



Formulação de uma dieta adequada à produção de Garra rufa (Heckel, 1843) e avaliação da sua performance zootécnica.

Mafalda Maximino Rojão Sobreiro Catarino

2015



Formulação de uma dieta adequada à produção de Garra rufa (Heckel, 1843) e avaliação da sua performance zootécnica.

Mafalda Maximino Rojão Sobreiro Catarino

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizado sob a orientação da Doutora Sílvia Gonçalves e co-orientação da Doutora Susana Ferreira

2015

Título: Formulação de uma dieta adequada à produção de *Garra rufa* (Heckel, 1843) e avaliação da sua performance zootécnica.

Copyright © Mafalda Maximino Rojão Sobreiro Catarino
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2015

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 esta dissertação 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.

Este trabalho contém informação que não pode ser revelada, já que se encontra sob registo de uma patente. Como tal pede-se aos leitores deste documento que tenham esta informação em consideração. Ao estar em sigilo profissional, a autora do trabalho não pode comentar ou revelar determinados aspetos ou informações que possam colocar em causa o registo da patente.

Produção científica no âmbito deste trabalho de investigação

Posters apresentados

2015 |

- (01) **Catarino MMRS**, Gomes MRS, Gonçalves SC, Ferreira SMF (2015). Estimation of the ideal dosage and feeding frequency for *Garra rufa* (Cyprinidae). XV European Congress of Ichthyology 2015, Porto, 7 a 11 de setembro de 2015.
- (02) Gomes MRS, **Catarino MMRS**, Gonçalves SC, Ferreira SMF (2015). Insights on the Reproduction and Embryonic Development of *Garra rufa* (Cyprinidae). XV European Congress of Ichthyology 2015, Porto, 7 a 11 de setembro de 2015.
- (03) Ferreira SMF, Gomes MRS, **Catarino MMRS**, Afonso IAF, Simões, CBCL, Gonçalves SC (2015). Utilização do anestésico MS-222 em peixes ciprinídeos *Garra rufa* (Heckel, 1843). First Iberian Congress of Aquaculture (and Aquaculture XV Spanish Congress), Huelva (Espanha), 13 a 16 de outubro de 2015.

Comunicações orais

2015 |

Ferreira SMF, Gomes MRS, **Catarino MMRS**, Afonso IAF, Simões, CBCL, Gonçalves SC (2015). The use of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic in Cyprinid fish *Garra rufa* (Heckel, 1843) Aquaculture Europe 2015 – the annual meeting of the European Aquaculture Society, Roterdão (Países Baixos), 20 a 23 de outubro de 2015.

Publicações em atas de congressos internacionais com arbitragem científica

2015 |

(01) **Mafalda M. R. S. Catarino**, Mónica R. S. Gomes, Sílvia C. Gonçalves, Susana M. F. Ferreira (2015). Estimation of the ideal dosage and feeding frequency for *Garra rufa* (Cyprinidae). *Frontiers in Marine Science*. Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology 2015. doi:10.3389/conf.FMARS.2015.03.00076.

(02) Mónica R. S. Gomes, **Mafalda M. R. S. Catarino**, Sílvia C. Gonçalves, Susana M. F. Ferreira (2015). Insights on the Reproduction and Embryonic Development of *Garra rufa* (Cyprinidae). *Frontiers in Marine Science*. Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology 2015. Doi: 10.3389/conf.fmars.2015.03.0085.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado às pessoas que permitiram a concretização desta dissertação, no âmbito do mestrado em Aquacultura.

O meu agradecimento ao projeto SpaGaRufa, Bolsa de Ignicao INOV C, co-financiada pelo Programa Operacional da Regiao Centro (mais CENTRO), 7o Quadro de Referencia Estrategica Nacional (QREN 2007-2013) e Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

Ao médico veterinário Fábio Correia, CREFAR- Representações, Lda (Lisboa, Portugal), pela disponibilidade do produto ANIMA-STRATH® desenvolvido pela companhia Bio-Strath AG.

Ao senhor José Couto de Aquários & Aquários (Gulpilhares, Portugal) pela disponibilização da ração Sparos.

E agora, sem dúvida, às pessoas mais importantes, que sem elas nada seria possível:

À Professora Doutora Sílvia Gonçalves: Muito Obrigada! Sem si, não seria possível ter terminado esta etapa. Obrigada pela sua disponibilidade, ajuda incondicional e por todo o apoio que me deu durante esta fase. Fui uma grande *Patella vulgata* (Linnaeus, 1758) ☺ e nunca me renegou ajuda e teve sempre incondicionalmente presente. Um grande bem-haja!

À Professora Doutora Susana Ferreira: Muito Obrigada! Por toda a ajuda incondicional mesmo em horas tardias, por todos os conselhos, a nível profissional como pessoal, por ter criado a oportunidade de eu integrar a equipa maravilha! ☺

À minha jeitosa, Marcela França, por todo o companheirismo ao longo deste ano, toda a cumplicidade e lealdade que tiveste comigo. Foste das melhores pessoas que me puderam aparecer na vida, e tu sabes disso. Por todas as vezes que me ajudaste a cuidar dos meus meninos, quando por algum motivo sério, não podia estar presente. E até continuava, se já me tivesses entregue o teu discurso do meu aniversário ☺

À minha companheira, Carmen Pedro, embora digas que não me ajudaste nada de jeito, estás muito enganada. Contigo aprendi inúmeras coisas, já que tens uma sabedoria incrível e quando for grande quero ser como tu! És a minha ídola. Muito obrigada por todo o companheirismo, todos os conselhos, por todo o apoio incondicional. Embora tenha sido muito Patellazinha, sabes que te adoro (demasiado piroso para nós, mas é a verdade e estou no sítio correto para tal).

À Mónica e À Sandra, muito obrigada por tudo. Nem sempre foi fácil, nem sempre será, mas já lá vão 7 anos e sem os nossos momentos, não seria possível. Venham mais! Obrigada por tudo, seja a nível pessoal como profissional. (Não faria sentido ser em separado, se somos o trio maravilha ☺)
“É por acaso que as pessoas aparecem em nossas vidas, mas não é por acaso que elas permanecem.”

Um obrigada a todas as pessoas, que diretamente ou indiretamente, tornaram isto possível. Um obrigada especial por tudo – Ao melhor amigo (Fábio Castro) e à minha Pipa, à Raquel e ao Rodas, à Dani e ao Buja, à Inês Pedro, à Suzete, à Sílvia, ao Trio Nina porque nunca falharam com a minha família, à Lena e família, à Paula e ao Carrilho, à Cristina e à família do Miguel um obrigada gigante!

Aos Padrinhos do coração: Titi, Tio Paulo e Tia Cristina, não há palavras para descrever. Obrigada por tudo! “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” - Fernando Pessoa.

A ti Pai, Obrigada pela pessoa que foste. Sabes que continuarei aqui incondicionalmente.

Aos meus 4 avós, obrigada por tudo! Celeste & Carlos, eternamente grata por tudo. Eu sei que estão sempre a torcer por mim. Amor gigante. Graça & Catarino, sem vocês não seria - literalmente - possível. Nem sempre sou fácil, mas o meu amor por vós é incondicional. E a minha gratidão eterna.

Miguel, Obrigada por tudo meu bem. “Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?” – Fernando Pessoa.

À minha mãe e ao meu mano, agradeço-vos por tudo. Estarei sempre aqui e espero, um dia, conseguir retribuir tudo o que já fizeram por mim. São a minha força. *Carpe diem* é o nosso lema.

“Eu sei que não sou nada e que talvez nunca tenha tudo. À parte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

Resumo

Os peixes *Garra rufa* (ciprinídeos) são muito utilizados em tratamentos de pele em institutos de beleza e spas. Esta espécie de água doce é nativa da Eurásia e tem uma grande área de distribuição, incluindo as bacias hidrográficas na Turquia e Irão. Com a procura crescente pela prática de ictioterapia, o valor comercial desta espécie tem vindo a aumentar, despertando um grande interesse por parte dos aquacultores, apesar dos métodos de produção serem ainda desconhecidos. Deste modo, é de grande importância a investigação de diversos aspetos da produção desta espécie tais como, frequência de alimentação e uma dose diária adequada que sustente um crescimento rápido e saudável destes peixes. Os objetivos deste trabalho foram formular uma ração adequada a um crescimento eficiente da espécie *Garra rufa* em condições de cultivo intensivo e que possa eventualmente constituir uma alternativa vantajosa relativamente às rações comerciais disponíveis para peixes ornamentais. Pretendeu-se também: (i) estimar a dose *ad libitum* e a frequência ideal de alimentação para os peixes *Garra rufa*; (ii) avaliar o crescimento e a mortalidade dos peixes em cada tratamento e (iii) analisar a performance zootécnica dos peixes que foram submetidos às várias dietas em teste.

Inicialmente foi realizado um primeiro ensaio para estimar a dose *ad libitum* e a frequência ideal desta espécie para uma determinada classe de tamanho. Posteriormente, foi formulada a ração e decorreu o ensaio de crescimento respetivo. No final, foram avaliados a sobrevivência e o crescimento, este último através da análise de vários parâmetros zootécnicos, e efetuadas observações da anatomia interna e do estado geral dos peixes. Os resultados obtidos foram posteriormente analisados, e comparados estatisticamente com recurso ao procedimento ANOVA com um fator (ANOVA de uma via, com o nível de significância $\alpha = 0,05$).

Em conclusão, a dose *ad libitum* determinada foi de $0,04 \text{ g.dia}^{-1}$ por peixe, o que corresponde a 3,2% do peso corporal dos peixes da classe de tamanho testada (peso médio $1,2500 \text{ g} \pm 0,017$; comprimento médio $5,0 \text{ cm} \pm 0,025$), enquanto a frequência ideal da alimentação foi de três vezes ao dia. No ensaio de crescimento para testar a ração formulada, nos três tratamentos os peixes apresentaram um crescimento positivo, tanto no peso como no comprimento, concluindo-se que a dieta A foi a menos favorável, enquanto a dieta B foi a melhor, tendo apresentado os melhores resultados quer a nível de crescimento, parâmetros

zootécnicos e através das observações percentuais da anatomia interna e do estado geral dos peixes.

Palavras-chave: *Garra rufa*, ração ideal, frequência ideal, dose *ad libitum*, crescimento.

Abstract

The fish *Garra rufa* (cyprinids) are widely used in skin treatments in beauty institutes or physical wellness institutes. This freshwater species is native from Eurasia and has a large distribution area, including the river basins in Turkey and Iran. It has a high commercial value (practice of fish therapy), and arouse large interest from fish farmers, despite of their methods of production are still unknown. It has a high commercial value, and arouse large interest from fish farmers, despite of their methods of production are still unknown. In fact, aspects like an adequate feeding frequency and an adequate daily dose that sustains a rapid and healthy growth of these fish, needs investigation. The present experimental procedure aimed to formulate an optimal feed for the growth of these fish for intensive production in Aquaculture and that may possibly be an advantageous alternative in relation to commercial diets available for ornamental fish. It was also intended: (i) to establish the optimal daily dose of feed until satiety and to establish the optimal frequency of feeding for *G. rufa*; (ii) to evaluate the growth and fish mortality in each treatment and (iii) to analyze the zootechnical performance of the fish that have been subjected to different diets.

Initially, experimental essays to establish the optimal daily dose of feed until satiety and the optimal frequency of feeding for *G. rufa* (with similar body weight and similar length) were performed. Subsequently, the feed was formulated and a growth assay, comparing the performance of three distinct diets, was carried out. At the end, the survival and growth were evaluated, the latter through the analysis of various zootechnical performance parameters, and observations of the internal anatomy and condition of the fish were made. The results obtained were subsequently analyzed and compared statistically using the ANOVA procedure with one factor (one way ANOVA, with the significance level $\alpha = 0.05$).

