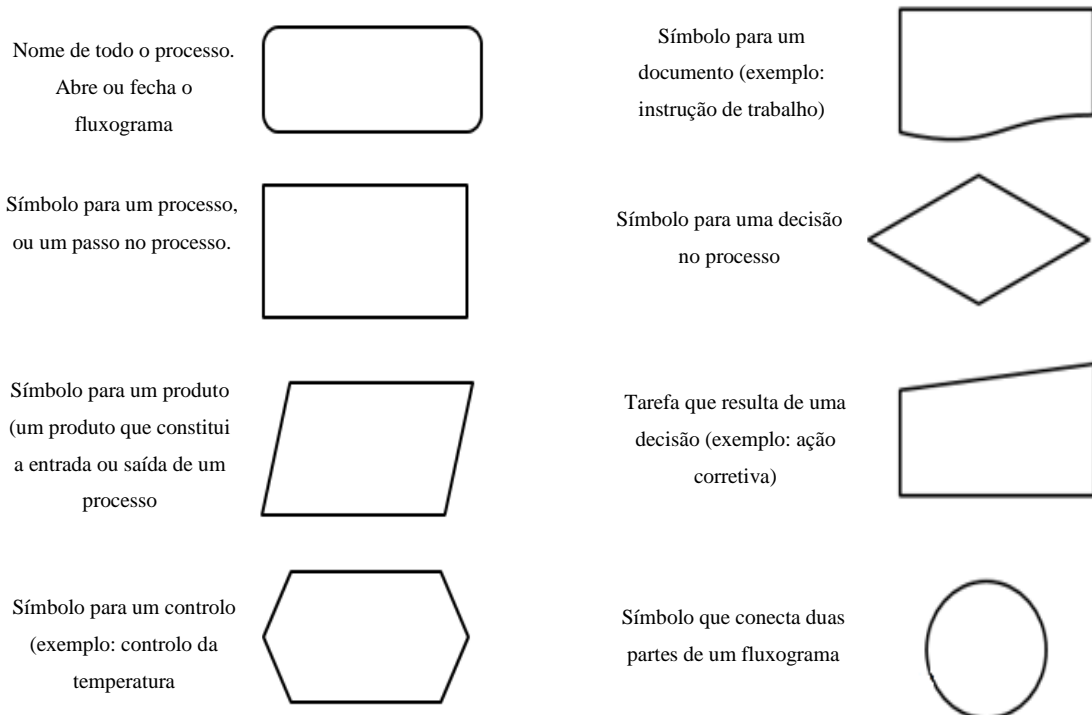


Figura 14 - Grupo de símbolos que podem ser usados na elaboração de um fluxograma, adaptado de van de Vis *et al.* (2012).

Na Figura 15 está descrito, parcialmente, um possível fluxograma da Aquacria Piscícolas S.A.

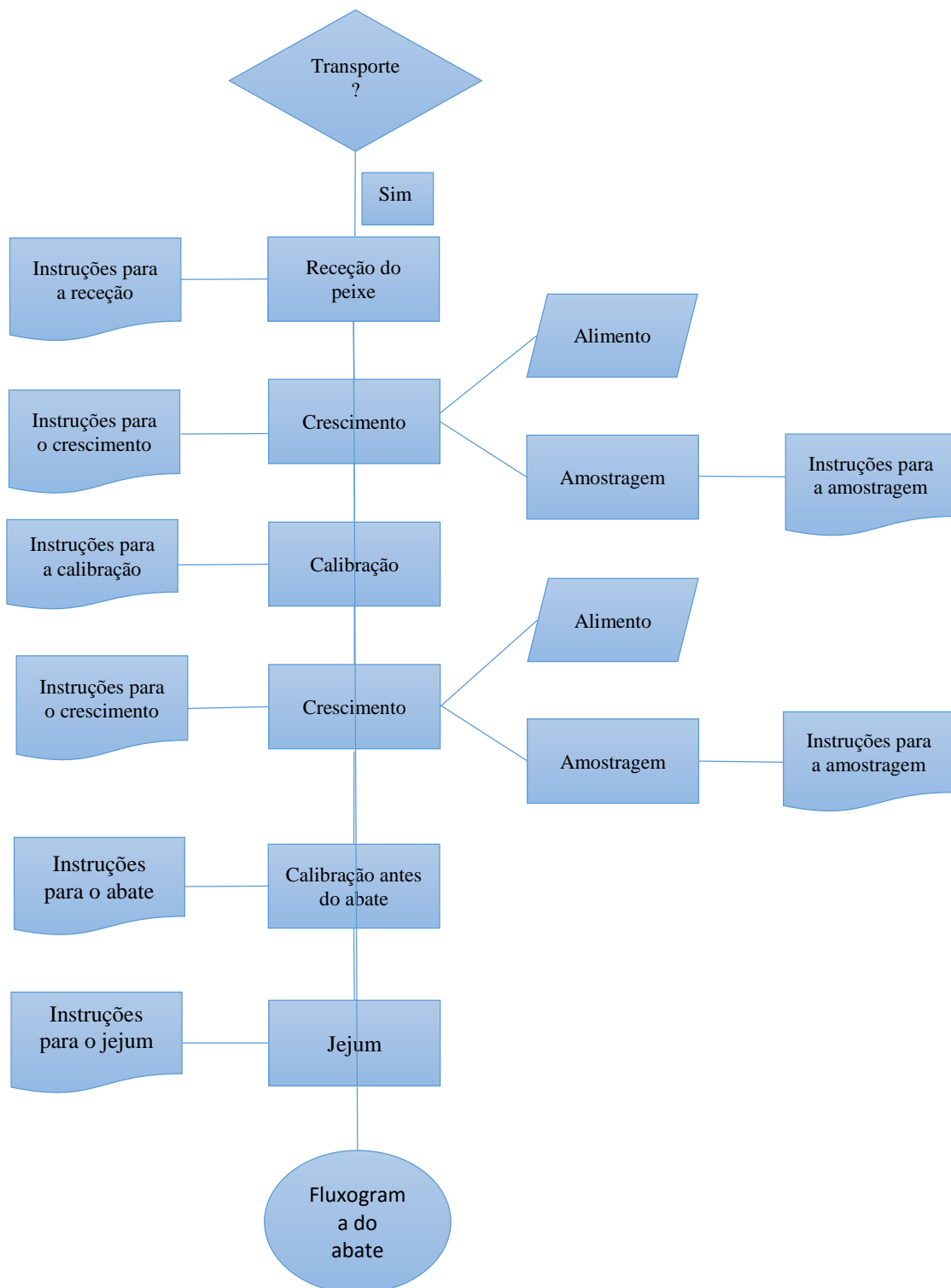


Figura 15 - Fluxograma da Aquacria Piscícolas S.A., adaptado de van de Vis et al. (2012).

5. Verificação do fluxograma no local

Uma vez que os fluxogramas foram produzidos precisam de ser verificados quanto à sua precisão. A fim de conseguir isto é necessário que cada membro da equipa analise e comprove a veracidade do fluxograma para tornar o plano mais preciso (van de Vis *et al.*, 2012).

Uma vez que as cinco etapas preliminares em que se baseia o FWAS estão completas, é feito de seguida a análise aos sete princípios fundamentais do FWAS. Os sete princípios são:

1. Condução de uma análise de perigos e avaliação de riscos

Num plano de FWAS o objetivo é melhorar o bem-estar animal na produção, no entanto, este objetivo interfere também na qualidade alimentar (van de Vis *et al.*, 2012).

Uma vez que o plano de FWAS deriva do plano HACCP existem muitas semelhanças entre ambos, como os princípios que os regem, e em ambos, todos os passos acima referidos tem de ser cumpridos.

O primeiro princípio é a análise de possíveis perigos para o bem-estar animal, estes perigos, em aquacultura, podem assumir várias origens e podem ser classificados em: abióticos, bióticos, operacional e ambientais (van de Vis *et al.*, 2012). Não obstante esta categorização é usado para facilitar a avaliação dos riscos, uma vez que estes fatores que comprometem o bem-estar animal muitas das vezes estão relacionados. Por exemplo, a concentração de oxigénio dissolvido na água depende se os peixes estão em repouso ou se estão a alimentar. Cada espécie tem diferentes requisitos e é essencial conhecer os parâmetros que vão atuar como limitantes para a produção e o bem-estar animal. Por exemplo, o intervalo de temperaturas é apropriado para determinada espécie mas para outra espécie é ótima. Gamas ótimas vão oferecer aos animais melhores condições de bem-estar o que é o principal objetivo deste plano, no entanto quantificar o bem-estar é um desafio devido à sua subjetividade (Bermejo-Poza *et al.*, 2015; Bovenkerk and Meijboom, 2013b; Grigorakis and Rigos, 2011; Huntingford and Kadri, 2014)

2. Determinação de pontos críticos de controlo (PCC)

Uma vez que todos os riscos de produção de uma aquacultura são identificados, estes tem de ser alvo de uma análise para ver os que são pontos críticos de controlo, ou seja, aqueles em que o controlo é essencial a fim de garantir o objetivo do plano, seja ele a segurança alimentar ou o bem-estar animal (Dillon *et al.*, 1996; van de Vis *et al.*, 2012). Para a identificação destes pontos críticos de controlo existe um esquema de decisão (Figura 16).

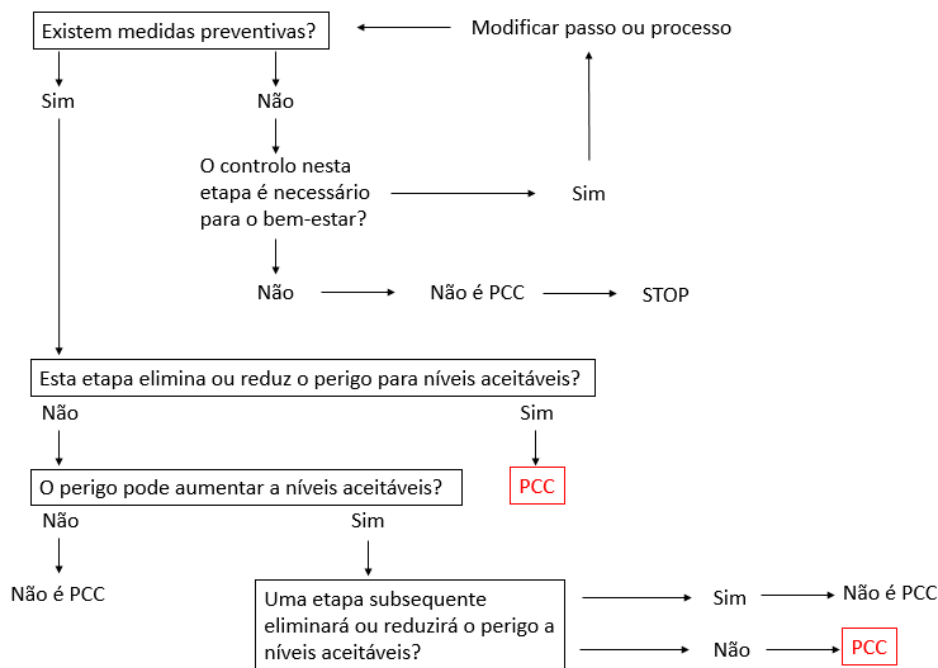


Figura 16 - Identificação dos pontos críticos de controlo (PCC), adaptado de Van de Vis *et al.* (2012).

3. Estabelecer níveis-alvo (TLS) e limites críticos (CLS) para cada PCC.

A próxima etapa é estabelecer níveis-alvo e limites críticos para cada PCC. Apesar de nalgumas produções este passo ser relativamente simples, num plano de FWAS, este passo pode ser um desafio, devido à subjetividade do conceito de bem-estar animal. No entanto este passo deve ser aplicado. Este estabelecimento de limites deve ser planeado de acordo com o tipo de estabelecimento. Por exemplo, numa aquacultura pode-se estabelecer um limite para a concentração de amónia nos tanques de produção, a fim de proteger o bem-

estar animal, sendo que estes limites são consoante a espécie, a fase de vida e o sistema de produção. Nesta fase é essencial recolher dados suficientes durante um espaço de tempo significativo para reconhecer qualquer padrão sobre a variação destes níveis, porque a existência do mesmo pode significar se existe um problema ou não, no processo de produção.

Como mencionado acima, para implementar um plano FWAS existem quatro categorias para agrupar os perigos. Dependendo da espécie produzida, estágio de vida e tipo de produção, estes riscos têm diferentes limites, no entanto, em função dos riscos, por vezes pode ser mais apropriado aplicar apenas um tipo de limite. Para os perigos operacionais a aplicação de níveis-avo é mais apropriado do que limites críticos, como explicado por van de Vis *et al.*, (2012). Um exemplo disso é a necessidade de remover o salmão do Atlântico da água quando é vacinado, nesse caso, o limite seria – remover o peixe quando for estritamente necessário. Para implementar estes limites é necessário ter uma visão sobre vários fatores e depois sim estabelecer limite, neste exemplo dado, se em vez de salmão do atlântico fosse outra espécie que consegue resistir a baixos níveis de oxigénio, aí sim seria possível determinar níveis-alvo (van de Vis *et al.*, 2012).

Um dos principais focos para determinar o bem-estar animal em aquacultura é feito pela avaliação dos parâmetros da água, uma vez que há uma série de relações entre esses parâmetros e patologias. Há níveis de tolerância para os parâmetros da água de acordo com cada espécie e é essencial para uma aquacultura conhecer e manter esses níveis para garantir o ciclo de produção e do bem-estar animal. Essa faixa de tolerância pode ser mais estreita ou larga, dependendo do grau de resistência da espécie, no entanto, todas as espécies possuem um intervalo de tolerância, a fim de manter a estabilidade aquando de alterações ambientais (McEwen and Wingfield, 2003; Schreck, 2010). Sob condições de produção o intervalo de tolerância deve ser estreito para evitar qualquer problema para a produção. Dessa forma são criados dois limites, (Figura 17) um limite com um intervalo de tolerância maior – Limite operacional, em que dá ao operador algum tempo para ajustar os níveis para os parâmetros normais – e um com um intervalo de tolerância menor – Limite Crítico – em que certos casos é igual ao limite operacional, assim, nestes casos não há espaço para erros (van de Vis *et al.*, 2012).

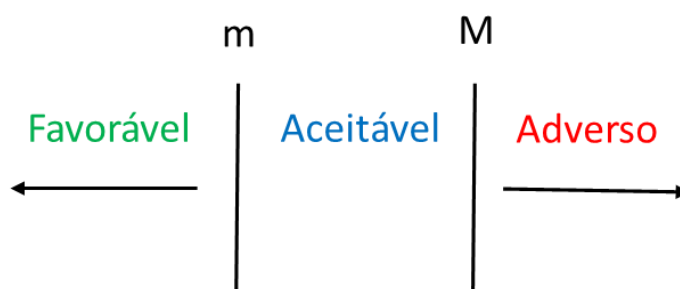


Figura 17 - Esquema para explicar o limite crítico (M) e o limite operacional (m), adaptado de van de Vis et al., (2012).

Para determinar os limites críticos e os limites operacionais, tendo em conta a ausência de informação disponível sobre o linguado senegalês para certos parâmetros, foi necessário realizar ensaios preliminares. Nestes, foram abordados aspetos como o abate e o efeito de tempo de exposição ao ar.