In conclusion, the optimal daily dose of 0.04 g.day^{-1} fish was found, which corresponds to 3.2% of fish body weight of the tested size range (average weight $1.2500 \text{ g} \pm 0.017$; length medium $5.0 \text{ cm} \pm 0.025$) and the 3 daily feeding moments revealed to promote a higher growth. In the growth essay to test the formulated feed, the fish showed positive growth in the three treatments, both in weight and length, but the diet A revealed to be less favourable, while diet B was the best. As a whole, the formulated diet (B) presented, in

general, the best results, both at the level of growth performance parameters and at the internal anatomy and general state of the fish observations.

Keywords: *Garra rufa*, optimal feed, frequency of feeding, optimum daily dose, growth.

Índice de Matérias

Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice de figuras	xvii
Índice de tabelas	xix
Índice de abreviaturas, siglas e símbolos	xxi
1. Introdução	1
1.1 Aquacultura: uma fonte de alimento	3
1.2 Aquacultura ornamental	4
1.3 Ictioterapia	5
1.4 O peixe <i>Garra rufa</i> – Caracterização da espécie	6
1.5 Nutrição de peixes ornamentais	8
1.6 Objetivos	13
2. Materiais & Métodos	15
2.1 Determinação da dosagem ideal de ração para obtenção de <i>ad libitum</i> .	17
2.1.1 Desenho experimental	17
2.1.2 Aclimação	18
2.1.3 Determinação da dose <i>ad libitum</i>	19
2.1.4 Determinação da frequência ideal	19
2.2 Verificação da ração formulada: uma boa alternativa?	20
2.2.1 Formulação da ração	20
2.2.2 Desenho experimental	22

2.2.3	Aclimação	22
2.2.4	Ensaio de crescimento	24
2.2.5	Parâmetros zootécnicos	24
2.3	Análise estatística	27
3.	Resultados	29
3.1	Dosagem ideal de ração para obtenção de <i>ad libitum</i>	31
3.1.1	Determinação da dose <i>ad libitum</i>	31
3.1.2	Determinação da frequência ideal	31
3.2	Verificação da ração formulada: uma boa alternativa?	33
3.2.1	Composição teórica aproximada das dietas testadas	33
3.2.2	Sobrevivência e parâmetros de crescimento	33
3.2.3	Parâmetros zootécnicos	38
4.	Discussão	43
4.1	Determinação da dosagem ideal de ração para obtenção de <i>ad libitum</i> .	44
4.2	Verificação da ração formulada: uma boa alternativa?	45
5.	Conclusão	53
6.	Perspetivas Futuras	55
7.	Referências Bibliográficas	57
8.	Anexos	63

Índice de Figuras

Fig. 1 Distribuição geográfica de <i>Garra rufa</i> (Fishbase, 2015).	6
Fig. 2 <i>Garra rufa</i> (Ferreira, 2014).	7
Fig. 3 Desenho experimental do sistema.	18
Fig. 4 Esquema representativo do ensaio.	20
Fig. 5 Seringas usadas na criação da ração e o respetivo sistema de corte.	21
Fig. 6 Sistema usado na determinação da ração ideal.	22
Fig. 7 Vesícula biliar de <i>Garra rufa</i> .	26
Fig. 8 <i>Garra rufa</i> anestesiado com dose letal.	27
Fig. 9 Variação média dos parâmetros de crescimento de <i>G. rufa</i> sujeitos a diferentes frequências de alimentação diárias, obtidos após 1 mês de ensaio. a - Variação média de peso; b – Variação média do comprimento à furca; c – Variação média do comprimento total. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via; $p < 0,05$).	32
Fig. 10 Média dos parâmetros de crescimento de <i>G. rufa</i> sujeitos a três tratamentos diferentes (dieta controlo, dieta A e dieta B), ao longo de todo o ensaio. a - Média de peso para cada tratamento; b – Média do comprimento à furca para cada tratamento; c – Média do comprimento total para cada tratamento. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.	34
Fig. 11 Variação média dos parâmetros de crescimento de <i>G. rufa</i> sujeitos a três tratamentos diferentes (dieta controlo, dieta A e dieta B), obtidos após 2 meses de ensaio. a - Variação média de peso; b – Variação média do comprimento à furca; c – Variação média do comprimento total. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via; $p < 0,05$).	36
Fig. 12 Variação média dos índices SGR, AGR, DGI e K para três tratamentos diferentes (dieta controlo, dieta A e dieta B), obtidos no final do ensaio. a – Taxa de crescimento específico (SGR); b- Taxa de crescimento absoluto (AGR); c- Índice de crescimento diário (DGI); d- Índice de condição (K). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via; $p < 0,05$).	39

Índice de Tabelas

Tabela I Parâmetros médios para cada sistema.	23
Tabela II Valores teóricos aproximados da constituição em macromoléculas das dietas testadas.	33
Tabela III Resultados da ANOVA de uma via e dos testes post-hoc para as variáveis dependentes variação de peso, variação do comprimento à furca e variação do comprimento total. Apenas as variáveis que mostraram resultados significativos se encontram representadas ($p < 0,05$), df - graus de liberdade, MS - Média dos quadrados.	37
Tabela IV Parâmetros zootécnicos para cada tratamento (dieta controlo, dieta A e dieta B), com respetiva média e erro padrão, obtidos após o término do ensaio.	40
Tabela V Resultados da ANOVA de uma via e dos testes post-hoc para as variáveis dependentes de SGR, DGI, AGR, K, peso da vesícula e comprimento da vesícula. Apenas as variáveis que mostraram resultados significativos se encontram representadas ($p < 0,05$), df - graus de liberdade, MS - Média dos quadrados.	41
Tabela V Observações percentuais da anatomia interna e do estado geral dos 21 peixes por tratamento (dieta controlo, dieta A e dieta B), 7 peixes por réplica que foram abertos no final do ensaio.	42

Índice de Abreviaturas, siglas e símbolos

FAO – Organização para a Alimentação e Agricultura

SGR – Taxa de crescimento específico

DGI – Índice de crescimento diário

AGR – Taxa de crescimento absoluto

K – Índice de condição

FCR – Taxa de conversão alimentar

IH – Índice hepatossomático

ED – Energia digerível

PB – Proteína bruta

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

1. Introdução

1.1 Aquacultura: uma fonte de alimento

Desde os tempos mais longínquos da História da Humanidade que o ser Humano condiciona a sua vida à procura de alimento; com o aumento exponencial da população, a nível mundial, os recursos alimentares vão ficando cada vez mais reduzidos, levando à necessidade de procurar e desenvolver novas metodologias na produção de alimentos. O surgimento da prática desta atividade veio ajudar a combater as necessidades alimentares básicas, ou seja, a incrementar a produção de alimentos que respondam ao aumento da população humana e, desse modo, diminuir a pressão sobre os recursos naturais (Orvay, 1993; Mestre, 2008). Esta atividade tem especial importância, visto que apesar da aquacultura e as pescas serem atividades competitivas, podem complementar-se, permitindo e ajudando à restauração progressiva da riqueza pesqueira, contribuindo, portanto para a proteção e manutenção dos recursos marinhos.

Desde 1980 que a prática desta atividade aumentou 14 vezes de dimensão, sendo que em 2012, a sua produção mundial rondou as 66 milhões de toneladas, ultrapassando pela primeira vez na história, a produção de carne de vaca. Curiosamente, Henriques (1998), estimou que em 2025 a aquacultura teria de produzir 62 milhões de toneladas de alimento para conseguir suportar o aumento populacional, número esse ultrapassado em 2012, concluindo-se, desse modo, sobre a importância e o desenvolvimento exponencial da aquacultura e da sua contribuição muito significativa para os *stocks* alimentares. Prevê-se que nos próximos 20 anos, e devido ao crescimento demográfico, haja um aumento dos rendimentos (e aumento da credibilidade) por parte desta atividade, e um aumento de produção na ordem dos 35% (Bourne, 2014).

A aquacultura consiste portanto na produção de proteína de origem animal para consumo humano aumentando a quantidade de alimento disponível e convertendo alimento de baixo valor económico num outro de valor mais elevado, tais como, peixes, moluscos, crustáceos e algas (Landau, 1992; Henriques, 1998). Trata-se de uma atividade muito diversificada, que abrange uma vasta gama de espécies e práticas de produção, em águas doces, salobras e salgadas (Neto, 2011).

1.2 Aquacultura ornamental

A aquacultura ornamental, é uma área específica de Aquacultura que se define pela produção e manutenção de animais aquáticos em aquários, incluindo peixes, invertebrados como corais, crustáceos (por exemplo, caranguejos e camarões), moluscos (por exemplo, caracóis e vieiras), tornando-se dos *hobbies* mais populares a nível mundial e tendo sido classificado, em 2011, como o 2º maior *hobby* no mundo a seguir à Fotografia (Livengood & Chapman, 2007; Roberts, 2010; Mohanta & Subramanian, 2011).

Apesar de ter surgido pela primeira vez na China numa data a.C. com a espécie *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), a indústria da aquacultura ornamental tem vindo a desenvolver-se bastante nos últimos anos. Esta indústria movimenta mais de 300 milhões de dólares anualmente, e constitui um mercado em ascensão que influencia cada vez mais pessoas a apostar neste sector (Pelicice & Agostinho, 2005; Livengood & Chapman, 2007).

A consciencialização de que algumas espécies são mais valiosas como ornamentais do que como fonte de alimento, foi determinante para o grande desenvolvimento do mercado associado aos peixes ornamentais. Em Singapura, 40% das exportações são de peixes ornamentais enquanto nos Estados Unidos da América (EUA), apesar da produção destes peixes só representar 7% da produção aquícola nacional, representa já o quarto maior sector, após a venda de bagre, truta e salmão, com um aumento exponencial de vendas (Tlusty, 2002). Nos EUA, a produção de peixes ornamentais, duplicou entre 1985 e 1997, o que evidencia o aumento de interesse por esta prática, sendo a Flórida responsável por produzir 80% do valor total da produção ornamental (Tlusty, 2002).

Como referido anteriormente, este sector está em grande crescimento, gerando cerca de 800 milhões a 30 biliões de dólares por ano (Tlusty, 2002; Saxby *et al.*, 2010). Contudo, o número de espécies ornamentais cultivadas ainda é limitado, rondando anualmente as 2000 espécies comercializadas (Livengood & Chapman, 2007). Os peixes de ambiente marinho são muito mais caros e difíceis de obter, visto que a sua monitorização, em aquário, é mais complexa e menos avançada (Tlusty, 2002; Livengood & Chapman, 2007; Mohanta & Subramanian, 2011). Assim, a maioria das espécies ornamentais atualmente produzidas são de água doce, verificando-se ainda que, dos cerca de 350 milhões de peixes comercializados por ano, 80-90% são de água doce (Tlusty, 2002; Saxby *et al.*, 2010; Mohanta &

Subramanian, 2011). A União Europeia é um dos principais compradores mundiais de peixes ornamentais, principalmente países como: Grã-Bretanha, Alemanha, França, Itália, Espanha, República Checa e Holanda. No entanto, os EUA são o maior importador destes peixes no mundo (Livengood & Chapman, 2007). Mas os maiores produtores são considerados os países asiáticos, tais como: Singapura, China, Indonésia, Malásia, Coreia, Japão, Sri Lanka, Israel e Bangladesh. Atualmente, também a Austrália começa a ser um país forte, como produtor, no mercado ornamental (Mohanta & Subramanian, 2011). Um dos interesses que motivam o cultivo de espécies ornamentais e que contribuem para o aumento da sua produção e importação é a utilização de alguns destes animais para a prática de ictioterapia, o que tem vindo a crescer gradualmente ao longo do tempo.

1.3 Ictioterapia

Ictioterapia, ou terapia com peixes, é um método alternativo bioterapêutico, com origem nas águas mornas da Turquia, onde os peixes são usados pelos habitantes locais para renovar a pele e aliviar os sintomas de variadas patologias de pele como eczema e psoríase. Este tipo de terapia encontra-se em desenvolvimento, apresentando cada vez mais uma procura crescente.

A Turquia é um país com grande potencial para esta prática sendo muito rico em fontes termais. Contudo, apenas 6% são usadas para fins turísticos, em que das 40 000 de oferta turística, apenas 15 000 são classificadas como instalações credenciadas. Embora o número seja reduzido e apesar de os recursos serem limitados, a procura excede anualmente os 10 000 clientes (Sayili *et al.*, 2007). Este tipo de turismo tem crescido bastante a nível mundial, uma vez que a procura de locais com grande reputação sobre a prática de ictioterapia aumentou. Deste modo, a ictioterapia tem ganho cada vez mais importância e a procura desta atividade tem inclusive aumentado significativamente em países como Japão, Croácia, Holanda, Malásia, Singapura, Coreia e China (Baeck *et al.*, 2009).

Normalmente, as espécies de peixes usadas para este fim são *Cyprinion macrostomus* (Heckel, 1843) e *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Sayili *et al.*, 2007; Baeck *et al.*, 2009; Majtán *et al.*, 2012). Ambos pertencem à família Cyprinidae (família das carpas) alimentando-se de zooplâncton e fitoplâncton (Sayili *et al.*, 2007; Baeck *et al.*, 2009; Ruane *et al.*, 2013). Nos

spas ou piscinas termais, e de modo a manter os peixes interessados pela pele humana, estes animais são alimentados com pequenas quantidades de alimento. Por comerem pouco passam fome, pelo que o seu crescimento é retardado e tornam-se mais agressivos e predatórios. Tal provoca nos peixes o comportamento natural de procura de alimento, tornando a pele humana mais atrativa uma vez que esta se revela também uma fonte de alimento mais fácil de obter (Sayili *et al.*, 2007).

1.4 O peixe *Garra rufa* – Caracterização da espécie

Garra rufa, vulgarmente conhecido por «peixe médico», é um peixe de água doce, bentopelágico, pertencente à ordem Cypriniformes e à família Ciprinidae (sendo das espécies mais pequenas pertencentes a esta família), sendo um dos 73 membros do género *Garra* (Sayili *et al.*, 2007; Jarvis, 2011). É conhecido por alimentar-se através da sucção das rochas usando o lábio inferior modificado num disco adesivo (Jarvis, 2011; Ruane *et al.*, 2013). Estes peixes são utilizados no tratamento de doenças de pele tais como psoríase, tendo o seu uso sido descrito pela primeira vez na Turquia em 1989 (Baeck *et al.*, 2009; Jarvis, 2011; Ruane *et al.*, 2013).

Esta espécie encontra-se em toda a Eurásia (figura 1), tendo uma área de distribuição bastante grande, incluindo as bacias do Médio-Oriente (rios Tigre e Eufrates), bacias hidrográficas na Turquia, Síria, Iraque e Irão, sendo considerada uma espécie não migratória que habita rios e pequenos lagos enlameados (Baeck *et al.*, 2009; Jarvis, 2011; Ruane *et al.*, 2013).



Fig. 1 Distribuição geográfica de *Garra rufa* (Fishbase, 2015).

Esta espécie apresenta uma boca ventral em forma de meia-lua, uma cabeça sem escamas e o tamanho máximo descrito é de 19 cm (Sayili *et al.*, 2007; Baeck *et al.*, 2009; Jarvis, 2011). A forma típica do corpo é relativamente fina e longa, geralmente arredondada em secção transversal com uma linha lateral completa, que se estende ao longo do meio da profundidade da cauda (figura 2). As escamas são cicloides e variam em número entre 29 a 36, em contagem lateral. Normalmente, o número de raios da barbatana dorsal é de 8, da barbatana peitoral varia entre 12 e 14, da barbatana pélvica entre 7 e 8, da barbatana anal 5 e da barbatana caudal 17 (Jarvis, 2011).

Em termos de coloração é um pouco variável (figura 2), uns tornam-se mais escuros que os outros consoante o ambiente em que se encontram mas, na generalidade, são tonalidades cinzentas sendo que o abdómen normalmente é esbranquiçado, apresentando uma faixa escura ao longo de todo o flanco do peixe terminando na base da barbatana caudal (Jarvis, 2011).



Fig. 2 *Garra rufa* (Ferreira, 2014).

Em termos de preferências alimentares, esta espécie é considerada omnívora, dado que se alimenta no ambiente selvagem de algas, fitoplâncton, zooplâncton e detritos, apresentando também um instinto natural para se alimentar das peles mortas de vertebrados (Sayili *et al.*, 2007; Jarvis, 2011). Também já foi verificado que se podem alimentar de cianobactérias, Chrysophyta, Chlorophyta (*Navicula* sp. e *Gomphonema* sp.), rotíferos e protozoários (Jarvis, 2011). Por outro lado, os predadores desta espécie são a Enguia europeia (*Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758)), o Peixe-gato (*Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)) e outros ciprinídeos como *Aspius vorax* (Heckel, 1843) e *Carasobarbus canis* (Valenciennes, 1842), entre outros (Jarvis, 2011).

O estudo das condições ambientais dos habitats desta espécie revelou que a profundidade da água varia de 30 a 50 cm; com pH entre 7,0 e 9,0; níveis de oxigénio dissolvido a variar entre 6,1-14,8 mg/l, para temperaturas entre 15 -31,2 °C; salinidade entre 0,10 e 0,80 e com velocidade da água até 4,5 m/s. Esta espécie aguenta melhor variações de temperatura do que variações de oxigénio, tendo uma alta exigência de oxigénio e apresentando, também, uma capacidade de persistir em ambientes contaminados por metais pesados (Jarvis, 2011).

Os peixes *G. rufa* apresentam um elevado valor comercial, sendo alvo de um grande interesse por parte de aquacultores, apesar de estarem envoltos em várias incógnitas quanto ao seu modo de produção. Esta espécie tende a ter uma distribuição ampla, sem sofrer uma ameaça específica, mas é listada como vulnerável na Turquia devido a um declínio regional significativo resultante de distúrbios causados pelo ser humano, tais como a elevada exploração da espécie e destruição do seu habitat natural (Baeck *et al.*, 2009; Jarvis, 2011). Recentemente, esta espécie foi legalmente protegida da exploração comercial na Turquia devido à sua sobre-exploração para exportação com fins terapêuticos (Baeck *et al.*, 2009).

Devido às suas características específicas, são muito usados para fins de medicina alternativa e tratamentos de pele em institutos de Beleza ou institutos de Bem-estar físico. Estes factos despertam o interesse na sua produção em cultivo, sendo especialmente relevante o conhecimento aprofundado acerca das condições ambientais necessárias para a sua manutenção em aquacultura e a sua reprodução em laboratório, juntamente com a formulação de dietas adequadas, económicas, facilmente acessíveis e que consigam promover um crescimento rápido e saudável para o desenvolvimento destes peixes.

1.5 Nutrição de peixes ornamentais

Desde que o ser humano começou a criar peixes em aquários, que se debate com a dificuldade em fornecer uma dieta adequada ao crescimento e bem-estar físico dos animais. A garantia da viabilidade de um produto que satisfaça essa necessidade tem de ser de qualidade assegurada, mas com um baixo custo de produção, já que o rendimento final do cultivo depende da quantidade e qualidade do alimento ministrado (Orvay, 1993). Contudo, não existe um único alimento capaz de satisfazer todos os requisitos nutricionais, sendo o

aconselhável criar uma dieta variada. Aliás, em aquacultura e, na área de nutrição, existem grandes dificuldades nos sistemas de produção, já que conhecer as necessidades nutricionais de todas as espécies mantidas neste tipo de sistemas é bastante difícil, devido à diversidade de regimes alimentares possíveis.

Na aquariofilia já existem espécies com elevado valor comercial como é o caso de *Symphysodon aequifasciatus* (Pellegrin, 1904), *Poecilia reticulata* (Peters, 1859), *Xiphophorus hellerii* (Heckel, 1848), *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) e *Carassius auratus*. No entanto, a informação nutricional para peixes ornamentais é escassa e por vezes até totalmente desconhecida, como é o caso de *Garra rufa*. É uma área de especial interesse para investigação, já que é um sector relevante, pois tem uma repercussão forte sobre os custos de uma aquacultura, na ordem de cerca de 60 a 70% do custo total. Dada a escassez de estudos a informação é limitada, pelo que a conclusão é muitas vezes baseada em diferentes condições de cultivo, diferentes necessidades nutricionais assim como hábitos alimentares e tipos de alimento também diversos (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011; Mohanta & Subramanian, 2011; Trbovic' *et al.*, 2013). Por exemplo, para que a reprodução nesta espécie seja bem sucedida, é necessário que os reprodutores estejam bem nutridos, sendo este um ponto muito importante numa aquacultura: *definir uma ração com qualidade*.

De especial importância, numa ração, é que esta tenha os constituintes em proporções equilibradas e de acordo com as necessidades nutritivas dos peixes. Caso contrário, a ração poderá influenciar negativamente o crescimento dos peixes, induzindo défice de nutrientes, intoxicações ou até mesmo provocando patologias. Se a ração, por sua vez, for equilibrada nutricionalmente resulta numa alta produção, fornecendo os nutrientes necessários à recuperação rápida de doenças e ajudando também os peixes a diminuírem o *stress* ambiental, uma vez que as propriedades dos alimentos afetam as condições do meio ambiente, como por exemplo a acumulação de detritos e produtos de excreção (Orvay, 1993). Resumidamente, uma ração de má qualidade pode influenciar o comportamento dos peixes, a sua integridade estrutural, as funções fisiológicas, o seu crescimento e a sua reprodução (Orvay, 1993).

Uma ração equilibrada nutricionalmente deve conter proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerais e fibras. Os ingredientes que perfazem uma ração, bem como

a quantidade dos mesmos, variam entre as espécies e dentro da própria espécie consoante a idade do peixe, as suas funções produtivas e as condições ambientais em que se encontram (FAO, 2015). A energia necessária para a manutenção do organismo e síntese de proteínas em peixes é menor do que em mamíferos, visto que os peixes têm uma necessidade energética menor. Os peixes necessitam de energia para o crescimento, atividades físicas, processos digestivos, reprodução, regeneração dos tecidos, entre outros.

As proteínas após serem ingeridas e hidrolisadas originam aminoácidos livres que são absorvidos através da parede do tubo digestivo e são distribuídos para vários órgãos através do sangue, onde são utilizados para sintetizar novas proteínas, destinadas ao crescimento, reprodução e reparação de tecidos. Se os peixes não ingerirem a quantidade suficiente de proteína, ocorrerá rapidamente redução e paragem de crescimento ou perda de peso, usando os peixes as reservas acumuladas para manter as funções vitais. Alguns aminoácidos formam-se através da modificação e reestruturação de outros. Contudo, existem alguns em que não é possível a sua síntese por este processo, sendo necessário aminoácidos mais complexos, os designados por aminoácidos essenciais, que devem estar presentes numa ração. A maioria dos peixes necessita de 10 aminoácidos essenciais, sendo eles, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Lewbart, 1998; Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Habitualmente a percentagem de aminoácidos numa ração deverá oscilar entre 3.4 a 11.8 % (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011)

Normalmente, as exigências de quantidade de proteína bruta em muitas espécies de peixes variam entre 25 a 55% (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). De acordo com Elangovan & Shim (1997) a quantidade certa de proteína numa ração é um aspeto muito complexo, já que a percentagem ideal varia com o tamanho e fase de vida do peixe; já as larvas ou até mesmo os juvenis têm necessidades proteicas maiores que os peixes adultos, visto que apresentam um crescimento mais rápido num período de tempo mais curto.