Abate

A questão-chave na avaliação do bem-estar no momento do abate é que se existe sofrimento, sendo que igualmente como o bem-estar este também é difícil de quantificar (Poli et al., 2005). O peixe é pescado e colocado nas tinas que contêm gelo e água, sendo que a relação entre gelo/água/kg peixe varia entre espécies. Este procedimento é fácil e rápido e é vulgarmente usado no Mediterrâneo e Reino Unido. A temperatura corporal, taxa metabólica e movimentos do peixe diminuem rapidamente, sendo que os peixes ficam num estado de dormência, dando-se a morte por asfixia uma vez que os níveis de oxigénio baixam drasticamente (Poli et al., 2005). Sendo o abate uma etapa de produção essencial onde o bem-estar pode ser comprometido, foi desenvolvido um ensaio experimental para cálculo da relação entre a quantidade de gelo, água e quantidade de peixe em kg.

Na empresa, o abate é realizado na madrugada de segunda-feira e eventualmente na quarta-feira. O abate dá-se início quando os peixes são pescados com o auxílio de um camaroeiro e colocados em caixas de transporte, sendo posteriormente pesados. Paralelamente a tina, onde ocorre o abate, é cheia de gelo e água sendo que as quantidades de cada elemento estavam estabelecidas por medidas pré-marcadas.

Um dos trabalhos desenvolvidos no âmbito deste estágio foi precisamente saber as medidas exatas de cada elemento. Para tal, calculou-se o volume total da tina ($V=600L$), antes e após a adição de gelo, fazendo a subtração de volume obteve-se a quantidade de gelo. Como a adição da água é feita com o recurso de uma mangueira, foi necessário determinar o volume, dessa forma, um recipiente com volume conhecido (80 litros) foi cheio e o tempo desta operação foi cronometrado. Por sua vez, a quantidade de peixe era calculada pela soma do peso das caixas que continham o peixe. Todos os dados obtidos estão descritos na tabela IV.

Tabela IV - Dados obtidos durante o abate

Dados Abate	19-Fev	16-Mar	23-Mar	30-Mar					01-Abr				MÉDIA
				Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4	Tina 5	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4	
Kg gelo	277	266	266	277	260	260	277	260	255	245	245	235	260
Kg peixe	322	128	130	338	326	329	363	322	321	330	392	280	324
Litros água	70	80	112	76	72	156	109	80	110	76	80	76	80

A temperatura interna do peixe também foi observada e registada, mas como em todos os casos a temperatura interna era inferior a $4^{\circ}C$, foi desprezada da Tabela IV. Outra preocupação neste método de abate é que a temperatura da tina vá aumentando, pois o peixe fica nesta mistura de água e gelo durante 1h/1:30h. Dessa forma a temperatura da tina foi medida no início e de meia em meia hora, sendo que os resultados obtidos também não foram significativos pois a temperatura permaneceu na primeira hora nos -1° sendo que passado 1:30h, no momento do embalamento, a temperatura estava nos $0,8^{\circ}$.

Exposição prolongada do peixe ao ar

Ao longo do processo de produção, os peixes estão obrigatoriamente sujeitos a procedimentos que implicam períodos fora de água (exposição ao ar). Neste parâmetro foram

avaliados duas vertentes, uma que relaciona a ração administrada com o desperdício verificado, e a segunda vertente, é tempo que o peixe não se alimenta depois de ser exposto ao ar.

O processo de triagem é aquele em que os peixes permanecem durante mais tempo expostos ao ar. O objetivo do trabalho experimental neste parâmetro foi cronometrar o tempo desde que a primeira caixa de peixe era pescada até o último peixe passar pela calibradora. Foi igualmente feito o registo dos tanques adjacentes ao trajeto efetuado pela pessoa que movimentava o carrinho com as caixas de peixe (Figura 18). Contudo, esta medição é influenciada por algumas variáveis, entre as quais: eficácia da equipa, distância do tanque onde o peixe está a ser pescado, a densidade do tanque (eficiência da pesca) e diferentes calibres do peixe.

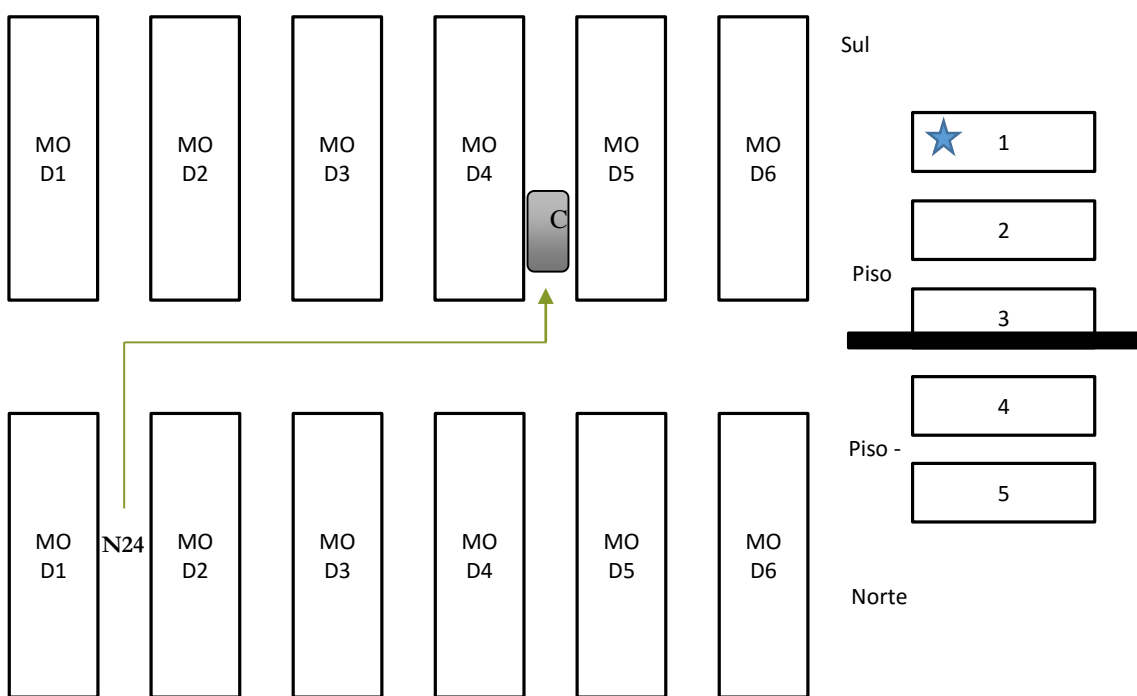


Figura 18 - Trajetos realizados na triagem no dia 5 de Maio.

Na tabela V estão registados os tempos que uma caixa de peixe demora a ser calibrada.

Tabela V - Média de tempos de exposição ao ar

8m08s	6m53s	7m01s	7m10s	8m15s
11m16s	7m22s	7m06s	8m57s	7m30s
Média: 8.02 min				

Depois destas observações foi feita a comparação com os registos de desperdício de ração (RD). Estes são realizados pelos trabalhadores, tendo sido adotada a seguinte chave: 0 – não existe desperdício, I – existe pouco desperdício, II e III – em que a quantidade de desperdício vai aumentando. Existem diversas razões para existir um aumento de desperdício de ração, entre os quais *stress* e a necessidade de ajustar a quantidade de ração diária, sendo que essa análise está demonstrada na tabela VI.

Tabela VI - Relação entre o desperdício e o aumento de ração disponibilizada vs stress.

	3 Maio		4 Maio		5 Maio		6 Maio		7 Maio	
	RD	Activity	RD	Activity	RD	Activity	RD	Activity	RD	Activity
N25	0	110%	3	100%	A-0 B-0	A-105% B-60%	A-0 B-0	A-110% B-85%	A-0 B-0	A-115% B-90%
N24	A-0	90%	A-0	95%	-	0%	0	95%	0	100%
N23	2	75%	0	80%	0	85%	0	90%	0	95%
N22	0	100%	0	105%	0	110%	0	115%	0	120%
N15	0	100%	0	115%	1	115%	0	120%	2	115%
N14	A-0 B-0 C-2	A-100 % B-100 % C-90 %	A-1 B-0 C-0	A-100% B-105% C-95%	A-1 B-1 C-2	A-100% B-105% C-90%	A-2 B-3 C-3	A-95% B-95% C-80%	A-2 B-1 C-0	A-95% B-95% C-95%
N13	A-0 B-1 C-0	A-95% B-100% C-105%	A-0 B-0 C-0	A-100% B-105% C-110%	A-2 B-1 C-2	A-95% B-105% C-105%	A-1 B-0 C-0	A-95% B-110% C-110%	A-1 B-1 C-0	A-95% B-110% C-115%
S43	0	80%	A-3 B-cal	A-70% B-60%	1	70%	0	75%	2	70%
S42	0	75%	1	75%	2	70%	0	75%	2	70%
S53	A-0 B-0	A-105% B-100%	A-0 B-cal	A-110% B-100%	A-1 B-	A-110% B-100%	A-0 B-alim	115%	0	120%
S52	1	65%	0	70%	0	75%	0	80%	0	85%

O parâmetro RD é o desperdício de ração e o parâmetro *activity* é a percentagem de ração disponibilizada. Como se pode analisar, o único tanque onde se visualizou um aumento de ração desperdiçada foi o tanque N14, tanque adjacente ao tanque calibrado (tanque N24). Pode-se concluir que existe um aumento de RD no dia seguinte ao evento de calibragem

(este ocorreu dia 5 de Maio) sendo que este aumento pode ser devido ao *stress*, uma vez que o fator *activity* não aumenta, ou seja não houve aumento da ração disponibilizada.

Desta forma, foi feito um seguimento de vários eventos e chegou-se à conclusão que existe uma relação entre o aumento de desperdício de ração com o *stress*, como se pode ver na tabela VII.

Tabela VII - Percentagem de tanques adjacentes afetados.

	Tanque origem	Nº tanques adjacentes	Nº de tanques afetados	% tanques afetados
Trajeto 1	S52	5	1	20%
Trajeto 2	N62	7	4	57%
Trajeto 3	N35	11	2	18%
Trajeto 4	S45A	10	0	0%
Trajeto 5	N24	11	1	9%
Trajeto 6	N41	9	4	44%

Feita esta análise surgiu outra questão, que era saber por quanto tempo os peixes ficavam afetados devido à exposição ao ar. Foi efetuado um ensaio em escala laboratorial para tentar perceber se existia alguma relação. Para tal, foram estabelecidos três períodos de exposição ao ar – 2, 5 e 8 minutos e três gamas de peso 80, 150 e 250 gramas.

Os resultados obtidos foram bastantes positivos na diferenciação de gamas de pesos. Os peixes mais pequenos apresentaram os piores resultados sendo que ao fim de 3 dias ainda não estavam restabelecidos, enquanto os peixes de maior peso, ao final dos três dias já se alimentavam normalmente (Tabela VIII).

Tabela VIII - Relação entre diferentes tempos de exposição ao ar e desperdício de ração.

<u>Peixes com 80 gramas</u>	RD	RD	RD
	27 Maio	28 Maio	29 Maio
Tanque 1 (2min)	3	2	1
Tanque 2 (5min)	3	2	2
Tanque 3 (8min)	3	3	3
<u>Peixes com 150 gramas</u>	1 Junho	2 Junho	3 Junho
Tanque 1 (2min)	2	1	0/1
Tanque 2 (5min)	2	1	0/1
Tanque 3 (8min)	2	2	1
<u>Peixes com 250 gramas</u>	1 Junho	2 Junho	3 Junho
Tanque 1 (2min)	1	1	0/1
Tanque 2 (5min)	1	1	0/1
Tanque 3 (8min)	2	1	0/1

Para todos os outros pontos críticos de controlo foram feitas folhas de autocontrolo (Ver em anexo).

4. Estabelecer procedimentos de monitorização

A fim de avaliar o plano FWAS implementado é necessário criar sistemas de monitorização. Isto permite a gestão e a identificação de quaisquer complicações no ciclo de

produção e reconhecer algum tipo de padrão a qualquer momento, avaliando os limites críticos estabelecidos previamente, e consequente identificação da causa (van de Vis *et al.*, 2012). Para avaliar o bem-estar animal, existem diversos indicadores que podem ser aplicados num ciclo de produção, como por exemplo os indicadores de bem-estar operacionais (OWI), sendo que o registo da mortalidade é um exemplo de um indicador (Huntingford and Kadri, 2014). Esses indicadores devem ser práticos para não complicar os trabalhos dos operadores a um ponto de ser contraproducente. No plano FWAS, é exigido que existam indicadores que permitam a deteção de qualquer coisa (exemplo – observação de lesões) que comprometa o bem-estar animal (Tabela IX).

Tabela IX - Sistema de monitorização numa instalação aquícola, adaptado de van de Vis *et al.*, (2012).

Passo no Processo	Perigo	Monitorização			
		O quê	Como	Frequência	Quem
Crescimento	Bióticos				
	Doenças	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção
	Abióticos				
	Qualidade de alimento inadequada	Avaliar a qualidade do alimento	Verificar a resposta do peixe ao alimento; avaliar o crescimento	Diariamente	Diretor de Produção
	Peixe exposto a água com má qualidade	Monitorar a qualidade da água conforme especificado	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção
	Operacionais				
	Regime alimentar inadequado	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção
	Distúrbios	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção
	Ambientais				
Entrada de água com má qualidade	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	

5. Estabelecer medidas corretivas

A fim de controlar os PCC's é necessário implementar ações corretivas (Tabela X). Estas permitem recuperar o controlo sempre que os PCC's estão além do limite crítico e/ou operacional. Para aplicar estas ações, é necessário entender a causa do problema, determinar o que fazer e registrar a ação corretiva tomada. Nos planos FWAS planear as ações corretivas é muito importante e decisivo para os operadores quando as implementam (Tabela X) (Dillon *et al.*, 1996, van de Vis *et al.*, 2012).

Tabela X - Ações corretivas que podem ser aplicadas numa aquacultura, adaptado de van de Vis et al., (2012).

Passo no Processo	Perigo	Monitorização				Ações Corretivas
		O quê	Como	Frequência	Quem	
Crescimento	Bióticos					
	Doenças	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores
	Abióticos					
	Qualidade de alimento inadequada	Avaliar a qualidade do alimento	Verificar a resposta do peixe ao alimento; avaliar o crescimento	Diariamente	Diretor de Produção	Mudar de Fornecedor
	Peixe exposto a água com má qualidade	Monitorar a qualidade da água conforme especificado	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores
	Operacionais					
	Regime alimentar inadequado	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores
	Distúrbios	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores/ Plano para as visitas
	Ambientais					
Entrada de água com má qualidade	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	

6. Estabelecer procedimentos de verificação

Como mencionado acima, os procedimentos de verificação são processos que asseguram que os produtos se encontram dentro dos limites críticos. No caso do bem-estar animal estes procedimentos podem ser mais difíceis de determinar porque o bem-estar animal é subjetivo. No entanto, há um número de formas de analisar o bem-estar na produção, como por exemplo, análise patológica, comportamentos alimentares, etc. (Tabela XI). A frequência destes procedimentos deve ser regular e inesperada, para recolher a maior diversidade possível, tornando assim a amostragem o mais realista possível (Dillon *et al.*, 1996, van de Vis *et al.*, 2012).

Tabela XI - Procedimentos de verificação numa aquacultura, adaptado de van de Vis et al., (2012).

Passo no Processo	Perigo	Monitorização				Ações Corretivas	Verificação
		O quê	Como	Frequência	Quem		
Crescimento	Bióticos						
	Doenças	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Amostragem periódica para monitorizar o estado de saúde
	Abióticos						
	Qualidade de alimento inadequada	Avaliar a qualidade do alimento	Verificar a resposta do peixe ao alimento; avaliar o crescimento	Diariamente	Diretor de Produção	Mudar de Fornecedor	Verificar a qualidade do alimento e o crescimento do peixe
	Peixe exposto a água com má qualidade	Monitorar a qualidade da água conforme especificado	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Amostragem periódica para monitorizar a qualidade da água
	Operacionais						
	Regime alimentar inadequado	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Uso de instruções
	Distúrbios	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores/ Plano para as visitas	Analisar o distúrbio quando operadores/ visitantes se aproximam
	Ambientais						
Entrada de água com má qualidade	Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Amostragem periódica para monitorizar a qualidade da nova água	

7. Estabelecer um sistema de registo

Um sistema de registos é essencial para garantir que o plano FWAS está a funcionar corretamente, outra vantagem deste sistema é a criação de um plano FWAS dinâmico, uma vez que ao longo do tempo a remoção ou adição de PCC é possível. De acordo com van de Vis et al., (2012), há uma lista de pontos que ajudam a compreender se o sistema de registo é eficaz ou não, estes são: (1) a responsabilidade da pessoa que efetua os registos; (2) Se as normas são cumpridas; (3) Pré-requisitos se estão controlados e monitorizados; (4) Documentação dos procedimentos; (5) Os registos dos procedimentos sanitários para controlar os PCC; (6) As ações corretivas documentadas; (7) Documento que determina, quando, por quem e como o plano FWAS é revisto.

Na tabela XII está descrito a constituição de um plano FWAS.

Tabela XII - Constituição de um plano FWAS, adaptado de van de Vis et al., (2012).

Passo no Processo	Perigo	Fonte	Medidas preventivas	PCC	Critério		Monitorização				Ações Corretivas	Verificação	Registo
					m	M	O quê	Como	Frequência	Quem			
Crescimento	Bióticos												
	Doenças	Meio ambiente e má gestão nas condições de produção	Monitorizar a saúde dos peixes; verificar se os mecanismos de limpeza estão a funcionar bem	Uso do plano de biossegurança	m=M; Verificar se o plano de biossegurança é seguido		Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Amostragem periódica para monitorizar o estado de saúde	Manter registos de instruções, análises e ações corretivas
	Abióticos												
	Qualidade de alimento inadequada	Qualidade da ração fornecida	Seleção de fornecedor com base em padrões de qualidade	Aquisição de dietas testadas	m = M; apenas usar rações testadas		Avaliar a qualidade do alimento	Verificar a resposta do peixe ao alimento; avaliar o crescimento	Diariamente	Diretor de Produção	Mudar de Fornecedor	Verificar a qualidade do alimento e o crescimento do peixe	Manter registos de instruções, análises e ações corretivas
	Peixe exposto a água com má qualidade	Má gestão das condições de produção	Formar os trabalhadores	As instruções para a operação do crescimento são seguidos	O ₂ < 60%; amónia 0,75mg/l; nitrito 1,5 mg/l; T 18°C	O ₂ >160% ; amónia 1mg/l; nitrito 1,8 mg/l; T 22°C	Monitorar a qualidade da água conforme especificado	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Amostragem periódica para monitorizar a qualidade da água	Manter registos de instruções, análises e ações corretivas
	Operacionais												
	Regime alimentar inadequado	Má gestão do regime alimentar	Formar os trabalhadores	Uso das instruções da alimentação	m=M; Certificar que as instruções são seguidas		Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Uso de instruções	Manter registos de instruções e avaliações
	Distúrbios	Causado por visitantes e / ou trabalhadores;	Gestão do som, instruir trabalhadores e visitantes	Uso de instruções	m=M; Certificar que as instruções são seguidas		Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores/ Plano para as visitas	Analisar o distúrbio quando operadores / visitantes se aproximam	Manter registos de instruções e avaliações
	Ambientais												
Entrada de água com má qualidade	Má gestão do tratamento de água nova	Formar os trabalhadores	Uso de instruções	m=M; Evitar a entrada de água nova com má qualidade		Avaliar que as instruções são seguidas	Inspeccionar o trabalho	Diariamente	Diretor de Produção	Formar os trabalhadores	Amostragem periódica para monitorizar a qualidade da nova água	Manter registos de análise, instruções e ações corretivas	

IV - Avaliação do impacto em Solea senegalensis expostos a luz de diferentes comprimentos de onda: crescimento, indicadores de stress e na pigmentação

Introdução

Na natureza, as características do espectro da luz são determinadas por uma combinação entre a claridade do ambiente e as propriedades óticas da água. A luz com o aumento da profundidade torna-se monocromática porque o perfil espectral é seletivamente atenuado enquanto a luz passa pela água (Blanco-Vives *et al.*, 2012). Dessa forma, águas oceânicas transmitem em comprimentos de onda azul (470nm), enquanto as águas costeiras transmitem melhor em comprimentos de onda azul-verde (500nm) e por fim as águas estuarinas transmitem em comprimentos de onda verde (580nm) (Cohen & Forward, 2002).

Nos peixes, os sistemas extrarretinais e os sistemas fotosensores são bastante complexos e longe de ser totalmente compreendido, tal como a resposta à luz, que varia entre espécies, dependendo de fatores filogenéticos e ecológicos (Marchesan *et al.*, 2005). Está provado que é uma tarefa difícil encontrar as melhores condições de luz para cada espécie de peixe (Villamizar *et al.*, 2011). Dependendo da ecologia das espécies, comprimentos de onda específicos podem maximizar a sensibilidade visual quer para peixes de água profundas como para peixes que vivem em ambientes foto-complexos, como em águas rasas ou costeiras (Villamizar *et al.*, 2011). No linguado senegalês a melatonina plasmática é significativamente reduzida quando exposto a comprimentos de onda curtos (violeta) durante a noite (Oliveira *et al.*, 2007).

Alterações na Pigmentação

A cor é definida como os comprimentos de onda de luz no espectro visual (de 380 até 770 nm) que são detetados pela retina humana. Todas as cores detetadas pelo olho humano estão associadas com a radiação da luz; a cor azul-violeta corresponde a valores de absorvância entre 380 e 480nm; verde corresponde a 480-560nm; a amarela, a 560-590 nm; laranja, a 590-630nm e vermelho, a 630-750nm (Sant'Anna *et al.*, 2013). Portanto, espectrofotômetros e colorímetros têm sido instrumentos úteis para a medição da cor em diferentes produtos. Nestes instrumentos, os dados gerados são numericamente categorizados de acordo com a absorvância, a distribuição de energia espectral relativa, a geometria do objeto, entre outros fatores (Sant'Anna *et al.*, 2013).

Entre os diferentes espaços de cores existentes (por exemplo, CIEXYZ, CIEUVW e CIELUV), o CIELAB é atualmente o recomendado para ser utilizado para a maioria das aplicações industriais, porque abrange uniformemente o espectro visível total do olho humano. Os parâmetros relacionados com o CIELAB encontram-se resumidos na esfera CIELAB na Figura 19. No espaço CIELAB, são definidos por um índice psicométrico de luminosidade (L) e duas coordenadas de cor (a e b). O índice de L está relacionado com a luminosidade, de acordo com esta propriedade, cada cor pode ser considerado como equivalente a um membro da escala de cinza, ou seja, entre o preto ($L = 0$) e branco ($L = 100$). A coordenada a tem valores negativos para as cores esverdeadas e valores positivos para cores avermelhadas. A coordenada b tem valores positivos para cores amareladas e valores negativos para cores azuladas.

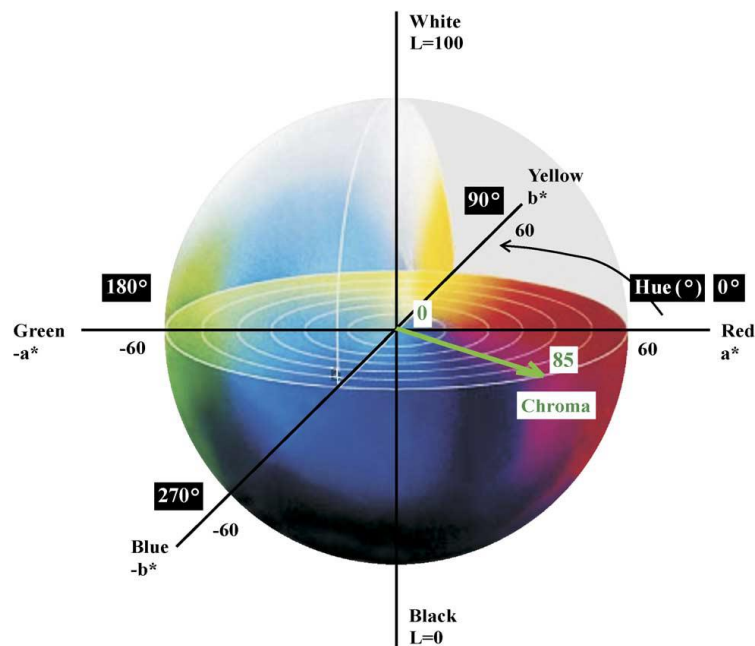


Figura 19- A esfera CIELAB (Fonte: Van der Salm, 2004)

Os atributos quantitativos e qualitativos da cor (*chroma* e *hue*, respetivamente) são calculados através das coordenadas a e b . O *chroma* fornece informações sobre a nitidez da cor, ao passo que o *hue* é o atributo de acordo com as cores que têm sido tradicionalmente definidos como vermelho, laranja, amarelo, etc (Figura 19). O *chroma* o *hue* são considerados os principais atributos da cromaticidade. O *hue* é o valor em grau que corresponde ao esquema da cor tridimensional (0° para vermelho, 90° para amarelo, 180° para verde e 270° para o azul) (Sant'Anna *et al.*, 2013).

Considerando que para algumas espécies de peixe, como por exemplo os salmonídeos, a cor do filete constitui um importante parâmetro de qualidade, por outro lado é a pigmentação da pele que melhora muito a aparência do peixe, sendo associado por parte do consumidor, a um parâmetro de diferenciação e de frescura (Kalinowski *et al.*, 2007). A coloração da pele em teleósteos está sobre influência de vários parâmetros e de uma serie de fatores externos e internos (físicos, nutricionais, genéticos, neuro-hormonal) sendo que estes são fatores que influenciam o estado cromático da pele do peixe (Szisch *et al.*, 2002). Os peixes apresentam uma variedade de padrões de coloração da pele que são de grande importância ecológica, fisiológica e comportamental.

De acordo com Pavlidis *et al* (2006), existem oito padrões gerais de cores que podem ser observados em peixes: (1) a coloração; (2) *poster colours*; (3) *disruptive coloration*; (4) *countershading*; (5) ornamentação ocular; (6) manchas oculares; (7) faixas laterais; (8) policromia. As propriedades cromáticas sofisticadas observadas nesta classe de vertebrados fornecem proteção contra predadores, impor a sua dominância na população e ajuda na comunicação (Pavlidis *et al.*, 2006). Além disso, o peixe pode alterar a sua coloração em resposta às condições ambientais, desafios fisiológicos e estímulos de *stress* (Szisch *et al.*, 2002; Van der Salm *et al.*, 2004), daí o padrão da pigmentação da pele do peixe pode ser considerado como um índice de proteção animal em espécies de aquicultura e um fator de consideração económica (Szisch *et al.*, 2002; Van der Salm *et al.*, 2004).

O sistema nervoso simpático e/ou o sistema endócrino são os controladores da motilidade dos cromatóforos, ou seja, controlam as mudanças de cor devido à ativação intracelular do pigmento, esta mudança ajuda na adaptação cromática dos peixes quando estes estão sujeitos a mudanças circadianas, a adaptabilidade às mudanças do fundo, comunicação interespecífica e *stress* agudo. As mudanças morfológicas da cor, como a alteração do número ou densidade dos cromatóforos e/ou a quantidade de material pigmentado na pele, procedem de forma relativamente lenta levando a mudanças morfogenéticas (Szisch *et al.*, 2002).

A hormona estimulante dos melanócitos (MSH) tem um papel chave na dispersão dos pigmentos de melanina nos melanóforos na pele de muitos vertebrados exotérmicos, ou seja tem um papel importante na mudança de cor (Szisch *et al.*, 2002). As principais hormonas que controlam a mudança na pigmentação são a hormona estimulante α -melanócito (α MSH) e a hormona concentradora de melanina (MCH). Ambas são pleiotrópicas e não apenas regulam a pigmentação mas também tem um papel regulador

na resposta ao *stress* (Van der Salm *et al.*, 2004), e também atuam sobre a atividade das células interrenais que produzem cortisol (Szisich *et al.*, 2002). Durante uma resposta ao *stress*, o eixo hipotálamo-hipófise-células interrenais é ativado. Para além da produção da hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a glândula pituitária liberta α MSH que vai induzir a libertação de cortisol do tecido interrenal (Van der Salm *et al.*, 2004). O cortisol é libertado na corrente sanguínea e vai ligar-se aos recetores adrenérgicos dos cromatóforos. Se os cromatóforos possuem α -adrenorecetores, vai haver uma mudança na tonalidade tornando-os mais claros, enquanto que, se os adrenorecetores forem do tipo β , a mudança vai ser no sentido de os tornar mais escuro. Portanto a MSH pode ser um elo essencial entre o *stress* e a pigmentação (Szisich *et al.*, 2002).

Stress: Indicador de bem-estar

Existe uma extensa literatura sobre a biologia, sobre as condições fisiológicas e respostas comportamentais de peixes para uma ampla variedade de características físicas, químicas, biológicas e fatores de *stress* (Ashley, 2007; Barton, 2000, 2002; Conte, 2004). Este interesse considerável no *stress* dos peixes reflete o ganho de consciência que os seus impactos na produção podem ser questões-chave para o sucesso ou insucesso de uma aquacultura, de igual importância como a suscetibilidade à doença, o crescimento, a eficiência de conversão alimentar, qualidade da carne e a reprodução (Ellis *et al.*, 2012). *Stress* é frequentemente discutido com diferentes definições (Ashley, 2007; Ellis *et al.*, 2012), mas muitas vezes se assemelha a “*uma alteração da homeostasia, que é reestabelecida por um complexo repertório de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais por parte do organismo*” (Ashley, 2007; Chrousos, 1998; Conte, 2004). A resposta ao *stress* pode ser observado em diferentes níveis (Ellis *et al.*, 2012):

1. *A resposta neuroendócrina* – Um estímulo recebido por um organismo vai levar a uma libertação de hormonas (catecolaminas) e a ativação do complexo hipotálamo-hipófise-células interrenais (HPA). A libertação de corticotropina a partir do hipotálamo age sobre a glândula pituitária para sintetizar e libertar a hormona corticotrópica que por sua vez vai estimular a síntese de hormonas glucocorticoides (cortisol em teleósteos) a partir das células interrenais (Ashley, 2007; Ellis *et al.*, 2012).