Os lípidos são o segundo constituinte mais importante numa ração, sendo uma importante fonte de ácidos gordos e de energia, que são essenciais para um bom crescimento e sobrevivência dos peixes. São totalmente digeríveis pelos peixes, ocupando um lugar preferencial em relação aos hidratos de carbono como fonte de energia (Mohanta & Subramanian, 2011). Normalmente, a maioria dos peixes necessita de ácidos gordos

insaturados com cadeias longas, verificando-se que os peixes de água doce habitualmente requerem ácido linoleico (18:2 n-6) ou ácido linolénico (18:3 n-3). Regularmente, utiliza-se óleo de peixe como a principal fonte de lípidos numa ração, o que tem um elevado custo. A quantidade de lípidos numa ração pode ser definida com base em vários fatores, tais como, temperatura, qualidade da água, disponibilidade de alimento, estação do ano, idade e características individuais dos peixes (Trbovic' *et al.*, 2013). Uma alimentação alternativa, incluindo tubifex, larvas de mosquito e fígado de bovino, já é oferecida com frequência em peixes de água doce com o objetivo de melhorar quer a maturação reprodutiva quer a desova (Lewbart, 1998; (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011).

Para uma dieta de peixes ornamentais os hidratos de carbono são um constituinte onde a informação bibliográfica é bastante limitada ou mesmo desconhecida em algumas espécies (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011; FAO, 2015). Contudo, juntamente com os lípidos são os principais constituintes a seguir às proteínas. Comparativamente com os lípidos, os hidratos de carbono são menos dispendiosos e adquirem-se muito mais facilmente (Mohanta & Subramanian, 2011). Em peixes omnívoros de água quente, como as carpas e *Garra rufa*, a utilização de hidratos de carbono é alta em comparação com outras espécies, sendo importante fornecer este constituinte para reduzir o catabolismo e para a síntese de glicose, que reduz a retenção de proteínas e aumenta a libertação de azoto para o ambiente. Este constituinte também serve como precursor de vários intermediários metabólicos necessários ao crescimento, aminoácidos indispensáveis e ácidos nucleicos (Mohanta & Subramanian, 2011).

Em dietas para peixes ornamentais, os minerais são o constituinte mais barato e o seu conteúdo é bastante reduzido, visto que os peixes conseguem absorver minerais através das brânquias ou do epitélio intestinal, o que faz com que os estudos publicados tenham pouca informação relativa a este constituinte (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011).

Os minerais mais importantes que entram na constituição de uma dieta são cálcio, fósforo, cobre, iodo, ferro, magnésio, zinco, selénio e manganês. Normalmente é atribuída uma maior importância ao fósforo, sendo essencial para o crescimento, mineralização dos ossos, metabolismo e porque a sua concentração na água é baixa. No caso dos *guppys*, para o seu crescimento ótimo, a concentração de magnésio numa dieta deverá ser de 0.54 g/kg (Lovell, 2000). A falta deste constituinte na dieta dos *guppys*, provoca nos peixes falta de

apetite, escoliose e lordose (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011; Mohanta & Subramanian, 2011).

Em relação às vitaminas, normalmente é utilizado sempre um suplemento vitamínico, o qual varia conforme a espécie, tamanho do peixe, fatores ambientais, inter-relações de nutrientes ou da própria condição de saúde do peixe. As vitaminas mais comuns são a vitamina E e a vitamina C que são consideradas antioxidantes porque têm uma boa capacidade de reduzir a resposta do peixe ao *stress*. A vitamina C é também essencial em processos metabólicos, incluindo a síntese de colagénio, proteção das membranas celulares e absorção e desintoxicação de xenobióticos; bem como por ser um bom agente redutor intra e intercelular (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Se a vitamina C estiver em falta numa dieta pode provocar deformidades nos opérculos e nas mandíbulas dos peixes como também pode induzir lordose, redução do crescimento, hemorragias, exoftalmia, inchaço e alteração na coloração do abdómen, como já foi relatado na espécie *Cichlasoma urophthalmus* (Lovell, 2000). Por exemplo, para a espécie *Astronotus ocellatus* o valor de vitamina C deve ser 25 mg/kg (Fracalossi *et al.*, 1998).

As fibras são um constituinte difícil de ser digerido pelos peixes, estando presente em quase todos os ingredientes básicos duma ração. Recomenda-se que a percentagem de fibra seja menor que 10% dos constituintes totais, embora em alguns casos particulares se aconselhem proporções até 20% (Santos, 2007).

A formulação da ração deve ser cuidada para manter os parâmetros de qualidade da água num bom nível de satisfação para os peixes. Caso contrário, mesmo que a ração possua uma elevada qualidade, se esses parâmetros não são suficientes, os peixes vão ter falta de apetite, não ingerem o alimento, ficam doentes e acabam por falecer, o que faz com que a ração nem chegue a ser um fator relevante. A água deve ser limpa, de modo a ficar sem quaisquer toxinas, com uma boa oxigenação e uma temperatura adequada. Também deve ter-se em conta que os peixes não podem ser alimentados excessivamente, e até porque os restos da ração em excesso irão provocar uma deterioração acelerada da água (Lewbart, 1998; Halver & Hardy, 2002; Santos, 2007; Trbovic', 2013; FAO, 2015;).

1.6 Objetivos

O escasso conhecimento acerca da nutrição em peixes ornamentais e a sua vasta importância para a aquacultura, bem como a falta de alimentos vivos para alimentar os peixes de água doce nas diferentes fases de produção (Lim *et al.*, 2003), justificam um maior interesse e um incremento da investigação nesta área, nomeadamente para a espécie *Garra rufa*, pelos aspetos referidos nas subsecções anteriores. Uma dieta desadequada ou de menor qualidade pode afetar negativamente o crescimento dos animais, a performance dos mesmos, o seu fenótipo e a sua fisiologia.

Deste modo, o objetivo principal deste projeto foi formular uma ração adequada a um crescimento eficiente da espécie *Garra rufa* em condições de cultivo intensivo, e que possa eventualmente constituir uma alternativa vantajosa relativamente às rações comerciais disponíveis para peixes ornamentais. Os peixes serão submetidos a uma ração controlo, uma ração comercial e a uma ração formulada de origem, constituída por vários componentes distintos. A composição real da ração formulada de origem não poderá ser revelada, encontrando-se sob sigilo profissional (pág. v) visto que se pretende o registo da sua patente. No final da experiência será avaliado o desempenho da dieta formulada para o seu crescimento e manutenção em aquacultura e a sua adequação. A ração criada será uma ração melhorada e de baixo custo que satisfaça os requisitos nutricionais desta espécie promovendo um maior crescimento, e tendo ao mesmo tempo, o cuidado de manter satisfatórios os parâmetros de qualidade da água.

Para concretizar o objetivo principal deste trabalho, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estimar a dose *ad libitum* e a frequência ideal de alimentação para os peixes *Garra rufa*;
- Avaliar o crescimento e a mortalidade dos peixes em cada tratamento;
- Avaliar a performance zootécnica dos peixes que foram submetidos às várias dietas em teste.

2. Materiais & Métodos

Uma vez que o principal objetivo deste trabalho foi formular uma ração comercial para *Garra rufa* capaz de promover o crescimento destes peixes, foi necessário estabelecer a dose ideal diária de alimentação *ad libitum* e a frequência ideal de alimentação para a produção intensiva em Aquacultura. Como tal, foi realizado inicialmente um procedimento experimental preliminar com este objetivo específico. Consequentemente, na segunda experiência, estes dois parâmetros ficaram definidos com os resultados deste procedimento preliminar.

2.1 Determinação da dosagem ideal de ração para obtenção de *ad libitum*.

2.1.1 Desenho experimental

Para determinar a dosagem ideal de ração para obtenção de *ad libitum* em *Garra rufa*, foi definido um desenho experimental correspondente a um sistema fechado com recirculação de água doce e composto por 6 tanques retangulares de plástico, cada um com uma dimensão de 24 cm altura, 38,6 cm largura e 50 cm de comprimento. Cada tanque tinha uma capacidade de aproximadamente 46 l (figura 3) e direcionava a água para uma *sump* (32 cm altura, 46,5 cm largura e 54 cm de comprimento) com cerca de 80 l, contendo um filtro biológico constituído por biobolas e um filtro mecânico composto por lã de vidro, passando por uma lâmpada UV (potência: 25 W, 230V, TMC V²ecton 600). Para manter a temperatura constante, o sistema era composto por um aquecedor com termostato e encontrava-se no laboratório de Aquacultura ornamental onde a temperatura ambiente ronda os 26°C.



Fig. 3 – Desenho experimental do sistema.

2.1.2 Aclimação

No dia 9 de Maio de 2014 foram colocados 10 peixes em cada tanque, perfazendo um total de 60 indivíduos, tendo os peixes sido medidos e pesados em jejum para determinar o seu peso corporal e o seu comprimento inicial, de modo a estabelecer apenas uma classe de tamanho no ensaio (peso médio $0,9523 \text{ g} \pm 0,010$; comprimento médio $4,6 \text{ cm} \pm 0,014$).

Esta fase decorreu durante 3 semanas, na qual os indivíduos foram alimentados duas vezes ao dia com uma ração comercial para peixes ornamentais de água doce (Proteína 52-55% e Lípidos 17-20%) e mantidos a uma temperatura de 30°C. Os indivíduos eram contados semanalmente.

A mudança de água ao sistema foi feita semanalmente juntamente com os testes aos parâmetros físico-químicos antes e após mudança da mesma, usando o fotómetro multiparamétrico HANNA HI 83203 para medir amónia, nitritos e nitratos. O oxigénio dissolvido, temperatura, pH, entre outros, foram medidos com uma sonda multiparamétrica (YSI Pro Plus) e mantidos dentro de valores bem controlados. Sempre que necessário ocorreu sifonagem dos aquários.

2.1.3 Determinação da dose *ad libitum*

Este ensaio teve como objetivo determinar a dose ideal de alimentação *ad libitum* e decorreu durante 1 semana, tendo sido usado o sistema descrito anteriormente, com os mesmos 10 peixes em cada tanque e mantidos a uma temperatura de 30°C.

No início do ensaio os peixes foram medidos e pesados em jejum para confirmar-se novamente, que ainda havia apenas uma classe de tamanho (peso médio 1,187 g \pm 0,022; comprimento médio 4,8 cm \pm 0,035). Os peixes foram retirados dos tanques e os seus comprimentos à furca e total foram medidos com o auxílio de um ictiómetro. Posteriormente, os peixes foram pesados numa balança de precisão (Ohaus Adventurer), e colocados novamente no tanque respetivo. Após este procedimento, determinou-se a quantidade de ração correspondente a 10% do peso corporal de 10 peixes ($\bar{X} = 1,1871g$), ou seja, 0,12 g de ração para 10 peixes – 1% peso corporal por peixe (0,012g por peixe) - a qual foi estabelecida como a dose inicial diária por tanque neste procedimento experimental. A experiência foi realizada com a utilização de uma dieta comercial (Proteína 52-55% e lípidos 17-20%), sendo os animais alimentados duas vezes ao dia. Aumentou-se 0,1 g dia⁻¹ até se verificar que sobrava alimento na primeira alimentação do dia seguinte. Após uma semana, deu-se por terminada esta fase do ensaio. A mudança de água do sistema, bem como o controlo de qualidade da água, foram realizados como descrito na aclimação (secção 2.1.2).

2.1.4 Determinação da frequência ideal

Este ensaio teve como objetivo determinar a frequência ideal de alimentação. Foi usado o sistema correspondente ao desenho experimental descrito na secção 2.1.1, com os mesmos 10 indivíduos por tanque. Foram aplicados dois tratamentos distintos e testados em 3 réplicas. Em 3 dos tanques do sistema (tanque n°1, tanque n°2 e tanque n°3) os peixes foram alimentados 2 vezes por dia, com 0,2 g de cada vez, enquanto nos outros 3 tanques (tanque n°4, tanque n°5, tanque n°6) os peixes foram alimentados três vezes ao dia com 0,133

g de cada vez (figura 4). Em ambos os casos, os peixes foram alimentados com uma dieta comercial (Proteína 52-55% e lípidos 17-20%).

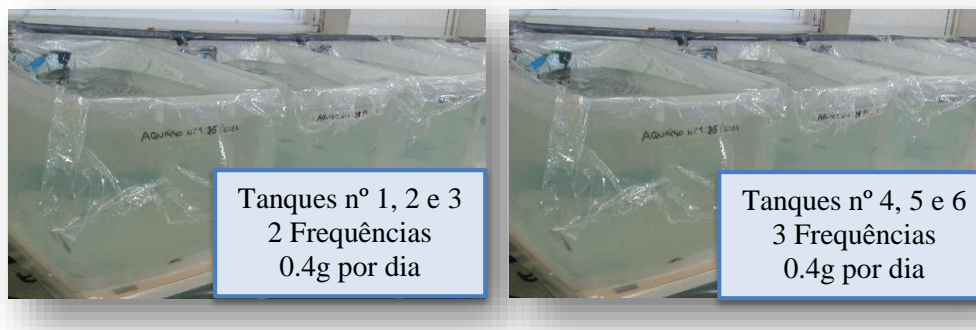


Fig. 4 – Esquema representativo do ensaio.

No dia 31 de Maio de 2014, os indivíduos foram pesados e medidos em jejum, de acordo com o procedimento previamente descrito (secção 3.1.3). Iniciou-se de seguida a experiência propriamente dita (1 de junho de 2014), tendo o ensaio decorrido durante 1 mês (até 1 de julho de 2014). Durante o ensaio, os indivíduos eram contados semanalmente. No final do ensaio, repetiram-se os processos de medição e pesagem (2 de julho de 2014). A mudança de água do sistema, bem como o controlo de qualidade da água, foram realizados como descrito na aclimatação (secção 2.1.2).

2.2 Verificação da ração formulada: uma boa alternativa?

2.2.1 Formulação da ração

Esta etapa do processo requereu cerca de 3 meses de trabalho, incluindo uma extensa pesquisa bibliográfica, de modo a permitir a formulação de uma dieta nutricionalmente equilibrada para estes peixes. Foram definidos todos os ingredientes a usar e a quantidade específica de cada constituinte da ração que, por motivos referidos anteriormente, não podem

ser revelados. Porém, pode referir-se que consiste num ingrediente de origem animal (artrópodes), dois de origem vegetal e um suplemento vitamínico.

Nos 3 meses seguintes fez-se a preparação da ração, ou seja, os ingredientes foram adquiridos, lavados e tratados. Foi feita uma primeira triagem dos ingredientes e posteriormente estes foram liofilizados (Liofilizador de bancada Scانvac CoolSafe) durante 2 dias a -60°C . Foi depois efetuada uma nova triagem dos ingredientes, para garantir que na ração só estariam os ingredientes totalmente liofilizados.

Após a preparação dos ingredientes optou-se por fazer a ração com 25 g de ingredientes de cada vez, sendo este processo repetido semanalmente. Este método consistiu em pesar a quantidade certa de cada ingrediente, triturar todos os constituintes numa picadora, acrescentar 30 ml de água destilada e misturar muito bem, de modo a obter uma pasta mais consistente e uniforme. De seguida, através de seringas com uma saída de 2 mm de diâmetro, a amostra era colocada num tabuleiro para ir à estufa a 60°C durante 24 horas. Posteriormente a ração era cortada através de um sistema de corte calibrado com um varão roscado milimétrico de 2 mm (figura 5) para garantir que os grânulos seriam cortados de 2 em 2 mm. Após esta fase, a ração era devidamente armazenada em frascos hermeticamente fechados num local escuro, seco e com uma temperatura controlada.



Fig. 5 – Seringas usadas na criação da ração e o respetivo sistema de corte.

2.2.2 Desenho experimental

Neste ensaio foram utilizados três sistemas fechados com recirculação de água doce, em que cada sistema era composto por 3 aquários de vidro, para que houvesse 3 replicados para cada um dos tratamentos (dietas), cada um com 48 l (30 cm de altura, 40 cm de largura e 40 cm de comprimento). A água era direcionada para uma *sump* de vidro (dimensões: 40 cm de altura, 40 cm de largura e 60 cm de comprimento) com cerca de 96 l de volume, com um filtro biológico constituído por biobolas e um filtro mecânico composto por lã de vidro, passando por um escumador. Para manter a temperatura constante (28°C), o sistema era composto por um aquecedor com termostato e encontrava-se no laboratório de Aquacultura.



Fig. 6 – Sistema usado na determinação da ração ideal.

2.2.3 Aclimação

Foi usado o sistema correspondente ao desenho experimental descrito na secção 2.2.1 em que foram postos 20 peixes em cada aquário, perfazendo um total de 60 indivíduos, onde permaneceram em crescimento até ao fim procedimento (total de 180 peixes).

A aclimação decorreu durante 1 mês (18 de Abril de 2015 a 16 de Maio de 2015), sendo que no dia 18 de Abril de 2015 todos os peixes foram medidos e pesados em jejum (como descrito na secção 2.1.2) para confirmar-se mais uma vez, que ainda havia apenas uma classe de tamanho (peso médio $1,8102 \pm 0.025$; comprimento total $5,5 \text{ cm} \pm 0.022$).

De acordo com a experiência para determinar a dose e frequência ideal de alimentação para *Garra rufa* com 10 peixes, determinou-se que para esta fase do ensaio, que a dose diária ideal seriam 0.8 g/aquário (20 peixes por aquário) e dividida em 3 frequências diárias (ver secção de resultados 3.1.1 e 3.1.2). Durante o ensaio de crescimento as condições ambientais foram mantidas aproximadamente constantes em cada sistema (tabela I). Os indivíduos eram contados semanalmente.

Tabela I – Parâmetros médios para cada sistema.

Parâmetros	Controlo	Dieta A	Dieta B
T (°C)	28,14	28,06	28,4
Pressão água (mmHg)	759,54	759,34	759,82
Do (%)	65,53	67,55	64,94
Do (mg/L)	4,81	5,19	5,03
C	518,37	494,18	490,31
Sal	0,22	0,23	0,22
pH	8,08	8,04	7,95
ORPmv	43,34	50,05	52,2

A mudança de água do sistema, bem como o controlo de qualidade da água, foram realizados como descrito na aclimação (secção 2.1.2). Estes parâmetros foram monitorizados durante todo o ensaio e mantidos com níveis dentro dos limites recomendados para a espécie.

2.2.4 Ensaio de crescimento

O ensaio de crescimento com as 3 dietas distintas decorreu durante 2 meses (16 de Maio de 2015 a 16 de Julho de 2015). A 16 de Maio todos os peixes foram medidos e pesados em jejum (como descrito na secção 2.1.2) para determinar os seus pesos e comprimentos iniciais.

Os três sistemas de tanques foram divididos do seguinte modo: (i) no sistema 1 os peixes foram alimentados com uma ração controlo, que foi a ração que sempre foi administrada aos peixes durante todo o processo – ração comercial para peixes ornamentais de água doce (Proteína 52-55% e Lípidos 17-20%); (ii) aos peixes do sistema 2 foi administrada a dieta A, que foi uma ração comercial para peixes da empresa SPAROS, Lda (Proteína 47-50% e Lípidos 5-8%); (iii) no sistema C os peixes foram alimentados com a ração formulada e designada por dieta B (Proteína 49-52% e Lípidos 16-19%). Os indivíduos foram alimentados três vezes ao dia, com 0,27 g de ração de cada vez, num total de 0,8g.dia⁻¹.

Após um mês do decorrer do ensaio, e de modo a determinar como estaria a decorrer o crescimento, os peixes foram novamente medidos e pesados em jejum. No final da experiência, os peixes voltaram novamente a passar pelo processo de medição e pesagem em jejum, para determinar o peso e comprimento final dos peixes. Durante todo o ensaio, os indivíduos eram contados semanalmente de modo a avaliar a ocorrência de mortalidade e determinar a taxa de sobrevivência (parâmetro inversamente complementar à mortalidade) durante o ensaio.

2.2.5 Parâmetros zootécnicos

No final do procedimento experimental, e após a execução das medições e pesagens calcularam-se os seguintes parâmetros zootécnicos para avaliar o crescimento: Taxa de crescimento específico (SGR), Índice de crescimento diário (DGI), Taxa de crescimento absoluto (AGR), Índice de condição (K) e Taxa de conversão alimentar (FCR) com os dados dos 60 peixes por tratamento. As fórmulas de cálculo de cada um destes parâmetros são as seguintes:

Taxa de crescimento específico (SGR) - O valor obtido exprime a percentagem de aumento de peso por dia durante todo o período experimental. Esta taxa é útil para a comparação do crescimento em períodos relativamente curtos (Engrola et al., 2007).

$$SGR (\% \text{ dia}^{-1}) = \frac{[\text{Ln}(\text{peso final } (g)) - \text{Ln}(\text{peso inicial})]}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}} \times 100$$

Índice de crescimento diário (DGI) - Este coeficiente permite uma boa comparação das taxas de crescimento, uma vez que varia pouco caso a massa corporal seja 1 g ou vários quilos, embora o expoente deva ser adaptado para cada caso.

$$DGI (g \text{ dia}^{-1}) = \frac{(\text{peso inicial } (g))^{1/3} - \text{Ln}(\text{peso inicial})^{1/3}}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}} \times 100$$

Taxa de crescimento absoluto (AGR) - Indica o aumento médio de peso durante o período experimental, embora não dê nenhuma informação sobre a forma como esse aumento ocorreu.

$$AGR (g \text{ dia}^{-1}) = \frac{\text{peso final } (g) - \text{peso inicial } (g)}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}}$$

Índice de condição (K) – Avalia se os indivíduos estão a crescer tanto em peso como em comprimento ou se apenas estão a adquirir peso.

$$K (\%) = \frac{\text{peso final}}{\text{comprimento final}^3} \times 100$$

Taxa de conversão alimentar (FCR) – É útil para comparar rações, ou seja, através da mesma quantidade de ração consumida qual a ração que indica o maior aumento de peso.

$$FCR = \frac{\text{consumo ração seca (g)}}{\text{Peso ganho (g)}}$$

Posteriormente, foram retirados de cada tratamento 21 peixes, 7 de cada réplica, para calcular-se o Índice hepatossomático (IH), o peso da vesícula e o seu comprimento (figura 7). O índice hepatossomático é calculado com o recurso à fórmula seguinte:

Índice hepatossomático (IH) – indica que existe uma correta proporção entre o tamanho do fígado e o tamanho do peixe.

$$IH (\%) = \frac{\text{peso fígado}}{\text{peso corporal}} \times 100$$



Fig. 7 – Vesícula biliar de *Garra rufa*.

Para a realização destas tarefas os peixes inicialmente foram anestesiados individualmente com MS-222 com uma dose letal (figura 8), onde foi retirado a cada indivíduo os seus órgãos e foram pesados numa balança de precisão (Ohaus Adventurer) e medidos (com uma craveira), respetivamente. Foi ainda efetuada uma examinação direta da anatomia interna e do estado geral dos peixes, realizada em 7 indivíduos de cada réplica, 21 por tratamento. Para tal, analisaram-se os seguintes aspetos: estado geral dos órgãos, aspeto e coloração da cavidade abdominal, e estado de maturação dos indivíduos (maturo/imaturo). Os resultados foram posteriormente transformados em percentagens por tratamento.



Fig. 8 – *Garra rufa* anestesiado com dose letal.