2. *A alteração fisiológica* – São alterações a nível de comportamento ou mesmo alterações internas (aumento da concentração de glicose no sangue) que vão permitir ao animal responder ao estímulo. Se estas alterações foram mantidas ao longo de um período de tempo vai desencadear a terceira alteração (Ellis *et al.*, 2012; Schreck *et al.*, 2001).
3. *Alterações internas e gerais* – Estas acontecem quando o animal é mantido em condições de *stress* durante muito tempo. Uma vez que a ativação do complexo hipotálamo-hipófise- células interrenais mobiliza energia, levando a um esgotamento das reservas de glicogénio a um aumento das concentrações plasmáticas de glicose, juntamente com a atividade muscular elevada, vai ativar a glicólise anaeróbica que por sua vez vai aumentar as concentrações de ácido láctico no plasma (Ashley, 2007; Schreck *et al.*, 2001). Isto vai influenciar as taxas de crescimento e no investimento reprodutivo podendo ganhar uma maior suscetibilidade a doenças e mortalidade (Ellis *et al.*, 2012).

Os níveis de glicose e de ácido láctico são utilizados frequentemente em paralelo com o cortisol para avaliar os níveis de *stress* (Acerete *et al.*, 2004; Ashley, 2007). A expressão de genes relacionados com o *stress* pode proporcionar biomarcadores úteis e sensíveis para diagnosticar o *stress* e melhorar o bem-estar futuro (Gornati *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2001; Ribas *et al.*, 2004). O *stress* crónico exerce um forte efeito sobre o metabolismo, função neuroendócrina e osmorregulação (DiBattista *et al.*, 2005). Portanto, evitar a prolongada e repetida exposição ao *stress* por parte dos peixes é claramente um objetivo central do bem-estar animal. Para tal, a avaliação dos métodos possíveis para reduzir as respostas ao *stress* é uma área ativa de pesquisa (Ashley, 2007). Em salmão, estes são criados seletivamente para minimizar a sua capacidade de resposta ao *stress* (Ashley, 2007; Pottinger, 2010). Embora o processo de domesticação esteja num estágio inicial, na produção de salmão, estes sofrem menos comparativamente a salmões selvagens (Huntingford, 2004; Overli *et al.*, 2005). A produção de cortisol em resposta ao *stress* varia entre indivíduos sendo que esta característica apresenta uma moderada a elevada hereditariedade (Fevolden *et al.*, 1999; Overli *et al.*, 2005; Pottinger *et al.*, 1994; Pottinger and Pickering, 1992; Pottinger *et al.*, 1992).

Imunologia

Imunologia tem sido estudada há mais de 200 anos, a partir da descoberta da varíola bovina em 1796 (Zhu *et al.*, 2013). A maioria do que sabemos hoje sobre a composição, funções e modulação do sistema imunológico são derivados principalmente de investigações em mamíferos. De ponto de vista evolutivo, a pesquisa sobre sistemas imunológicos em vertebrados inferiores vai ser inevitável pois só assim existirá uma melhor compreensão da história evolutiva dos sistemas imunitários em todos vertebrados como um todo (Zhu *et al.*, 2013)

Os peixes, o primeiro grupo de vertebrados depois do período devónico, é aquele que apresenta uma maior diversidade e sucesso. Este grupo heterogéneo de organismos ocupa na biologia evolutiva uma encruzilhada entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Rauta *et al.*, 2012). Dessa forma, órgãos imunes homólogos aos do sistema imunitário dos mamíferos são encontrados nos peixes. O sistema imune do peixe não só é condicionado pelo ambiente específico, mas também pela sua natureza poiquilotérmica (Rauta *et al.*, 2012). É habitual dividir o sistema imunitário em inato (não específica) e adquirido (específico). No entanto, tanto em peixes como nos mamíferos, estes dois sistemas dependem de combinações entre eles (Magnadottir, 2006). A resposta inata geralmente precede a resposta adaptativa, ou seja a resposta inata ativa e determina a natureza da resposta adaptativa e coopera na manutenção da homeostasia (Magnadottir, 2006). O sistema imunológico é um sistema de estruturas e processos biológicos dentro de um organismo que deteta uma grande variedade de agentes, desde vírus até vermes parasitas, protege contra as doenças. Nos animais, o sistema imunitário é um sistema rudimentar ao contrário do que se verifica no Homem, este mais complexo (Magnadottir, 2006; Rauta *et al.*, 2012).

O sistema imunológico possui mecanismos de defesa que aumenta a especificidade no combate contra infeções. Em termos simples, possuem barreiras físicas que evitam a entrada de agentes patogénicos, tais como bactérias e vírus. Se um agente patogénico penetra no organismo, o sistema imune inato fornece uma resposta imediata, mas não específica (Rauta *et al.*, 2012). Se os patógenos resistem à resposta inata é acionada a resposta adaptativa. Esta durante uma infeção é mais específica na identificação do agente patogénico e possui ainda a capacidade de resposta sob a forma de uma memória imunológica (Rauta *et al.*, 2012). No nível celular, o sistema imunitário

é constituído por glóbulos brancos tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Uma vez que aconteça uma lesão ou infeção eles são responsáveis pela iniciação de processos como da fagocitose e a inflamação (Machado *et al.*, 2015). O grupo de células fagocíticas conhecidas como monócitos/macrófagos e neutrófilos é responsável pela produção de uma variedade de mediadores celulares durante a inflamação, como por exemplo, péptidos antibacterianos, fatores de complemento, citocinas, proteínas de fase aguda entre outros. Pele, brânquias e intestinos são os tecidos da mucosa com associação direta com o sistema imunitário. As células fagocíticas produzem componente humorais, capazes de inibir a adesão e liquidação dos microrganismos realizando um amplo espectro de agentes antimicrobianos, tais como a lisozima, anti-proteases, espécies reativas de oxigénio (ROS) e óxido nítrico (NO). A lisozima é uma enzima solúvel, originada a partir de várias mucosas e células circundantes (Neutrófilos) e é capaz de atacar a camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana, levando-a a lise celular. Os fatores de complemento também provocam a lise celular. Como medida para evitar a colonização por parte dos agentes patogénicos o sistema imune inato também apresenta componente solúveis denominados anti-proteases que são capazes de inibir as proteases libertadas pelas bactérias limitando a digestão de proteínas (Machado *et al.*, 2015).

O objetivo deste ensaio foi determinar o efeito da luz, com comprimentos de onda diferentes, em vários parâmetros referentes ao desenvolvimento em juvenis de *Solea senegalensis*, nomeadamente, o processo de crescimento, na pigmentação e indicadores de *stress*, usando um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Materiais e métodos

Desenho Experimental

Este ensaio realizou-se nas instalações da empresa Aquacria Piscícolas, SA, sediada na Torreira, Aveiro, mais concretamente na antiga seção da pré-engorda da empresa. O início do ensaio foi dia 8 de Maio e terminou dia 22 Junho, tendo um total de 46 dias. Os peixes foram cedidos pela empresa num total de 27 015 peixes com um comprimento *standard* médio de (\pm SD) de $14,6\pm 0,64$ cm e um peso médio de $66\pm 0,7$ g. Os peixes foram mantidos durante algum tempo, antes do ensaio se iniciar, para estes se

aclimataram às condições de produção. Durante a aclimatização e o ensaio, os peixes foram mantidos em tanques com sistema de recirculação de água. Diariamente foram feitas medições de vários parâmetros da água: salinidade de $20\pm 0,4$, temperatura de $20,1\pm 1,2$ °C, pH de $7,48\pm 0,10$, amônia $0,34\pm 0,16$ mg L⁻¹, nitritos $0,118\pm 0,042$ mg L⁻¹ e por fim oxigênio dissolvido $12,3\pm 1,63$ mg L⁻¹, estes parâmetros foram medidos com o auxílio de sondas paramétricas e testes químicos. Utilizaram-se seis tanques, divididos em três grupos, o RAQ1, RAQ2 e o RAQ3, cada um com dois tanques (Figura 20). Cada tanque tem 15 metros de comprimento e 2,30 metros de largura, tendo uma área de 34,5m².

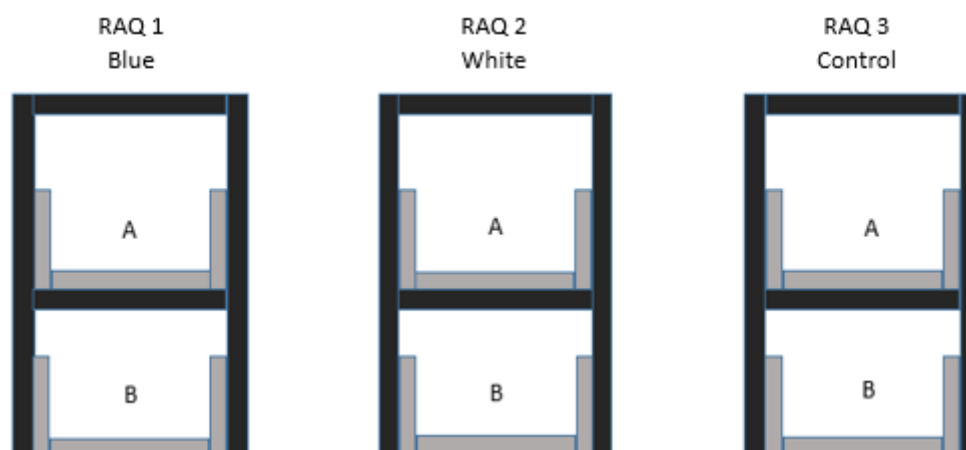


Figura 20- Esquema dos tanques

Inicialmente foi feita a instalação das luzes e dos controladores (Aquaray MultiControl 8), fornecido pela empresa TMC iberia. Cada tanque possuía três lâmpadas, igualmente distribuídas, quer em distância quer em altura em todos os tanques que iam ter tratamento luminoso. Com ajuda de um luxímetro (TES 1335 Light Meter) foi definida a intensidade luminosa das luzes, fazendo os ajustes nos controladores. Depois de realizados todos os ajustes a intensidade foi definida da seguinte forma: RAQ1 – A 209; 210; 210 lux, RAQ1 – B 209; 202; 193 lux, RAQ2 – A 189; 191; 186 lux, RAQ2 – B 193; 180; 204 lux e por fim o RAQ3 – A 279 lux e RAQ3 – B 0lux. O RAQ 1 teve o tratamento com as luzes com comprimento de onda correspondente ao azul (450nm), o RAQ 2 teve um comprimento de onda correspondente a um branco de baixa intensidade (400nm) e por fim o RAQ 3, o controle, que se assemelha às condições de produção, em que este possuía lâmpadas por cima do tanque A sendo que estas estavam revestidas com

uma película vermelha. Quanto ao fotoperíodo, as lâmpadas foram programadas para se ligarem às 8h e se desligarem às 20h, fazendo por isso um ciclo de 12h de luz e um ciclo de 12h de escuridão.

Inicialmente, em cada tanque experimental, o peixe foi mantido a diferentes densidades, desde 10 a 6 kg m⁻², em que os dois tanques do RAQ1 e o tanque A do RAQ2 apresentava a densidade máxima e o tanque B do RAQ3 tinha a densidade mais baixa. A renovação de água foi mantida em 15,60 ± 4,98 L min⁻¹ ou 0,9 ± 0,3 m³h⁻¹, tendo um volume total de 6555 litros de água salgada por cada tanque. Os peixes foram alimentados utilizando alimentadores automáticos.

Amostragens

Durante o ensaio experimental, foram feitas duas amostragens. Antes do início, uma amostragem inicial, dia 8 de Maio, em que foram recolhidos aleatoriamente 200 peixes de cada tanque e de cada tratamento. O procedimento consistia na pesca dos mesmos para caixas, para serem posteriormente pesados e medidos com o auxílio de uma balança e de uma caixa de esferovite graduada. Depois eram colocados noutra caixa para não haver o risco de repetição da amostragem do mesmo peixe. A segunda amostragem coincidiu com a final, dia 22 de Junho. Na medição apenas foi usado o tamanho *standard*.

Parâmetros estudados

Os parâmetros estudados foram agrupados em 5 categorias: avaliação do crescimento – peso molhado, taxa de crescimento relativo, taxa de crescimento específica, pigmentação, parâmetros hematológicos e resposta imune inata.

Avaliação do Crescimento

Este parâmetro, peso molhado (WW) é expresso em gramas. O WW é calculado segundo esta fórmula:

$$WW (g) = (W_t - W_0)$$

Em que W_0 é o peso inicial do peixe em gramas, W_t é o peso final do peixe expresso também em gramas.

O parâmetro, taxa de crescimento relativo (RGR) e a taxa de crescimento específico (SGR) são calculados segundo a fórmula de Turker *et al.*, 2005:

$$RGR (\%) = \% \text{ aumento em peso} = [(W_t - W_0)/W_0] \times 100$$

$$SGR (\%/dia) = \% \text{ aumento em peso por dia} = [(\ln W_t - \ln W_0)/t] \times 100$$

Em que t é os dias que se alimentou os peixes, W_0 é o peso inicial expresso em gramas, W_t peso final em gramas, $\ln(W_t)$ é o logaritmo natural do peso final do peixe e o $\ln(W_0)$ é o logaritmo natural do peso inicial do peixe.

Pigmentação

O sistema CIELAB proposto pela Comissão Internacional de Iluminação foi o sistema aplicado para medir a cor da pigmentação da pele através do uso de um colorímetro portátil (Konica Minolta CR-400). Foram efetuadas nove medidas por peixe de acordo com a Figura 21. Para realizar este teste, os animais foram mortos por desconexão da coluna vertebral e rapidamente transferidos para gelo. Esta medição foi feita na Escola Superior de Tecnologia do Mar em Peniche consistiu no disparo de um feixe luminoso, que quando regressa ao aparelho fornece as características tridimensionais da cor – *brightness, hue e chroma*.

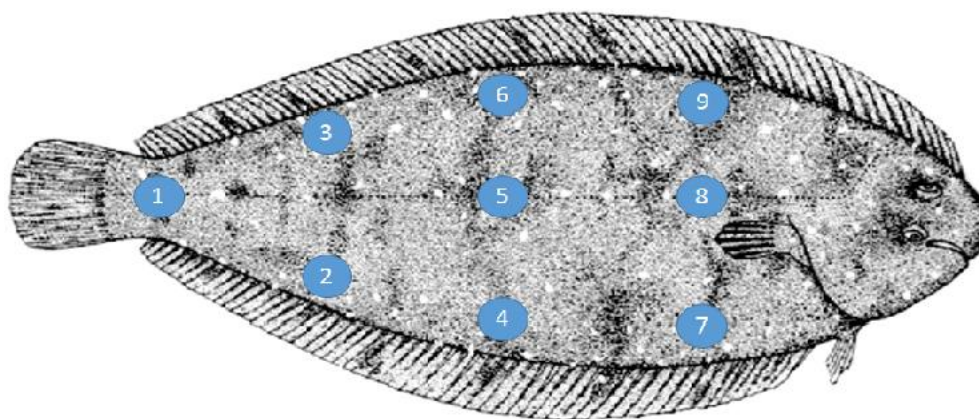


Figura 21 - Locais na pele do peixe onde o colorímetro fez as medições

Parâmetros hematológicos e imunológicos

Todo o protocolo foi conduzido pelo CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental em colaboração com a Aquacria Piscícolas S.A.

Análise Estatística

Todos os resultados são expressos como média±desvio padrão e foram analisados com o programa SPSS. Os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade da variância e, quando necessário, foram transformados antes de ser tratados estatisticamente. Nível de significância estatística foi definido como $P < 0,05$. Foi ainda realizada uma análise multivariada para averiguar a relação entre os parâmetros hematológicos e imunológicos.