2.3 Análise estatística

Com os dados obtidos durante todo o estudo experimental e após a sua conclusão, foram analisados os seguintes parâmetros: número de vivos como indicador de sobrevivência, variação de peso, variação do comprimento à furca e variação do comprimento total para cada tratamento como indicadores de crescimento. Também foram analisados os parâmetros zootécnicos anteriormente referidos para cada dieta. Antes de executar qualquer tipo de análise estatística, as variáveis em estudo foram testadas quanto à normalidade através do teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov. Como a transformação das variáveis não removeu a heterogeneidade em todas as variáveis, a análise de variância foi feita usando os dados não transformados, uma vez que o método ANOVA é relativamente robusto a desvios dos seus pressupostos (Underwood, 1997). Todos os tratamentos estatísticos foram efectuados com o software SPSS 22.0. Realizou-se a comparação

estatística da influência das três dietas fornecidas aos animais através do método ANOVA com um fator (ANOVA de uma via, com o nível de significância $\alpha = 0,05$). O fator em estudo é o tipo de dieta. Este apresenta três níveis ($k=3$) que se pretendeu relacionar com as variáveis biológicas estudadas (variação do peso, variação do comprimento à furca e variação do comprimento total). Para cada variável existem duas hipóteses que se pretendem testar, a hipótese nula (H_0) de que não existem diferenças estatisticamente significativas no valor médio de cada variável biológica versus a hipótese alternativa (H_1) de que existem diferenças estatisticamente significativas no valor médio de cada variável biológica. Os efeitos significativos detetados foram depois sujeitos ao teste post-hoc Tukey HSD para analisar individualmente cada um dos níveis do fator dieta.

Os parâmetros zootécnicos também foram analisados através do método ANOVA com um fator (ANOVA de uma via, com o nível de significância $\alpha = 0,05$). O fator em estudo é o tipo de dieta. Este apresenta três níveis ($k=3$) que se pretendeu relacionar com as variáveis estudadas (SGR, DGI, AGR, K IH, peso, comprimento da vesícula e FCR). Para cada variável existem duas hipóteses que se pretendem testar, a hipótese nula (H_0) de que não existem diferenças estatisticamente significativas no valor médio de cada variável versus a hipótese alternativa (H_1) de que existem diferenças estatisticamente significativas no valor médio de cada variável. Os efeitos significativos detetados foram depois sujeitos ao teste post-hoc Tukey HSD para analisar individualmente cada um dos níveis do fator dieta.

3. Resultados

3.1 Dosagem ideal de ração para obtenção de *ad libitum*

3.1.1 Determinação da dose *ad libitum*

Neste ensaio verificou-se que, quando os peixes foram alimentados com 0,5 g.dia⁻¹, observou-se um excedente de ração nos tanques até à primeira alimentação do dia seguinte, não havendo razão para continuar a aumentar a dose posteriormente. Deste modo, definiu-se que a dose *ad libitum* seriam 0,4 g.dia⁻¹ para 10 peixes (peso médio 1,2500 g ± 0,017; comprimento médio 5,0 cm ± 0,025), ou seja, 0,04 g.dia⁻¹.peixe (3,2% do peso corporal por dia).

3.1.2 Determinação da frequência ideal

No decorrer deste ensaio a taxa de sobrevivência para o tratamento de duas frequências diárias foi de 90% e a taxa de sobrevivência para o tratamento de três frequências diárias foi de 86,7 %. As variações do peso e do comprimento à furca obtidas no final da experiência foram similares entre tratamentos (figuras 9a e 9b). Analisando a variação do comprimento total entre os dois tratamentos testados verifica-se que o crescimento obtido foi maior quando os peixes foram alimentados três vezes ao dia (comprimento médio total dos peixes alimentados três vezes por dia 5,34 cm ± 0,095; figura 9C), observando-se diferenças estatisticamente significativas nesta variável (ANOVA de uma via: graus de liberdade = 1; média dos quadrados = 0,212; F = 4,554 e p = 0,038).

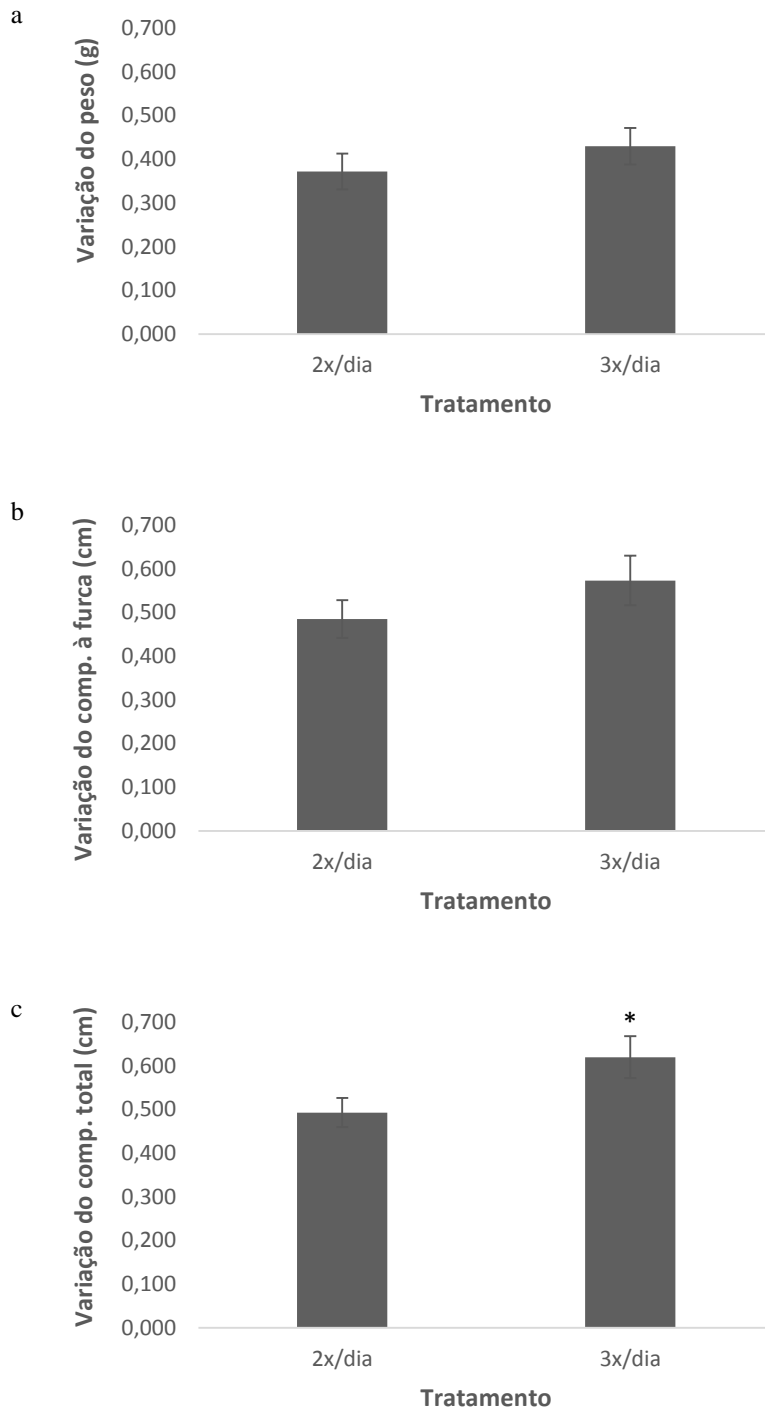


Figura 9 – Variação média dos parâmetros de crescimento de *G. rufa* sujeitos a diferentes frequências de alimentação diárias, obtidos após 1 mês de ensaio. a - Variação média de peso; b – Variação média do comprimento à furca; c – Variação média do comprimento total. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via; $p < 0,05$).

3.2 Verificação da ração formulada: uma boa alternativa?

3.2.1 Composição teórica aproximada das dietas testadas

Das 3 dietas testadas, verifica-se que a dieta controlo é a que apresenta maior conteúdo proteico e lídico e a dieta A apresenta menor valor lipídico e menor valor proteico (tabela II).

Tabela II – Valores teóricos aproximados da constituição em macromoléculas das dietas testadas.

Constituintes	Controlo	Dieta A	Dieta B
Proteína (%)	52-55	47-50	49-52
Lípidos (%)	17-20	5-8	16-19

3.2.2 Sobrevivência e parâmetros de crescimento

Durante o ensaio de crescimento em que foram testadas as 3 dietas distintas, a taxa de sobrevivência foi de 100%. Em todos os tratamentos (controlo, dieta A e dieta B), verificou-se ainda que durante o ensaio (61 dias) os peixes apresentaram crescimento, aumentando quer a sua biomassa quer ambos os comprimentos medidos, embora com diversas diferenças entre os tratamentos (figura 10). Em relação à variação do peso apenas a dieta A apresenta diferenças estatisticamente significativas (menor aumento de peso, figura 10a e tabela III); para as outras duas variáveis – comprimento total e comprimento à furca – apresentam diferenças estatisticamente significativas nas três dietas do ensaio (dieta B com maior aumento de comprimento e dieta A com pior aumento de comprimento, figuras 10a e b; tabela III).

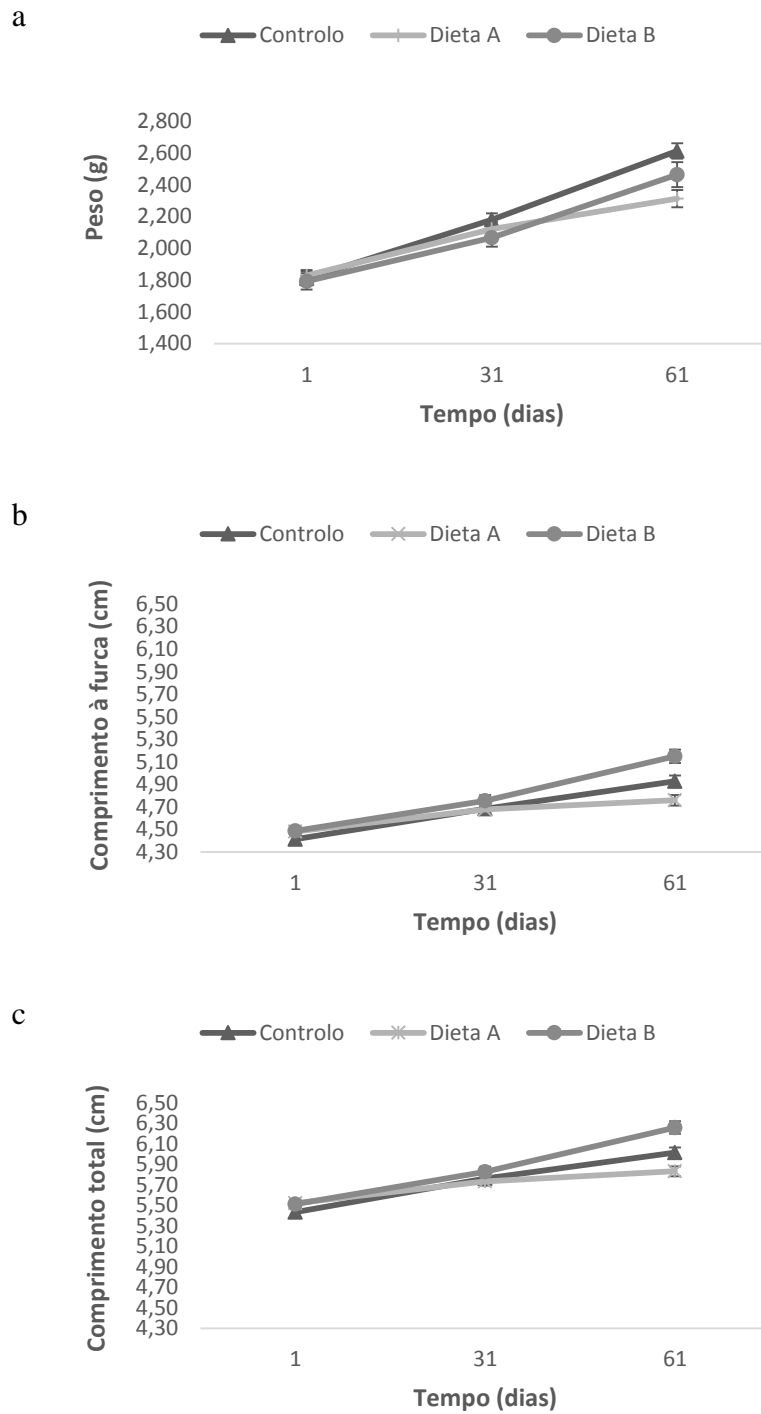


Figura 10 – Média dos parâmetros de crescimento de *G. rufa* sujeitos a três tratamentos diferentes (dieta controlo, dieta A e dieta B), ao longo de todo o ensaio. a - Média de peso para cada tratamento; b – Média do comprimento à furca para cada tratamento; c – Média do comprimento total para cada tratamento. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

Numa análise global às variações dos 3 parâmetros de crescimento quantificados durante o ensaio verificou-se que a dieta A foi a dieta que apresentou piores resultados, quer em crescimento de biomassa, quer no crescimento em tamanho – comprimento à furca e comprimento total (figura 11), apresentando diferenças estatisticamente significativas entre todos os tratamentos e para as 3 variáveis (teste Tukey HSD: $p < 0,05$; tabela III). Para a variação do peso tanto a dieta controlo como a dieta B apresentaram bons resultados. Em relação aos comprimentos, a dieta B apresentou os melhores resultados.