Resultados

Crescimento

Para avaliar este parâmetro foi necessário recorrer a uma comparação com a curva padrão para esta espécie, propriedade da SEA 8. Inicialmente, com a ajuda de análises estatísticas foram realizados alguns testes para ver se existiam diferenças entre os tanques com o mesmo tratamento (Tabela XIII). Existem diferenças estatisticamente

significativas entre tanques A e B com o mesmo tratamento de luz. O tanque A com o espectro azul mostra uma média final de $113,8 \pm 34,9$ g, enquanto o tanque B tem uma média final de $104,5 \pm 37,3$ g. A mesma situação acontece no espectro branco. No grupo controle não existem diferenças estatisticamente significativas entre os tanques.

Tabela XIII- Comparação do peso médio final (g) entre tanques com o mesmo regime luminoso.

	Tanque	
	A	B
Azul	$113,8 \pm 34,9^a$	$104,5 \pm 37,3^b$
Branco	$100,8 \pm 43,3^a$	$78,7 \pm 34,2^b$
Controlo	$90,7 \pm 36,4^a$	$97,6 \pm 36,6^a$

Valores são expressos como média \pm SD (n=200). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de luz (one-way ANOVA, $p \leq 0,05$).

De seguida, foi feita a análise individualizada por tanques, separando o tanque A do B. Foi feita a análise estatística, para cada tanque A por tratamento e o mesmo para cada tanque B. Existem diferenças estatisticamente significativas entre todos os tratamentos luminosos para o tanque A, sendo que o tanque A da luz azul tem um peso médio de $113,80 \pm 34,94$ g, sendo este o tanque que possui um peso médio superior, por outro lado o Tanque A do Controlo é aquele que possui o peso médio inferior $90,72 \pm 36,40$ g. Na análise aos tanques B existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos luminosos contudo, entre azul e controlo, não existem diferenças estatisticamente significativas sendo que o tanque com a luz azul tem um peso médio de $104,49 \pm 37,30$ g e o tanque do Controlo tem um peso médio de $97,59 \pm 36,61$ g (Tabela XIV).

Tabela XIV- Pesos médios finais comparando tratamentos, individualizando os tanques A e B de cada regime luminoso (Azul, Branco e Controlo).

Tanque	Azul	Branco	Tanque	Azul	Branco
	A	113,80±34,94 ^a		100,85±43,29 ^b	B
Azul		Controlo	Azul	Controlo	
113,80±34,94 ^a		90,72±36,40 ^b	104,49±37,30 ^a	97,59±36,61 ^a	
Branco		Controlo	Branco	Controlo	
	100,85±43,29 ^a	90,72±36,40 ^b		78,71±34,31 ^a	97,59±36,61 ^b

Valores são expressos como média±SD (n=200). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de luz (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$).

Com esta análise dos resultados obtidos, foi realizada a comparação com a curva modelo da SEA 8, analisando a soma dos tanques (Tabela XV) e mais detalhadamente tanque por tanque (Tabela XVI). É possível concluir que quando se comparam as taxas de crescimento da soma dos tanques com tratamento azul, branco e o controlo, com a curva modelo os valores obtidos são inferiores, no caso do azul é de 99%, no branco de 98% e no controlo de 97%.

Tabela XV- Comparação da soma dos tanques com a curva modelo da SEA 8, agrupando por tratamento (Azul, Branco e Controlo).

TRATAMENTO	NÚMERO DE PEIXES	PESO MÉDIO (G)	BIOMASSA (KG)	CRESCIMENTO (%)
AZUL	9 442	108,98	1 029	99%
BRANCO	10 726	90,02	966	98%
CONTROLO	6 768	94,16	637	97%

Na Tabela XVI, estão descritos os tanques individualizados, em que as melhores taxas de crescimento apresentam percentagens superiores a 100%, significando crescimentos superiores aos da curva modelo, isto verificou-se em todos os tanques A, por sua vez, os tanques B obtiveram resultados inferiores do que a curva modelo, sendo que o tanque B do tratamento com a luz branca e do controlo foram aqueles onde se observaram taxas inferiores, 83% e 87%, respetivamente.

Tabela XVI- Comparação entre tanques com a curva modela da SEA 8.

UNIDADE	TRATAMENTO	NÚMERO DE PEIXES	PESO MÉDIO (GR)	BIOMASSA (KG)	CRESCIMENTO (%)
1A	Azul	4 552	113,80	518	105%
1B	Azul	4 890	104,49	511	93%
2A	Branco	5 480	100,85	553	112%
2B	Branco	5 246	78,71	413	83%
3A	Controlo	3 379	90,72	307	108%
3B	Controlo	3 389	97,59	331	87%

Avaliação do crescimento: WW, RGR, SGR.

Os pesos médios iniciais, biomassa e densidade para cada tanque estão demonstrados na Tabela XVII. Os tanques com luz azul e o tanque A com luz branca tinham densidade inicial de 10kg m^{-2} , sendo que terminaram com densidades diferentes, 15kg m^{-2} para os tanques com luz azul e 16kg m^{-2} para os tanques com luz branca. A densidade nos tanques controlo era mais baixa no início e o mesmo se verificou no fim do tempo experimental.

Tabela XVII- Condições do ensaio experimental - Número de peixes, peso médio (PM), biomassa, densidade e comprimento standard, no dia inicial (8 Maio) e no dia final (22 Junho).

		8 Maio				22 Junho			
Tratamento		N	PM (g)	Biomassa (kg)	Densidade (kg m^{-2})	N	PM (g)	Biomassa (kg)	Densidade (kg m^{-2})
A	Azul	4557	77	351	10	4529	114	516	15
B		4902	72	353	10	4865	105	511	15
A	Branco	5483	64	351	10	5455	101	551	16
B		5291	54	286	8	5232	79	413	12
A	Controlo	3388	68	197	6	3360	91	306	9
B		3394	69	234	7	3366	98	330	10

Os parâmetros peso, RGR e SGR estão descritos na Tabela XVIII.

No tratamento com luz azul e luz branca é onde se verifica um valor mais elevado de peso, mais precisamente nos tanques A, tendo esse valor atingido cerca de 37g, em contrapartida no tanque B com tratamento com a luz branca é onde o valor é inferior, 25g.

Tabela XVIII- Parâmetros calculados com base nas amostragens efetuadas – Peso, RGR and SGR.

Parâmetros	Azul		Branco		Controlo	
	A	B	A	B	A	B
Peso (g)	37	33	37	25	33	29
RGR (%) = % aumento em peso	48,05	45,83	57,81	46,30	56,90	42,03
SGR (%/dia) = % aumento em peso por dia	0,85	0,82	0,99	0,83	0,98	0,76

Pigmentação

Existe diferenças estatisticamente significativas no efeito do espectro nos parâmetros *lightness* (L), de *chroma* (C) e *hue* (H). Peixes mantidos sobre a luz azul apresentaram uma média de valores de *lightness* de $31,85 \pm 2,71$, com luz branca apresentaram um valor médio de *lightness* de $31,03 \pm 0,89$. Os peixes do grupo controlo tornaram-se gradualmente mais claros com um valor máximo de L de $35,26 \pm 3,11$ (Tabela XIX). Existem diferenças estatisticamente significativas nos outros atributos cromáticos – *chroma* e *hue* comparando os tratamentos luminosos com o grupo controlo.

Tabela XIX- Valores da leitura do colorímetro à superfície da pele de *Solea senegalensis*

	Tratamento Luminoso		
	Azul	Branco	Controlo
L (<i>lightness</i>)	$31,85 \pm 2,71^a$	$31,03 \pm 2,89^a$	$35,26 \pm 3,11^b$
C (<i>chroma</i>)	$8,00 \pm 2,25^a$	$8,15 \pm 2,05^a$	$13,03 \pm 3,26^b$
H (<i>hue</i>)	$96,92 \pm 4,33^a$	$96,82 \pm 3,74^a$	$95,31 \pm 7,69^b$

Valores são expressos como média±SD (n=50). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de luz (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$).

Parâmetros hematológicos e imunológicos

A proporção relativa de células no sangue está apresentada na Tabela XX.

No caso dos trombócitos, os peixes que estiveram sobre tratamento luminoso têm as percentagens mais elevadas comparando com os do controlo. Ao longo do tempo, foi registada uma redução na percentagem dos valores. Nos linfócitos, o tratamento com luz azul apresenta uma percentagem mais baixa em comparação com a luz branca e o controlo, com o passar do tempo existe uma diminuição gradual dos valores. Os monócitos apresentam valores mais altos no controlo do que com tratamentos com luz, ao longo do tempo, há um aumento da percentagem de monócitos, finalmente, nos neutrófilos, o controlo apresenta o valor mais elevado, com o decorrer do tempo todas as percentagens aumentaram.

Tabela XX- Proporção relativa de células no sangue (trombócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos) de Solea senegalensis de diferentes tratamentos durante 46 dias.

Parâmetros	Tempo	Tratamento luminoso		
		Azul	Branco	Controlo
Trombócitos	1 ^a	52,75±5,89 ^c	52,83±2,84 ^c	32,08±7,35 ^d
	2 ^b	40,00±6,10 ^c	45,75±13,93 ^c	24,33±3,82 ^d
Linfócitos	1 ^a	35,25±6,25	41,00±2,24	42,42±2,03
	2 ^b	32,67±4,99	32,67±6,09	37,75±5,66
Monócitos	1	3,92±2,05 ^c	2,33±1,55 ^c	5,17±0,85 ^d
	2	4,42±2,59 ^c	2,75±1,22 ^c	6,42±3,13 ^d
Neutrófilos	1 ^a	8,08±4,36 ^c	3,83±1,21 ^c	20,33±8,28 ^d
	2 ^b	22,92±4,50 ^c	18,83±7,50 ^c	31,50±4,81 ^d

Valores são expressos como média ± SD (n = 6). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de luz (two-way ANOVA, p ≤ 0.05).

Os parâmetros imunológicos da resposta inata estão apresentados na Tabela XXI. No tempo 1, os tanques sobre o efeito da luz azul apresentam os valores mais elevados para a proteína, atividade bactericida, lisozima, peroxidase, lactato e glicose. Com o passar do tempo, no tempo 2, a luz branca torna-se no tratamento com valores mais elevados para a proteína, atividade bactericida, lisozima, peroxidase, lactato, triglicéridos e glicose.

Tabela XXI- Parâmetros da resposta imune inata de *Solea senegalensis* com diferentes tratamentos luminosos durante 46 dias.

Parâmetros	Tempo	Tratamento luminoso		
		Azul	Branco	Controlo
Proteínas (units mL ⁻¹)	1	42,06±1,64	38,27±2,74	39,58±4,09
	2	39,70±3,29	42,14±5,35	40,00±4,62
Atividade bactericida (%)	1	21,85±20,21	20,51±17,77	21,83±17,74
	2	21,49±18,21	23,75±18,39	22,31±17,69
Lisozima (µg mg ⁻¹)	1	21,03±0,82	19,14±1,37	19,79±2,05
	2	19,85±1,64	21,07±2,68	20,00±2,31
Peroxidase (OD 450nm)	1 ^a	10,93±10,11	10,26±8,89	10,92±8,87
	2 ^b	10,75±9,11	11,87±9,20	11,16±8,85
Lactato (mg dL ⁻¹)	1	10,52±0,41	9,57±0,69 ^c	9,90±1,02 ^d
	2	9,93±0,82	10,54±1,34 ^c	10,00±1,16 ^d
Triglicerídeos (mM)	1	5,46±5,06	5,13±4,44	5,46±4,44
	2	5,38±4,56	5,94±4,60	5,58±4,42
Glucose (mM)	1	5,26±0,21	4,78±0,34	4,95±0,51
	2	4,96±0,41	5,27±0,67	5,00±0,58

Valores são expressos como médias ± SD (n = 6). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de luz (two-way ANOVA, p ≤ 0.05).

Análise multivariada (PCA)

Com o objetivo de averiguar a relação entre os parâmetros hematológicos e imunológicos, e com o objetivo de averiguar a relação existente entre estes dois parâmetros com os tratamentos luminosos procedeu-se à realização de uma análise de componentes principais (PCA). O eixo 1 (PC1) explica 53,8% da variabilidade total dos dados e o eixo 2 (PC2) explica 27,2% da variabilidade dos dados (Figura 22).

Nos parâmetros hematológicos, os componentes monócitos e neutrófilos apresentam uma forte correlação positiva entre si, sendo que o aumento da % de monócitos proporciona um incremento na % de neutrófilos (ângulo formado pelos vetores é inferior a 90°). Contudo, a relação destes com os linfócitos é tendencialmente nula (ângulo formado pelos vetores é muito próximo de 90°). De igual modo, a relação dos

trombócitos com os linfócitos é também praticamente nula. Ao analisar a relação dos trombócitos com monócitos e neutrófilos, esta é inversa, sendo que o aumento na % dos trombócitos implica uma diminuição na % do par monócitos e neutrófilos (ângulo formado pelos vetores é superior a 90°).

Os indivíduos associados às amostras espécie-tratamento dos tanques dos tratamentos com a luz azul e branca (B1; B2 e W1; W2) são caracterizados por apresentar altos valores de trombócitos enquanto os tanques do controlo (C1 e C2) apresentam altos valores para linfócitos, monócitos e neutrófilos.

Nos parâmetros imunológicos os componentes lisozima e triglicéridos apresentam uma correlação forte positiva, enquanto com a peroxidase e a glucose estes têm uma correlação praticamente nula. O lactato apresenta uma correlação positiva com a peroxidase e com a lisozima, contudo o lactato apresenta uma correlação inversa com a atividade bacteriana, sendo que esta última também apresenta correlação inversa com a lisozima e com os triglicéridos. No que concerne à proteína esta apresenta uma correlação nula com o lactato, sendo que possui uma correlação inversa com a glucose.

Os indivíduos associados às amostras espécie-tratamento dos tanques dos tratamentos com a luz Azul e Branca (B1; B2 e W1; W2) são caracterizados por apresentar altos valores de proteínas, triglicéridos, lisozima, lactato e peroxidase. Para os tanques do controlo (C1; C2) estes são caracterizados por apresentar altos valores de atividade bacteriana.