Em relação à variação do peso (figura 11a), embora a variação do peso obtida no final do ensaio pareça ser maior com a dieta controlo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação à dieta B (Teste Tukey HSD: $p = 0,085$). Contudo, a menor variação do peso obtida com a dieta A é significativamente diferente das variações de peso obtidas com a dieta controlo e com a dieta B (Testes Tukey HSD: $p < 0,05$; tabela III).

A variação do comprimento à furca é superior na dieta B (0,6590 cm na dieta B *versus* 0,5150 cm na dieta controlo e 0,2746 cm na dieta A) em relação às outras dietas (figura 11b), havendo um claro efeito estatisticamente significativo do tipo de dieta nas variações deste parâmetro (ANOVA de uma via: $p < 0,05$; tabela III). De facto, os testes post-hoc revelaram que a variação do comprimento à furca obtida em cada tratamento difere entre tratamentos ($p < 0,05$), com diferenças estatisticamente significativas em todas as dietas (tabela III).

Relativamente ao comportamento da média da variação do comprimento total, mais uma vez, foi notável o maior crescimento obtido nos peixes alimentados com a dieta B comparativamente à dieta controlo e à dieta A (0,7443 cm na dieta B *versus* 0,5833 cm dieta controlo e 0,3085 cm na dieta A; figura 11c), existindo diferenças estatisticamente significativas entre todos os tratamentos (teste Tukey HSD: $p < 0,05$; tabela III).

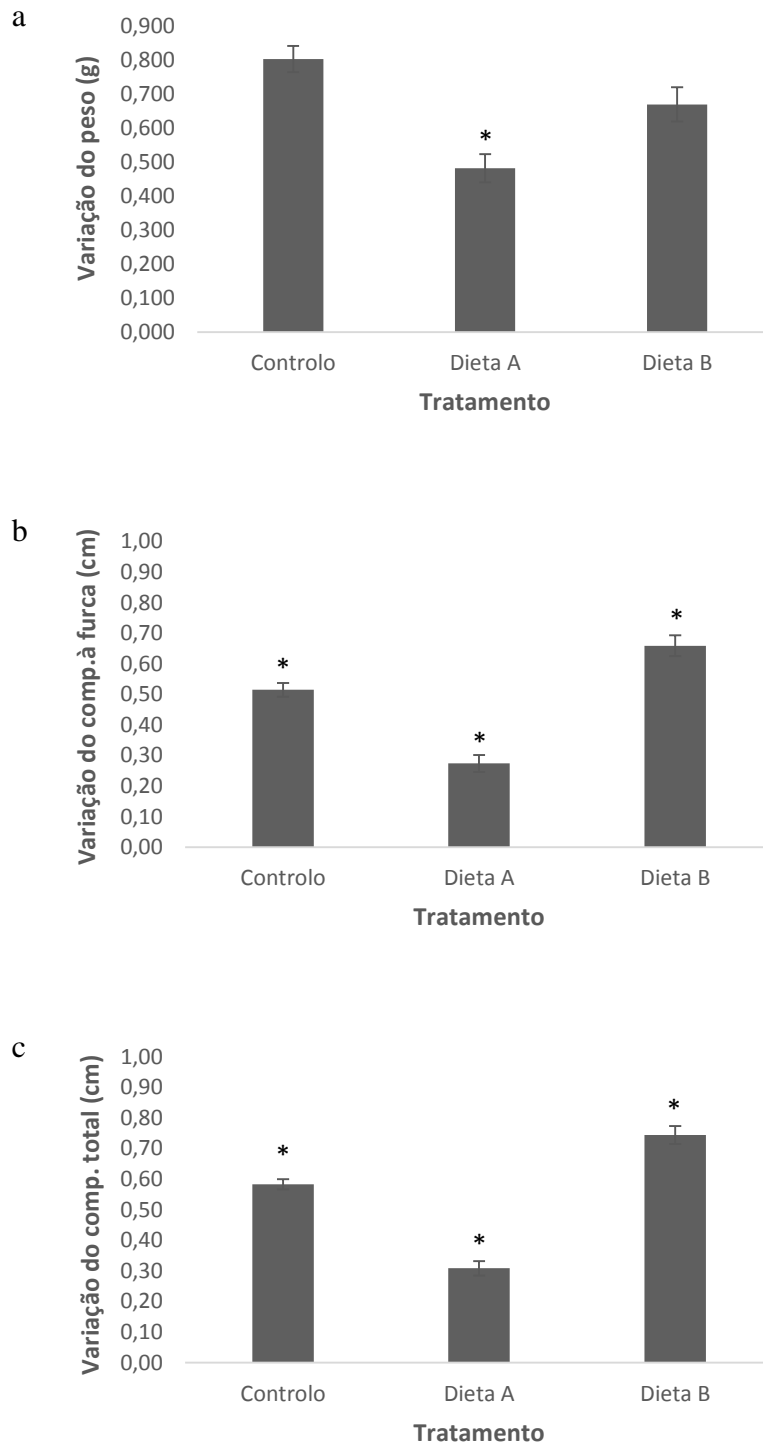


Figura 11 – Variação média dos parâmetros de crescimento de *G. rufa* sujeitos a três tratamentos diferentes (dieta controlo, dieta A e dieta B), obtidos após 2 meses de ensaio. a - Variação média de peso; b – Variação média do comprimento à furca; c – Variação média do comprimento total. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via; $p < 0,05$).

Tabela III – Resultados da ANOVA de uma via e dos testes post-hoc para as variáveis dependentes variação de peso, variação do comprimento à furca e variação do comprimento total. Apenas as variáveis que mostraram resultados significativos se encontram representadas ($p < 0,05$), df - graus de liberdade, MS - Média dos quadrados.

ANOVA				
Variável dependente	df	MS	Z	Sig.
Variação do Peso	2	1,545	13,148	0,000
Variação do comprimento à furca	2	2,257	45,725	0,000
Variação do comprimento total	2	2,905	82,400	0,000

Post-hoc-tests			
Variável dependente	Teste	Condição	Sig.
Variação do peso	Tukey HSD	Comparação da dieta A com as outras dietas	0,009
		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,001
		Comparação da dieta C com as outras dietas	0,000
Variação comprimento à furca	Tukey HSD	Comparação da dieta A com as outras dietas	0,000
		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,000
		Comparação da dieta C com as outras dietas	0,000
Variação comprimento total	Tukey HSD	Comparação da dieta A com as outras dietas	0,000
		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,000
		Comparação da dieta C com as outras dietas	0,000

3.2.3 Parâmetros zootécnicos:

Em relação à taxa de crescimento específico (índice SGR) verificou-se que o menor aumento em percentagem de peso por dia ocorreu nos peixes que se alimentaram da dieta A (figura 12a, tabela IV), tendo a dieta A apresentado diferenças estatisticamente significativas relativamente às dietas restantes, como comprovado pelos resultados do teste Tukey HSD (tabela V). Contudo, entre a dieta controlo e a dieta B não ocorreram diferenças estatisticamente significativas (figura 12a, tabela IV).

O parâmetro DGI indica que a dieta onde se verificou o maior crescimento diário nos peixes foi na dieta B e o pior crescimento ocorreu com a dieta A (figura 12c; tabela IV), ocorrendo diferenças estatisticamente significativas apenas entre as dietas A e B (figura 12c, tabela V).

Relativamente ao parâmetro AGR, verifica-se que o aumento médio do peso durante o ensaio foi maior nas dietas controlo e B e menor com os peixes alimentados com a dieta A (figura 12b, tabela IV), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre a dieta controlo e a dieta B (figura 12b, tabela V). De facto, apenas na dieta A se verificaram diferenças estatísticas relativamente às outras dietas.

O índice de condição (K) foi menor na dieta B e similar nas dietas controlo e A, sendo a dieta B a única com diferenças estatisticamente significativas relativamente às restantes dietas (figura 12d, tabelas IV e V). No entanto, das 3 dietas testadas, verificou-se que foi nos peixes alimentados com a dieta B que se obtiveram os índices de condição mais próximos de 1.

Em relação ao IH, ou seja, à proporção entre o tamanho do fígado e o tamanho do peixe, os peixes alimentados com a dieta A apresentaram o índice médio mais elevado enquanto a dieta B o índice médio mais baixo, embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas entre as dietas testadas (tabelas IV e V).

Em relação aos resultados do peso da vesícula apresentado nos três tratamentos, as vesículas com maior peso apresentado foram na dieta controlo e na dieta B (pesos similares e sem diferenças estatisticamente significativas entre a dieta controlo e dieta B) enquanto a vesícula com o menor peso foi obtida nos peixes alimentados com a dieta A (tabela IV),

registrando-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre a dieta controle e a dieta A para este parâmetro (tabela V). O comprimento da vesícula dos peixes alimentados com a dieta B foi maior enquanto os peixes alimentados com a dieta A apresentaram vesículas com um comprimento menor (tabela IV), tendo-se verificado que com a dieta B esta variável apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros tratamentos (tabela V).

A taxa de conversão alimentar (FCR) parece ser maior na dieta B e menor na dieta controle (tabela IV), embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (tabelas V).