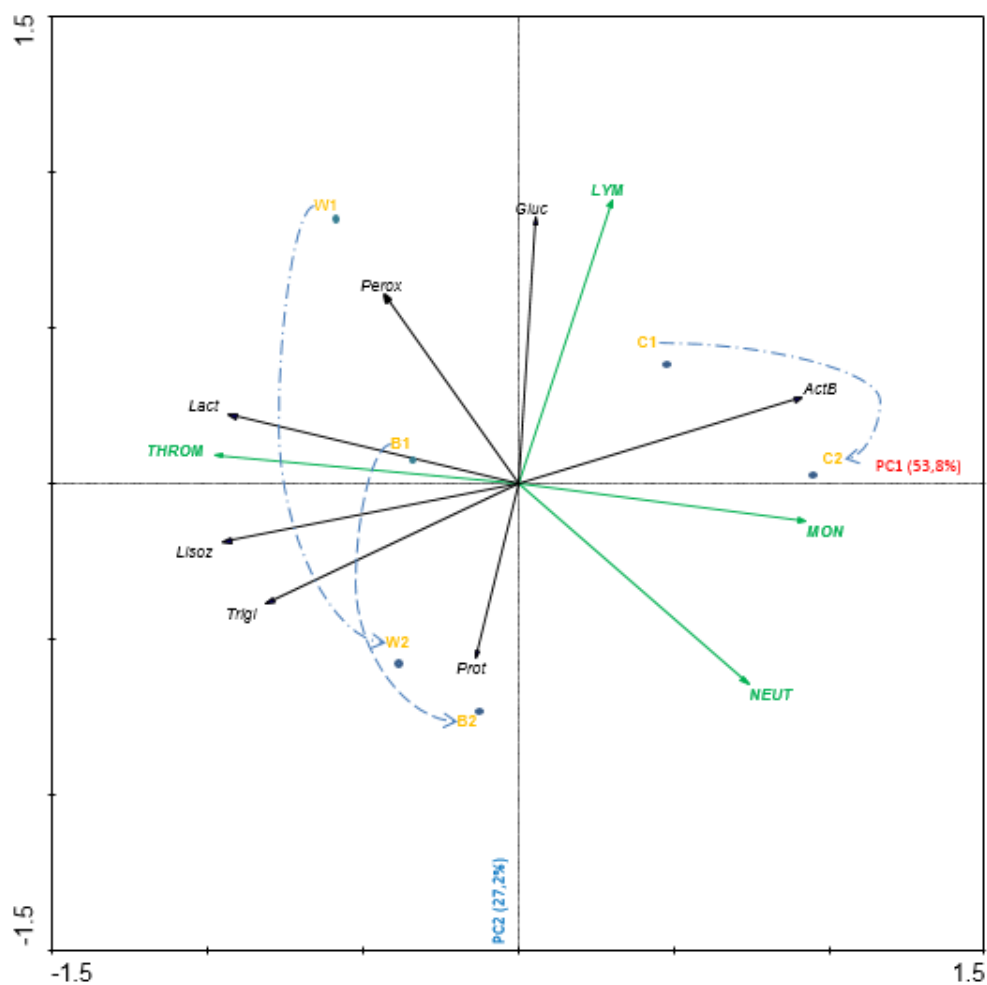


Figura 22- Diagrama da análise de componentes principais (ACP) para parâmetros hematológicos e imunológicos para os diferentes tratamentos luminosos. Cada vetor representa um parâmetro hematológico (NEUT – Neutrófilos; MON – Monócitos; THROM – trombócitos e LYM – Linfócitos) e imunológico (Prot – Proteínas; Trigl – triglicéridos; Lisoz – Lisozima; Lact – Lactato; ActB – Atividade Bacteriana; Perox – Peroxidase e Gluc – Glucose), e cada ponto representa os tanques (W1 – Tratamento com Luz branca no tempo 1, W2 – tratamento com luz branca no tempo 2; B1 – Tratamento com luz azul no tempo 1, B2 – tratamento com luz azul no tempo 2; C1 – Controle no tempo 1, C2 – Controle no tempo 2) com diferentes tratamentos luminosos

Discussão

Crescimento

Ao longo do tempo, todas as aquaculturas tentam maximizar a sua rentabilidade, testando para tal vários parâmetros que possam controlar para que isso tenha um impacto positivo na produção. A escolha deste parâmetro deveu-se à escassez de artigos científicos específicos para esta espécie *Solea senegalensis* (Villamizar *et al.*, 2011). Uma vez que a única publicação com este parâmetro se centrava nas larvas desenvolveu-se um protocolo para averiguar o efeito em juvenis de *Solea senegalensis*.

Sabendo que a produção de linguado apresenta vários desafios, entre as quais a dispersão de tamanho (Dinis *et al.*, 1999). Neste ensaio experimental foi evidenciado esse mesmo desafio, uma vez que os pesos médios e as densidades iniciais verificadas em cada tanque eram diferentes (Tabela XVII) sendo que estes pontos podem ter influenciado as diferentes taxas de crescimento.

Dentro de cada tratamento (Azul, Branco) existem diferenças estatisticamente significativas entre os tanques A e B. No controlo, não existem diferenças estatisticamente significativas (Tabela XIII). Sendo que as lâmpadas estão igualmente distribuídas por todos os tanques, tanto horizontalmente como verticalmente as diferenças podem ser devido ao próprio *design* dos tanques e da canalização, uma vez que o movimento da água é feito pelo início do tanque A, percorre todo o comprimento do tanque, levando consigo todos os produtos de excreção presente na água, e por meio de tubagens essa mesma água entra diretamente no tanque B, percorrendo todo o comprimento do tanque B arrastando consigo todos os produtos de excreção do tanque A e do tanque B. A zona de tratamento de água situa-se no final do tanque B. Isto pode explicar a diferença (estatisticamente significativa) entre tanques A e B com o mesmo tratamento luminoso. Já para o controlo, existe o mesmo *design* de tanque e tubagens do que nos outros tratamentos. A única diferença, é o facto de os peixes sobre efeito das luzes azul e brancas apresentarem muito mais atividade com um padrão natatório anormal fazendo com que os produtos de excreção sejam muito superiores do que os peixes presentes no controlo, que apresentam o comportamento normal para esta espécie, excretando por isso menos, sendo que estes produtos vão ter menor efeito dos peixes dos tanques B. Analisando os tanques individualmente, como podemos ver na Tabela XIV,

existem diferenças estatisticamente significativas, praticamente entre todos os tanques, menos entre tanques B da luz azul e do controlo. Nos tanques A existem diferenças estatisticamente significativas entre todos, contudo os peixes que possuem um peso médio superior são os peixes do tanque azul e os peixes do controlo são aqueles que apresentam um peso médio inferior, em relação ao tanque B, novamente os peixes com a luz azul apresentam um peso médio superior enquanto os peixes do tanque com a luz branca apresentam um peso médio inferior (Tabela XIV). Como referi, esta análise não é muito fiável, uma vez que os pesos iniciais em todos os tanques diferia bastante (Tabela XVII), levando a diferenças no metabolismo dos peixes, causando impacto nas taxas de crescimento. Para que este erro fosse atenuado, foi realizada uma comparação de tratamentos com a curva modelo de *Solea senegalensis* e os resultados estão expressos nas Tabelas XV e XVI. Como se verifica na Tabela XV as taxas de crescimentos são inferiores a 100%, isto significa que os peixes tiveram um crescimento inferior ao valor dado pela curva modelo. Isto porque as taxas de crescimento referenciadas na Tabela XV advém das somas dos dois tanques por tratamento. Como anteriormente, obtém-se diferenças estatisticamente significativas entre tanques com o mesmo tratamento, foi feita a comparação individualizando os tanques com a curva modelo (Tabela XVI). Nesta Tabela, podemos concluir que todos os tanques A possuem uma taxa de crescimento superior a 100%, sendo que isso significa que os peixes cresceram mais do que o valor dado pela curva modelo, contudo, os tanques B, mais uma vez, tiveram uma performance muito inferior (chegando a valores de 83% no tanque B com luz branca), isto vai de acordo com a análise feita anteriormente (Tabela XIII). Tendo sido verificada esta diferença entre tanques A e B, a Tabela XV que se baseia na soma dos dois tanques por tratamento, é normal que tenha uma taxa de crescimento inferior ao valor dado pela curva modela, pois todos os tanques B em todos os tratamentos ficam muito abaixo do valor teórico, o que se esperava devido ao problema identificado do *design* dos tanques e das tubagens.

Avaliação do crescimento WW, RGR, SGR

O parâmetro WW dos juvenis de *Solea senegalensis* é calculado através da diferença entre peso inicial e final (Tabela XVIII). Como já foi referido acima, um problema associado à produção de linguado é a dispersão dos tamanhos (Dinis *et al.*, 1999)

e aqui mais uma vez, foi visível a influência desse facto. Da mesma forma acima referido, a diferença no metabolismo associado a diferentes tamanhos faz com que este parâmetro não seja semelhante entre tratamentos. Contudo, as mesmas tendências são verificadas, os tanques A possuem um ganho de peso médio superior em comparação com os tanques B. Contudo pode-se ver que com tratamento luminoso (Azul e Branco) existe um aumento de peso médio superior, isto pode significar que talvez exista uma tendência para que estes sobre tratamento luminoso possam crescer mais do que aqueles que estão no controlo. Para retirar qualquer dúvida sobre o efeito, deveria ser realizada uma melhoria do protocolo, sendo que certas medidas como, peso inicial e duração do ensaio deveria ser alterado.

A taxa de crescimento relativo (RGR) e a taxa de crescimento específico (SGR) nos juvenis de *Solea senegalensis*, entre tratamentos, não difere de uma forma significativa. O mesmo padrão verificado em cima existe também nestes dois parâmetros, ou seja os tanques A tem valores superiores comparando com os tanques B dentro de cada tratamento luminoso.

Estes parâmetros foram calculados na tentativa de perceber qual tratamento luminoso potenciará o crescimento dos juvenis de linguado, sendo que a Luz Branca, é aquela que tem um SGR superior, ou seja tem o valor percentual de incremento de peso por dia (0,99%) superior, mas mesmo este parâmetro pode ser influenciado pela diferença de pesos iniciais, uma vez que essa diferença possa colocar os peixes em diferentes estágios de crescimento.

Pigmentação

Os peixes criados em aquacultura são alvo de muitos preconceitos por parte do consumidor, desde o teor em gordura até à cor da pele tendo por isso diferenças externas comparativamente com os peixes do estado selvagem. Nesse sentido, surgiu a ideia de testar luzes de diferentes comprimentos de onda, na tentativa de tornar o peixe de aquacultura mais claro, idêntico ao selvagem, trazendo vantagens económicas para a empresa que os produz. O mesmo se verifica noutra espécie, *Pagrus pagrus*, em que foi testado o efeito da luz azul na pigmentação da pele do pargo (Szisich *et al.*, 2002). A realização deste ensaio iniciou-se pelas 6 horas da manhã com o abate de 150 peixes. O abate foi feito pela desconexão da coluna vertebral. Esta técnica foi usada para sacrificar

os peixes por se pensar ser a maneira mais rápida minimizando assim o *stress* vivenciado pelos peixes. A forma de abate foi bastante importante porque os peixes têm a capacidade de alterar a sua coloração em resposta às condições ambientais ou condições stressantes (Szisich *et al.*, 2002; Van der Salm *et al.*, 2004) uma vez que estas são controladas pelo sistema endócrino e/ou sistema nervoso. Os resultados demonstram que existem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos luminosos e o controlo em todos os parâmetros calculados (L, H e C). O parâmetro, *hue* é uma das principais propriedades da cor, sendo que este pode assumir valores entre 0° a 360°, assumindo cores como vermelho, verde, azul e amarelo. O parâmetro *chroma* é a saturação das distintas tonalidades, sendo que assume valores de 0% a 100%. Por fim o parâmetro *lightness* é a dimensão da cor de um objeto, através da qual o objeto parece refletir ou transmitir mais ou menos a luz incidente, sendo que os valores variam de 0% a 100%, sendo que valores superiores são mais claros. Para averiguar se a pele do *Solea senegalensis* se torna mais clara, tornando-o mais vendável, o parâmetro mais importante será o L (*lightness*), pois é este que avalia o brilho da cor.

Analisando a Tabela XIX podemos ver que existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos e o controlo para o parâmetro L, sendo que isso significa que os tratamentos luminosos (azul e branco), como possuem valores inferiores comparativamente ao controlo, são mais escuros do que os peixes do controlo.

Comparativamente, os nossos dados são contraditórios aos obtidos no ensaio do pargo (Szisich *et al.*, 2002), em que foi observado uma alteração na coloração do peixe tornando-o mais claro usando a luz azul, com o linguado, essa tendência não foi observada.

Como os dados não são concordantes com o trabalho de Szisich *et al.*, 2002, podem ser efetuados alguns ajustes ao protocolo desenvolvido nomeadamente a forma de sacrificar o peixe, desde as horas a que foi feito, uma vez que a essa hora não existe trabalho na zona, podendo ser por isso um motivo de *stress* que possa alterar a coloração da pele. Como a pele dos linguados apresenta manchas de tonalidades diferente a medição com o colorímetro pode ser falível uma vez que o feixe de luz pode medir diferentes tonalidades, para evitar esse erro, uma medição de melanina deveria ter sido feita pois esta é mais fiável e possui menos erros associados.

Parâmetros hematológicos e imunológicos

Com este ensaio, foi estudado o efeito da luz de diferentes comprimentos de onda, no crescimento, contudo não se sabe o efeito no bem-estar nos linguados. Na tentativa de eliminar estas dúvidas foi feita uma colheita de sangue para analisar parâmetros biológicos tais como, parâmetros hematológicos e imunológicos. Neste estudo, e analisando os parâmetros hematológicos, a percentagem de trombócitos, linfócitos e neutrófilos varia estatisticamente significativamente durante o tempo do ensaio, ou seja entre o tempo 1 e o tempo 2, sendo que nos trombócitos e linfócitos existe um diminuir da percentagem relativa, enquanto nos neutrófilos existe um aumento. Entre tratamentos luminosos existem diferenças estatisticamente significativas nos trombócitos, monócitos e neutrófilos.

A composição dos glóbulos brancos é caracterizada pela predominância dos trombócitos e linfócitos (Tabela XX). Contudo os valores de trombócitos dos peixes presentes nos tanques com tratamento luminoso azul e branco, no tempo 1, tem valores percentuais superiores aos valores de referência (Peres *et al.*, 2015) para juvenis de *Solea senegalensis*, o mesmo não se passa para os linfócitos. Já para os monócitos e neutrófilos os peixes presentes no tanque de controlo e no tanque com luz azul apresentam valores percentuais superiores aos valores de referência (Peres *et al.*, 2015), contudo os tanques com luz branca apresentam valores inferiores.

Os elevados valores percentuais de linfócitos e monócitos no tempo 1 sugere que os peixes estariam sobre ação de agentes stressantes. A diminuição verificada ao longo do tempo pode ser devida ao extravasamento destas células e a sua penetração no epitélio das brânquias, da pele e do intestino (Wendelaar-Bonga, 1997). Diminuição da contagem de linfócitos também foi observada em peixes famintos, sugerindo que a redução foi causada por má nutrição (Rios *et al.*, 2005).

Analisando os parâmetros imunológicos na tabela XXI, existem diferenças estatisticamente significativas apenas na peroxidase ao longo do tempo e no lactato entre o tanque com a luz branca e o controlo.

Em *Solea senegalensis* foi relatado que consegue manter a homeostasia da glucose plasmática durante períodos de fome prolongada (até 21 dias) (Costas *et al.*, 2011), devido a esse facto, este parâmetro ganha um interesse extra como indicador fisiológico da condição nutricional e *stress*. No presente estudo, os valores de glucose são superiores

aos valores de referência para esta espécie (Peres *et al.*, 2015). Isto pode sugerir que os peixes estão sobre condições *stressantes*. Como não existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos luminosos, o fator “luz” pode não ser o principal agente *stressante*, levando para problemas nutricionais, como o jejum.

Em suma, verificou-se que a luz branca (400nm) é aquela que promove uma melhor taxa de crescimento comparativamente ao controle, no entanto, quanto à coloração este tratamento não foi o indicado para obter uma coloração mais clara, tendo sido verificado que mesmo assim o controle é o melhor tratamento no caso da pigmentação. Na análise feita aos parâmetros hematológicos e imunológicos conclui-se que a diminuição dos valores de trombócitos e linfócitos, verificada em todos tratamentos, ao longo do tempo deve-se à migração dessas mesmas células para outros tecidos o que pressupõe um indício de *stress*. Contudo os valores de monócitos e neutrófilos parecem mais concordantes com os valores de referência para esta espécie na luz branca.

Contudo neste trabalho não se conseguiu obter respostas concretas no que diz respeito à influência da luz no crescimento, e uma das razões para tal, foi a discrepância de médias iniciais no peso dos peixes o que levou a articular de forma diferente a interpretação dos dados. Sendo assim, este estudo deveria realizar-se novamente com pesos médios homogeneizados entre tanques e por um período de tempo mais extenso. Quanto à coloração da pele presume-se que a forma de abate possa ter alguma influência no resultado assim como a análise poderia ser mais precisa com a quantificação de melanina.

Conclusão

O período de estágio que decorreu durante 9 meses (1 de Setembro de 2014 até dia 30 de Junho de 2015), apesar de ter sido muito trabalhoso foi uma experiência muito enriquecedora quer profissionalmente como pessoalmente. Foram-me transmitidas todas as técnicas usadas para a produção de linguado em regime intensivo, como quer todas as funções de cada equipamento instalado na produção.

Este estágio ainda me possibilitou muitas outras experiências enriquecedoras, quer a presença em palestras em vários pontos do país, vários *workshops* e a presença e participação em vários projetos inovadores em que a empresa participa, sendo que no

final deste período de estágio trabalhei não só com linguado mas também com ostras, microalgas, douradas, robalos e plantas halófitas.

Diariamente, realizei todas as rotinas existentes da empresa, e fiquei a conhecer melhor o sistema de produção utilizado pela empresa e aprendi mais sobre a espécie produzida.

Tudo isto vivido num ambiente amigável e divertido, sempre acompanhado de boa disposição e de muita solidariedade. Posso por isso afirmar que o objetivo do meu estágio foi cumprido.

Referências

- Acerete, L., J. C. Balasch, E. Espinosa, A. Josa, and L. Tort, 2004, Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to *stress* by transport and handling: *Aquaculture*, v. 237, p. 167-178.
- Andrade, T., A. Afonso, A. Pérez-Jiménez, A. Oliva-Teles, V. de las Heras, J. M. Mancera, R. Serradeiro, and B. Costas, 2015, Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status: *Aquaculture*, v. 438, p. 6-11.
- Anguis, V., and J. P. Canavate, 2005, Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime: *Aquaculture*, v. 243, p. 133-145.
- Arjona, F. J., I. Ruiz-Jarabo, L. Vargas-Chacoff, M. P. Martin del Rio, G. Flik, J. M. Mancera, and P. H. M. Klaren, 2010, Acclimation of *Solea senegalensis* to different ambient temperatures: implications for thyroidal status and osmoregulation: *Marine Biology*, v. 157, p. 1325-1335.
- Arjona, F. J., L. Vargas-Chacoff, I. Ruiz-Jarabo, O. Goncalves, I. Pascoa, M. P. Martin del Rio, and J. M. Mancera, 2009, Tertiary *stress* responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth: *Aquaculture*, v. 287, p. 419-426.
- Arjona, F. J., L. Vargas-Chacoff, I. Ruiz-Jarabo, M. P. Martin del Rio, and J. M. Mancera, 2007, Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity: *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, v. 148, p. 413-421.
- Arlinghaus, R., S. J. Cooke, A. Schwab, and I. G. Cowx, 2007, Fish welfare: a challenge to the feelings-based approach, with implications for recreational fishing: *Fish and Fisheries*, v. 8, p. 57-71.
- Ashley, P. J., 2007, Fish welfare: Current issues in aquaculture: *Applied Animal Behaviour Science*, v. 104, p. 199-235.
- Atoum, Y., S. Srivastava, and X. Liu, 2015, Automatic feeding control for dense aquaculture fish tanks: *IEEE Signal Processing Letters*, v. 22, p. 1089-1093.
- Barber, I., 2007, Parasites, behaviour and welfare in fish: *Applied Animal Behaviour Science*, v. 104, p. 251-264.
- Barron, J. M., N. R. Jensen, P. J. Anders, J. P. Egan, and K. D. Cain, 2013, Suppression of Cannibalism during Larviculture of Burbot through Size Grading: *North American Journal of Aquaculture*, v. 75, p. 556.
- Barton, B. A., 2000, Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport *stress*: *North American Journal of Aquaculture*, v. 62, p. 12-18.
- Barton, B. A., 2002, *Stress* in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids: *Integrative and Comparative Biology*, v. 42, p. 517-525.
- Barton, B. A., and R. E. Peter, 1982, Plasma cortisol *stress* response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock: *Journal of Fish Biology*, v. 20, p. 39-51.
- Bermejo-Poza, R., J. De la Fuente, C. Perez, S. Lauzurica, E. Gonzalez, M. T. Diaz, and M. Villarroel, 2015, The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout: *Aquaculture*, v. 443, p. 24-30.

- Blanco-Vives, B., M. Aliaga-Guerrero, J. P. Canavate, G. Garcia-Mateos, A. J. Martin-Robles, P. Herrera-Perez, J. A. Munoz-Cueto, and F. J. Sanchez-Vazquez, 2012, Metamorphosis Induces a Light-Dependent Switch in Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) from Diurnal to Nocturnal Behavior: *Journal of Biological Rhythms*, v. 27, p. 135-144.
- Bravo, André. *Revista de Marinha*, edição nº 984 Março/Abril, 2015
- Bogolino, A., M. J. Darias, A. Estévez, K. B. Andree, and E. Gisbert, 2012, The effect of dietary arachidonic acid during the *Artemia* feeding period on larval growth and skeletogenesis in Senegalese sole, *Solea senegalensis*: *Journal of Applied Ichthyology*, v. 28, p. 411-418.
- Bonaldo, A., L. Parma, F. Mongile, P. P. Gatta, P. Di Marco, T. Petochi, G. Marino, M. G. Finoia, R. Fontanillas, and W. Koppe, 2015, Feeding turbot juveniles *Psetta maxima* L. with increasing dietary plant protein levels affects growth performance and fish welfare: *Aquaculture Nutrition*.
- Bostock, J., B. McAndrew, R. Richards, K. Jauncey, T. Telfer, K. Lorenzen, D. Little, L. Ross, N. Handisyde, I. Gatward, and R. Corner, 2010, *Aquaculture: global status and trends*, v. 365, 2897-2912 p.
- Bovenkerk, B., and F. B. Meijboom, 2013a, Fish Welfare in Aquaculture: Explicating the Chain of Interactions Between Science and Ethics: *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, v. 26, p. 41-61.
- Bovenkerk, B., and F. L. B. Meijboom, 2013b, Fish Welfare in Aquaculture: Explicating the Chain of Interactions Between Science and Ethics: *Journal of Agricultural & Environmental Ethics*, v. 26, p. 41-61.
- Cabrita, E., F. Soares, and M. T. Dinis, 2006, Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality: *Aquaculture*, v. 261, p. 967-975.
- Canavate, J. P., R. Zerolo, and C. Fernandez-Diaz, 2006, Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods: *Aquaculture*, v. 258, p. 368-377.
- Castelo Branco, M. A., M. A. Arruda, and S. Gamito, 2010, Feeding habits of *Solea senegalensis* in earthen ponds in Sado estuary: *Journal of Sea Research*, v. 64, p. 446-450.
- Chrousos, G. P., 1998, *Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response - The 1997 Hans Selye Memorial Lecture: Stress of Life: from Molecules to Man*, v. 851, p. 311-335.
- Colson, V., B. Sadoul, C. Valotaire, P. Prunet, M. Gaumé, and L. Labbé, 2015, Welfare assessment of rainbow trout reared in a Recirculating Aquaculture System: Comparison with a Flow-Through System: *Aquaculture*, v. 436, p. 151-159.
- Comité do Códex sobre Higiene Alimentar, 2009
- Congleton, J. L., W. J. LaVoie, C. B. Schreck, and L. E. Davis, 2000, *Stress* indices in migrating juvenile Chinook salmon and steelhead of wild and hatchery origin before and after barge transportation: *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 129, p. 946-961.
- Conte, F. S., 2004, *Stress* and the welfare of cultured fish: *Applied Animal Behaviour Science*, v. 86, p. 205-223.
- Crețu, M., V. Cristea, L. Dediu, and S. M. Petrea, 2014, The Influence of Different Stocking Densities on Biochemical Composition of Rainbow Trout Meat Reared in a Recirculating Aquaculture System: *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies / Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii*, v. 47, p. 200-204.

- Daly, B., J. S. Swingle, and G. L. Eckert, 2012, Increasing hatchery production of juvenile red king crabs (*Paralithodes camtschaticus*) through size grading: *Aquaculture*, v. 364-365, p. 206-211.
- Damsgard, B., U. Sorum, I. Ugelstad, R. A. Eliassen, and A. Mortensen, 2004, Effects of feeding regime on susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to cold water vibriosis: *Aquaculture*, v. 239, p. 37-46.
- Daniel, A. P., A. P. L. Veeck, B. Klein, L. F. Ferreira, M. A. da Cunha, T. V. Parodi, C. C. Zeppenfeld, D. Schmidt, B. O. Caron, B. M. Heinzmann, B. Baldisserotto, and T. Emanuelli, 2014, Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice: *Journal Of Food Science*, v. 79, p. S1205-S1211.
- Daniels, H. V., D. L. Berlinsky, R. G. Hodson, and C. V. Sullivan, 1996, Effects of Stocking Density, Salinity, and Light Intensity on Growth and Survival of Southern Flounder *Paralichthys lethostigma* Larvae: *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 27, p. 153-159.
- Dawkins, M. S., 1998, Evolution and animal welfare: *Quarterly Review of Biology*, v. 73, p. 305-328.
- Diana, J. S., H. S. Eгна, T. Chopin, M. S. Peterson, L. Cao, R. Pomeroy, M. Verdegem, W. T. Slack, M. G. Bondad-Reantaso, and F. Cabello, 2013, Responsible Aquaculture in 2050: Valuing Local Conditions and Human Innovations Will Be Key to Success: *BioScience*, v. 63, p. 255-262.
- DiBattista, J. D., H. Anisman, M. Whitehead, and K. M. Gilmour, 2005, The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: *Journal of Experimental Biology*, v. 208, p. 2707-2718.
- Dillon, M. C., M. Dillon, and C. Griffith, 1996, *How to HACCP: An Illustrated Guide*, M.D. Associates.
- Dinis, M. T., L. Ribeiro, F. Soares, and C. Sarasquete, 1999, A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal: *Aquaculture*, v. 176, p. 27-38.
- Dobsikova, R. V. a. F. U. B., Z. V. a. F. U. B. Svobodova, J. V. a. F. U. B. Blahova, H. V. a. F. U. B. Modra, and J. J. U. V. V. U. R. a. H. Velisek, 2009, The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.): *Czech Journal of Animal Science - UZEI (Czech Republic)*.
- Ellis, T., H. Y. Yildiz, J. Lopez-Olmeda, M. T. Spedicato, L. Tort, O. Overli, and C. I. M. Martins, 2012, Cortisol and finfish welfare: *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 163-188.
- FAO, 2014, *The State of World Fisheries and Aquaculture*.
- Farrell, A., S. Tang, M. Nomura, and C. Brauner, 2010, Toward Improved Public Confidence in Farmed Fish: A Canadian Perspective on Fish Welfare during Marine Transport: *Journal of the World Aquaculture Society*.
- Fernández-Segovia, I., A. Pérez-Llácer, B. Peidro, and A. Fuentes, 2014, Implementation of a food safety management system according to ISO 22000 in the food supplement industry: A case study: *Food Control*, v. 43, p. 28-34.
- Fevolden, S. E., K. H. Roed, K. T. Fjalestad, and J. Stien, 1999, Poststress levels of lysozyme and cortisol in adult rainbow trout: heritabilities and genetic correlations: *Journal of Fish Biology*, v. 54, p. 900-910.
- Fisheries policy – European commission 2012.

- Ganzon-Naret, E. S., 2013, Influence of different feeding rates using commercial dry pellets on growth, feed efficiency and survival for hatchery produced sea bass *Lates calcarifer*: *Animal Biology & Animal Husbandry*, v. 5, p. 241-248.
- González, R., J. D. Celada, J. M. Carral, V. García, M. Sáez-Royuela, and Á. González, 2011, Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, *Astacidae*) during the first 6 months: effects of size grading: *Aquaculture Research*, v. 42, p. 1385-1392.
- Gornati, R., E. Papis, S. Rimoldi, G. Terova, M. Saroglia, and G. Bernardini, 2004, Rearing density influences the expression of *stress*-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, *L.*): *Gene*, v. 341, p. 111-118.
- Grigorakis, K., and G. Rigos, 2011, Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture: *Chemosphere*, v. 85, p. 899-919.
- Huntingford, F. A., 2004, Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes: *Journal of Fish Biology*, v. 65, p. 122-142.
- Huntingford, F. A., C. Adams, V. A. Braithwaite, S. Kadri, T. G. Pottinger, P. Sandoe, and J. F. Turnbull, 2006, Current issues in fish welfare: *Journal of Fish Biology*, v. 68, p. 332-372.
- Huntingford, F. A., and S. Kadri, 2014, Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish: *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, v. 33, p. 233-244.
- Håstein, T., 2007, OIE involvement in aquatic animal welfare: the need for development of guidelines based on welfare for farming, transport and slaughter purposes in aquatic animals: *Developments In Biologicals*, v. 129, p. 149-161.
- Ignacio Martín, J. R. G., Juan Antonio Martos-Sitcha, Inmaculada, and C. R. Rasines, Juan Miguel Mancera, Olvido Chereguini, 2014, is it possible to transport *solea senegalensis* specimens without water?, *Aquaculture Europe*, Donostia - San Sebastian, Spain.
- Iguchi, K. i., K. Ogawa, M. Nagae, and F. Ito, 2003, The influence of rearing density on *stress* response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*): *Aquaculture*, v. 220, p. 515-523.
- Imsland, A. K., A. Foss, L. E. C. Conceicao, M. T. Dinis, D. Delbare, E. Schram, A. Kamstra, P. Rema, and P. White, 2003, A review of the culture potential of *Solea solea* and *S-senegalensis*: *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 13, p. 379-407.
- Iversen, M., R. A. Eliassen, and B. Finstad, 2009, Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar L.* transport and transfer to sea: *Aquaculture Research*, v. 40, p. 233-241.
- Kalinowski, C. T., M. S. Izquierdo, D. Schuchardt, and L. E. Robaina, 2007, Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration: *Aquaculture*, v. 272, p. 451-457.
- Kiessling, A., H. van de Vis, G. Flik, and S. Mackenzie, 2012, Welfare of farmed fish in present and future production systems: *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 1-3.
- King, H. R., 2009, 2008 Australian RSPCA Welfare Symposium: 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*, v. 4, p. 163-168.
- Kolarevic, J., G. Baeverfjord, H. Takle, E. Ytteborg, B. K. M. Reiten, S. Nergård, and B. F. Terjesen, 2014, Performance and welfare of Atlantic salmon smolt reared in recirculating or flow through aquaculture systems: *Aquaculture*, v. 432, p. 15-25.

- Kulczykowska, E., and F. J. Sánchez Vázquez, 2010, Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and *stress*: *Aquaculture Research*, v. 41, p. 654-667.
- Lekang, O.-I., 2013, Transport of Live Fish, *Aquaculture Engineering*, John Wiley & Sons, p. 328-338.
- Lemieux, H., J. D. Dutil, H. Guderley, and R. Larocque, 2004, Growth, starvation and enzyme activity in white muscle of Atlantic cod: At what point do muscle metabolic capacities change?: *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, v. 37, p. 287-294.
- Liu, Z., X. Li, L. Fan, H. Lu, L. Liu, and Y. Liu, 2014, Measuring feeding activity of fish in RAS using computer vision: *Aquacultural Engineering*, v. 60, p. 20-27.
- Lopez-Olmeda, J. F., C. Noble, and F. J. Sanchez-Vazquez, 2012, Does feeding time affect fish welfare?: *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 143-152.
- Luo, G., G. Liu, and H.-x. Tan, 2013, Effects of stocking density and food deprivation-related *stress* on the physiology and growth in adult *Scortum barcoo* (Mc Culloch & Waite): *Aquaculture Research*, v. 44, p. 885-894.
- López-Olmeda, J., C. Noble, and F. Sánchez-Vázquez, 2012, Does feeding time affect fish welfare?: *Fish Physiology & Biochemistry*, v. 38, p. 143.
- Machado, M., R. Azeredo, P. Diaz-Rosales, A. Afonso, H. Peres, A. Oliva-Teles, and B. Costas, 2015, Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response: *Fish & Shellfish Immunology*, v. 42, p. 353-362.
- Magnadottir, B., 2006, Innate immunity of fish (overview): *Fish & Shellfish Immunology*, v. 20, p. 137-151.
- Marinho, G., H. Peres, and A. P. Carvalho, 2014, Effect of feeding time on dietary protein utilization and growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): *Aquaculture Research*, v. 45, p. 828-833.
- McEwen, B. S., and J. C. Wingfield, 2003, The concept of allostasis in biology and biomedicine: *Hormones and Behavior*, v. 43, p. 2-15.
- Menezes, C., I. Ruiz-Jarabo, J. A. Martos-Sitcha, C. Toni, J. Salbego, A. Becker, V. L. Loro, G. Martínez-Rodríguez, J. M. Mancera, and B. Baldisserotto, 2015, The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): A metabolic and endocrine approach: *Aquaculture*, v. 435, p. 257-264.
- Mesquita, F. O., 2011, Coping styles and learning in fish: developing behavioural tools for welfare-friendly aquaculture.
- Miget, R. J., 2004, HACCP seafood program and aquaculture.
- Montero, D., L. Tort, L. Robaina, J. M. Vergara, and M. S. Izquierdo, 2001, Low vitamin E in diet reduces *stress* resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: *Fish & Shellfish Immunology*, v. 11, p. 473-490.
- Mustapha, M. K., 2014, Aquaculture and Fish Welfare: Are the Rights of Fish Compromised?/ Akwakultura I Dobrostan Ryb: Czy Prawa Ryb Są Szanowane?: *Zoologica Poloniae*, v. 59, p. 49.
- Nilsson, J., and T. Torgersen, 2010, Exploration and learning of demand-feeding in Atlantic cod (*Gadus morhua*): *Aquaculture*, v. 306, p. 384-387.
- Overli, O., S. Winberg, and T. G. Pottinger, 2005, Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for *stress* responsiveness in rainbow trout - a review: *Integrative and Comparative Biology*, v. 45, p. 463-474.
- Overton, J. L., S. J. Steinfeldt, and P. B. Pedersen, 2010, The effects of grading on the growth and survival of juvenile Dover sole (*Solea solea* L.): *Aquaculture Research*, v. 42, p. 31-39.

- Pavlidis, M., N. Papandroulakis, and P. Divanach, 2006, A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: Preliminary results for coloration pattern of red skin *Sparidae*: *Aquaculture*, v. 258, p. 211-219.
- Petrović, S., L. Bavčević, Z. Pasarić, and A. Mihovilović, 2011, Effects of successive size grading on the growth of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) at three temperatures: *Aquaculture Research*, v. 42, p. 277-287.
- Pirhonen, J., C. B. Schreck, P. W. Reno, and H. Ogut, 2003, Effect of fasting on feed intake, growth and mortality of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, during an induced *Aeromonas salmonicida* epizootic: *Aquaculture*, v. 216, p. 31-38.
- Poli, B. M., G. Parisi, F. Scappini, and G. Zampacavallo, 2005, Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management: *Aquaculture International*, v. 13, p. 29-49.
- Pottinger, T. G., 2010, A multivariate comparison of the *stress* response in three salmonid and three cyprinid species: evidence for inter-family differences: *Journal of Fish Biology*, v. 76, p. 601-621.
- Pottinger, T. G., T. A. Moran, and J. A. W. Morgan, 1994, Primary And Secondary Indexes Of *Stress* In The Progeny Of Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) Selected For High And Low Responsiveness To *Stress*: *Journal of Fish Biology*, v. 44, p. 149-163.
- Pottinger, T. G., and A. D. Pickering, 1992, the influence of social-interaction on the acclimation of rainbow-trout, *oncorhynchus-mykiss* (walbaum) to chronic *stress*: *Journal of Fish Biology*, v. 41, p. 435-447.
- Pottinger, T. G., A. D. Pickering, and M. A. Hurley, 1992, consistency in the *stress* response of individuals of 2 strains of rainbow-trout, *oncorhynchus-mykiss*: *Aquaculture*, v. 103, p. 275-289.
- Psomas, E. L., and D. P. Kafetzopoulos, 2015, HACCP effectiveness between ISO 22000 certified and non-certified dairy companies: *Food Control*, v. 53, p. 134-139.
- Qu, Y., X. Li, Y. Yu, M. Vandeppeer, P. Babidge, S. Clarke, K. Bott, and H. Li, 2009, effect of different grading equipment on *stress* levels assessed by catecholamine measurements in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): *Aquacultural engineering*.
- Rauta, P. R., B. Nayak, and S. Das, 2012, Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms: *Immunology Letters*, v. 148, p. 23-33.
- Ribas, L., J. V. Planas, B. Barton, C. Monetti, G. Bernadini, A. Saroglia, L. Tort, and S. MacKenzie, 2004, A differentially expressed enolase gene isolated from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under high-density conditions is up-regulated in brain after in vivo lipopolysaccharide challenge: *Aquaculture*, v. 241, p. 195-206.
- Richard, R., and L. Flemming, 2007, Fin condition and growth among rainbow trout reared at different sizes, densities and feeding frequencies in high-temperature recirculated water: *Aquaculture International*, v. 15, p. 97-107.
- Rios, F. S., A. L. Kalinin, and F. T. Rantin, 2002, The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*: *Journal of Fish Biology*, v. 61, p. 85-95.
- Saillant, E., A. Fostier, P. Haffray, B. Menu, S. Laureau, J. Thimonier, and B. Chatain, 2003, Effects of rearing density, size grading and parental factors on sex ratios of the sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) in intensive aquaculture: *Aquaculture*, v. 221, p. 183-206.

- Salas-Leiton, E., V. Anguis, M. Manchado, and J. P. Canavate, 2008, Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities: *Aquaculture*, v. 285, p. 84-89.
- Salas-Leiton, E., V. Anguis, A. Rodríguez-Rua, and J. P. Canavate, 2010, Stocking homogeneous size groups does not improve growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles: Individual growth related to fish size: *Aquacultural Engineering*, v. 43, p. 108-113.
- Salas-Leiton, E., V. Anguís, A. Rodríguez-Rua, and J. P. Cañavate, 2011, High stocking density and food restriction have minimum impact on size dispersal of cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles. Evidence for individual growth being regulated by population structure: *Aquacultural Engineering*, v. 45, p. 43-50.
- Sant'Anna, V., P. D. Gurak, L. D. Ferreira Marczak, and I. C. Tessaro, 2013, Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review: *Dyes and Pigments*, v. 98, p. 601-608.
- Schreck, C. B., 2010, *Stress* and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis: *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, p. 549-556.
- Schreck, C. B., W. Contreras-Sanchez, and M. S. Fitzpatrick, 2001, Effects of *stress* on fish reproduction, gamete quality, and progeny: *Aquaculture*, v. 197, p. 3-24.
- Segner, H., H. Sundh, K. Buchmann, J. Douxfils, K. S. Sundell, C. Mathieu, N. Ruane, F. Jutfelt, H. Toften, and L. Vaughan, 2012, Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator: *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 85-105.
- Slavík, O., M. Pešta, and P. Horký, 2011, Effect of grading on energy consumption in European catfish *Silurus glanis*: *Aquaculture*, v. 313, p. 73-78.
- Summerfelt, S. T., A. Zühlke, J. Kolarevic, B. K. M. Reiten, R. Selset, X. Gutierrez, and B. F. Terjesen, 2015, Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors: *Aquacultural Engineering*, v. 65, p. 46-54.
- Szisch, V., A. L. van der Salm, S. E. W. Bonga, and M. Pavlidis, 2002, Physiological colour changes in the red porgy, *Pagrus pagrus*, following adaptation to blue lighting spectrum: *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 27, p. 1-8.
- Sánchez, P., P. P. Ambrosio, and R. Flos, 2010, Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): *Aquaculture*, v. 300, p. 93-101.
- Sánchez, P., P. P. Ambrosio, and R. Flos, 2013, Stocking density affects Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) growth independently of size dispersion, evaluated using an individual photo-identification technique: *Aquaculture Research*, v. 44, p. 231-241.
- Tacchi, L., L. Lowrey, R. Musharrafieh, K. Crossey, E. T. Larragoite, and I. Salinas, 2015, Effects of transportation *stress* and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): *Aquaculture*, v. 435, p. 120-127.
- Tang, S., C. J. Brauner, and A. P. Farrell, 2009, Using bulk oxygen uptake to assess the welfare of adult Atlantic salmon, *Salmo salar*, during commercial live-haul transport: *Aquaculture*, v. 286, p. 318-323.
- Torgersen, T., M. B. M. Bracke, and T. S. Kristiansen, 2011, Reply to Diggles *et al.* (2011): Ecology and welfare of aquatic animals in wild capture fisheries: *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 21, p. 767-769.

- Trejchel, K., D. Żarski, K. Palińska-Żarska, S. Krejszeff, B. Dryl, K. Dakowski, and D. Kucharczyk, 2014, Determination of the optimal feeding rate and light regime conditions in juvenile burbot, *Lota lota* (L.), under intensive aquaculture: Aquaculture international.
- Turnbull, J., A. Bell, C. Adams, J. Bron, and F. Huntingford, 2005, Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis: Aquaculture.
- Turnbull, J. F., and F. A. Huntingford, 2012, welfare and aquaculture: where benefish fits in: Aquaculture Economics & Management (Taylor & Francis), v. 16, p. 433.
- United, S., O. National, A. Atmospheric, P. Virginia Sea Grant College, and M. L. Jahncke, 2002, Application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) principles as a risk management tool to control viral pathogens at shrimp aquaculture facilities / HACCP in shrimp facilities / Principles as a risk management tool to control viral pathogens at shrimp aquaculture facilities.
- van de Nieuwegiessen, P. G., J. Olwo, S. Khong, J. A. J. Verreth, and J. W. Schrama, 2009, Effects of age and stocking density on the welfare of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell: Aquaculture, v. 288, p. 69-75.
- van de Vis, J. W., M. Poelman, E. Lambooi, M. L. Begout, and M. Pilarczyk, 2012, Fish welfare assurance system: initial steps to set up an effective tool to safeguard and monitor farmed fish welfare at a company level: Fish Physiology and Biochemistry, v. 38, p. 243-257.
- Van der Salm, A. L., M. Martinez, G. Flik, and S. E. W. Bonga, 2004, Effects of husbandry conditions on the skin colour and *stress* response of red porgy, *Pagrus pagrus*: Aquaculture, v. 241, p. 371-386.
- Veissier, I., A. Butterworth, B. Bock, and E. Roe, 2008, European approaches to ensure good animal welfare: Applied Animal Behaviour Science, v. 113, p. 279-297.
- Villanueva, R. R., M. E. Araneda, M. Vela, and J. C. Seijo, 2013, Selecting stocking density in different climatic seasons: A decision theory approach to intensive aquaculture: Aquaculture, v. 384-387, p. 25-34.
- Wunderink, Y. S., S. Engels, S. Halm, M. Yúfera, G. Martínez-Rodríguez, G. Flik, P. H. M. Klaren, and J. M. Mancera, 2011, Chronic and acute *stress* responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The involvement of cortisol, CRH and CRH-BP: General and Comparative Endocrinology, v. 171, p. 203-210.
- Zhang, S.-Y., G. Li, H.-B. Wu, X.-G. Liu, Y.-H. Yao, L. Tao, and H. Liu, 2011, An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production: Aquacultural Engineering, v. 45, p. 93-102.
- Zhu, L. Y., L. Nie, G. Zhu, L. X. Xiang, and J. Z. Shao, 2013, Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts: Developmental and Comparative Immunology, v. 39, p. 39-62.

Anexos

Tabela I – Ficha de autocontrolo do abate

FWAS - Fish Welfare Assurance System						
Data	Lote	Tanque	Limites		OK / NOK	Operador
			Gelo	260kg		
			Peixe	350kg		
			Água	80 l		
			Temp. Int.	<4°		

Tabela II – Ficha de autocontrolo do tempo de exposição ao ar

FWAS - Fish Welfare Assurance System				
Dia	Tipo de Operação	Tempo Peixe fora de água		Operador
		Limite	OK / NOK	
		<150g – 5 min		
		>150g – 8 min		

Tabela III – Ficha de autocontrolo das operações realizadas na empresa

FWAS - Fish Welfare Assurance System					
Data					
Tipo de Operação					
Duração					
Tanques afetados					
Operador					

Tabela IV – Folha de autocontrolo da qualidade da água (parte 1)

Data	MOD	Temperatura		Data	MOD	Amónia NH ₃	
		Limites	OK/NOK			Limites	OK/NOK
		18° < Temp. < 22°				0,75 mg/l	

Tabela V – Folha de autocontrolo da qualidade da água (parte 2)

Data	MOD	Nitritos NO ²⁻		Data	MOD	Bromo		Operador
		Limites	OK/NOK			Limites	OK/NOK	
		1,5 mg/l				1,08 mg/l		

Tabela VI – Folha de autocontrolo para as visitas

FWAS - Fish Welfare Assurance System				
Dia	Hora	Nº de Visitantes	Tanques afetados	Operador

Tabela VII – Folha de autocontrolo para a necropsia

FWAS - Fish Welfare Assurance System												
Dia	Lote	MOD	Sinais Externos						Sinais Internos			Operador
			OK/NOK	OK/NOK	OK/NOK	OK/NOK	OK/NOK	OK/NOK	OK/NOK	OK/NOK		
			34	39	40	1	21	26				
			34	39	40	1	21	26				
			34	39	40	1	21	26				

Tabela VIII – Folha de autocontrolo para a qualidade da ração.

FWAS - Fish Welfare Assurance System			
Data:		Lote:	
<i>Resultados das análises externas à composição química</i>			OK / NOK
		<i>Avaliar a qualidade física da ração</i>	
		Flutuabilidade	Presença de Finos
		OK / NOK	OK / NOK
Operador			

Tabela IX – Folha de autocontrolo do fator de atividade geral

FWAS - Fish Welfare Assurance System				
Data	Tanque	Fator de Atividade Geral		Operador
		Limite	OK / NOK	
		40%		

Tabela X – Folha de autocontrolo do transporte

FWAS - Fish Welfare Assurance System							
Data:							
Transporte:				Receção:			
Cuba	Lote	Oxigénio		Temperatura		Amónia	
		Limites	OK/NOK	Limites	OK/NOK	Limites	OK/NOK
1		>100		Δ3		< 3 mg/l	
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							