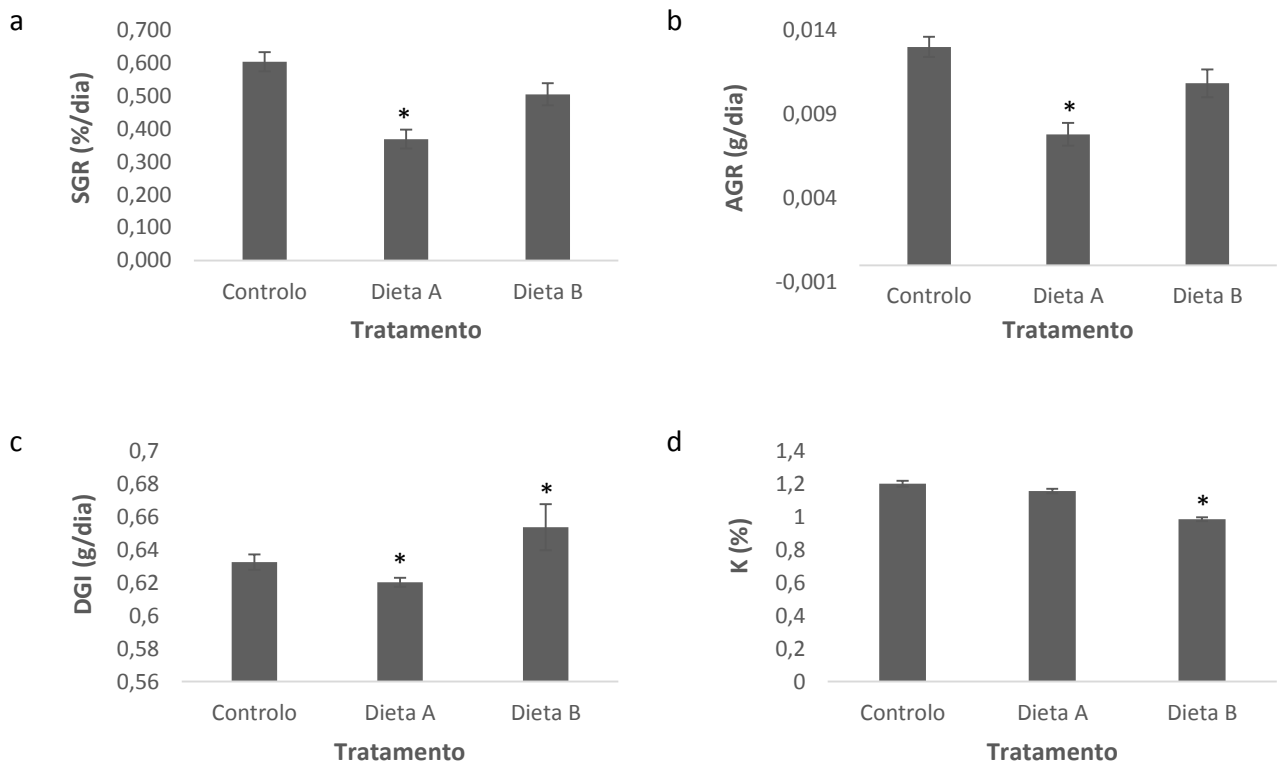


Figura 12 – Variação média dos índices SGR, AGR, DGI e K para três tratamentos diferentes (dieta controle, dieta A e dieta B), obtidos no final do ensaio. a – Taxa de crescimento específico (SGR); b- Taxa de crescimento absoluto (AGR); c- Índice de crescimento diário (DGI); d- Índice de condição (K). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via; p < 0,05).

Tabela IV – Parâmetros zootécnicos para cada tratamento (dieta controle, dieta A e dieta B), com respectiva média e erro padrão, obtidos após o término do ensaio.

	Controle	Dieta A	Dieta B
SGR (%/dia)	0,604 ± 0,029	0,369 ± 0,029	0,505 ± 0,034
DGI (g/dia)	0,633 ± 0,005	0,620 ± 0,003	0,654 ± 0,014
AGR (g/dia)	0,013 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,011 ± 0,001
K (%)	1,204 ± 0,018	1,160 ± 0,014	0,988 ± 0,012
IH (%)	0,322 ± 0,066	0,445 ± 0,080	0,279 ± 0,079
Peso vesícula (g)	0,011 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,010 ± 0,001
Comprimento vesícula (cm)	0,39 ± 0,027	0,36 ± 0,027	0,50 ± 0,029
FCR (g)	3,077 ± 0,403	4,994 ± 2,861	5,086 ± 1,209

Tabela V – Resultados da ANOVA de uma via e dos testes post-hoc para as variáveis dependentes de SGR, DGI, AGR, K, peso da vesícula e comprimento da vesícula. Apenas as variáveis que mostraram resultados significativos se encontram representadas ($p < 0,05$), df - graus de liberdade, MS - Média dos quadrados.

ANOVA				
Variável dependente	df	MS	Z	Sig.
SGR	2	0,839	14,797	0,000
DGI	2	0,017	3,794	0,024
AGR	2	0,000	13,225	0,000
K	2	0,779	58,902	0,000
Peso vesícula	2	0,000	3,309	0,043
Comprimento vesícula	2	0,202	9,659	0,000

Post-hoc-tests			
Variável dependente	Teste	Condição	Sig.
SGR	Tukey HSD	Comparação da dieta A com as outras dietas	0,000
		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,019
DGI		Comparação da dieta A com as outras dietas	0,019
		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,019
AGR		Comparação da dieta A com as outras dietas	0,008
K		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,000
Peso vesícula		Comparação da dieta controlo com as outras dietas	0,043
		Comparação da dieta A com as outras dietas	0,043
Comprimento vesícula		Comparação da dieta B com as outras dietas	0,000

Através de uma examinação direta da anatomia interna e do estado geral dos peixes observou-se que os peixes que se encontravam com os órgãos em pior estado, com a cavidade abdominal com uma coloração negra, e com uma maior proporção de indivíduos imaturos entre outras, foram os peixes alimentados com a dieta A. Por outro lado, foi nos indivíduos alimentados pela dieta B que se observaram os órgãos com um aspeto mais saudável e com os órgãos mais avermelhados (tabela VI).

Tabela VI – Observações percentuais da anatomia interna e do estado geral dos 21 peixes por tratamento (dieta controlo, dieta A e dieta B), 7 peixes por réplica que foram abertos no final do ensaio.

Características (%)	Tratamento								
	Dieta Controlo			Dieta A			Dieta B		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Cavidade abdominal negra	100	100	100	100	100	100	0	0	0
Imaturo	0	14	14	14	0	29	0	0	14
Órgãos muito desfeitos	27	14	14	100	100	100	0	0	0
Vesícula muito escura	0	0	0	100	100	100	0	0	0
Ovos pouco desenvolvidos	29	0	0	0	0	0	0	0	0
Órgãos avermelhados	57	71	71	0	0	0	100	100	100
Órgãos saudáveis	71	71	71	0	0	0	100	100	100

4. Discussão

4.1 Determinação da dosagem ideal de ração para obtenção de *ad libitum*.

As necessidades proteicas dos peixes numa dieta são influenciadas por diversos fatores tais como a relação proteína/energia, as características fisiológicas do animal (idade, tamanho, reprodução), as condições do meio (temperatura, salinidade, etc) e o regime de alimentação (Orvay, 1993; Lucas & Southgate, 2005, Mohanta & Subramanian, 2011). Deste modo, é necessário manter estáveis as condições do meio, tal como foi feito neste trabalho e fixar também o regime de alimentação sendo definido a dose e a frequência ideal para a espécie em estudo.

A determinação da dose *ad libitum* e a frequência ideal de alimentação para peixes *Garra rufa* (peso médio $1,2500 \text{ g} \pm 0,017$; comprimento médio $5,0 \text{ cm} \pm 0,025$) foram passos muito importantes neste trabalho pois permitiram definir a dose e a frequência ideal para os peixes ficarem totalmente saciados (Kastelein *et al.*, 2000) e, no ensaio de crescimento posterior, comparar as diferentes dietas de um modo mais coerente; sendo este conhecimento bastante útil para investigações futuras evitando assim excedentes de ração que, para além do desperdício económico associado ao cultivo, são bastante prejudiciais para o meio ambiente (Lucas & Southgate, 2005; Mohanta & Subramanian, 2011).

É necessário não dar ração em excesso e que a percentagem dos constituintes esteja no balanço correto para produzirem uma menor deterioração dos meios de cultivo e reduzir a eliminação da matéria orgânica, fósforo e amoníaco. É necessário também um tratamento prévio para reduzir a produção de resíduos contaminantes, cujos efeitos negativos manifestam-se em zonas de cultivo de certos países (Orvay, 1993; Lucas & Southgate, 2005). Ter-se o conhecimento correto da frequência ideal além de reduzir o desperdício de ração ajuda a maximizar o crescimento e reprodução de uma espécie (James & Sampath, 2004).

Segundo Pannevis & Earle (1994), os peixes ornamentais requerem de alimento, entre 1% a 2,5% do seu peso corporal por dia, como é o caso de *Paracheirodon innesi* (Myers, 1936), *Brachydanio rerio* (Hamilton, 1822), *Pelvicachromis pulcher* (Boulenger, 1901) e *Microlepis trichopteros* (Günther, 1861). Já a espécie *Carassius auratus* é mais conhecida por consumir apenas 0,3% do seu peso corporal de alimento por dia (Lewbart, 1998). Quanto aos resultados do presente estudo, *Garra rufa* demonstrou

necessitar de uma quantidade de alimento muito superior (3,2% do seu peso corporal por dia), o que se poderá dever ao facto de terem um metabolismo acelerado, precisando assim de consumir uma quantidade de alimento superior.

A mortalidade observada no ensaio para determinação da frequência ideal no tratamento de duas vezes por dia foi de 10% e no tratamento de três frequências diárias foi de 13,3%, devendo-se ao facto de os peixes conseguirem saltar dos tanques apesar de estes se encontrarem cobertos por redes. É uma espécie que não gosta de mudança de ambiente e por questões de dominância (são bastante agressivos uns com os outros) podem ter tentado saltar dos tanques, já que todos os peixes que faleceram foram encontrados fora dos mesmos.

Como seria esperado, os peixes ficaram mais saciados ao alimentarem-se três vezes por dia do que apenas duas vezes, apesar de ingerirem a mesma quantidade de alimento, refletindo-se ainda num melhor crescimento. Como são peixes com elevado dispêndio de energia, têm um metabolismo muito acelerado, gastando as suas reservas energéticas num espaço de tempo mais curto, necessitando de comer mais vezes por dia. Ao contrário dos autores James & Sampath (2004), que concluíram que para a espécie *Betta splendens* (Regan, 1910) não existem diferenças estatisticamente significativas no crescimento entre comerem duas ou três vezes por dia.

4.2 Verificação da ração formulada: uma boa alternativa?

Os constituintes das rações indicam que em termos teóricos a ração com maior quantidade de proteína é a dieta controlo tendo também um elevado conteúdo lipídico, o que indica que é a ração com maior conteúdo de gordura, podendo criar um aumento de gordura depositada nos peixes, criando um crescimento pouco saudável. A dieta A é a dieta com quantidade de proteína mais baixa, podendo existir um défice de proteína na ração fazendo com que os peixes não cresçam o suficiente, pois podem não ter reservas energéticas suficientes para o seu crescimento. É também a dieta com o conteúdo lipídico mais baixo. A dieta B em termos teóricos será a dieta mais equilibrada nutricionalmente, tendo a quantidade adequada quer de proteína quer de lípidos (Lucas & Southgate, 2005; Mohanta & Subramanian, 2011).

A origem dos constituintes também é muito importante para a comparação das rações. Apesar de não ter sido disponibilizado essa informação, a dieta B é constituída por produtos de origem vegetal e animal, o que poderá também explicar a diferença dos resultados entre as rações. Segundo Lozano *et al.* (2007), dietas com origem animal e vegetal têm um melhor desempenho do que rações apenas com proteína de origem animal. Nos últimos anos, e com maior regularidade, começou-se a substituir cada vez mais os produtos constituintes das rações de origem animal, como óleo ou farinha de peixe, por produtos vegetais, como óleo e farinha de soja ou inserção de algas nas dietas, visto que são produtos com um custo relativamente mais baixo, que também são fáceis de obter e têm uma constituição equilibrada de nutrientes (Lozano *et al.*, 2007; Martinez-Llorens *et al.*, 2009; Tomás *et al.*, 2009). Isto torna a prática de aquacultura mais rentável pois, sendo as rações, dos fatores mais dispendiosos na indústria deste sector (45% dos custos de uma aquacultura), é muito importante reduzir estes custos, sendo uma alternativa rendível, trocar constituintes de ração animal por constituintes vegetais e ter atenção aos nutrientes usados nas dietas (Tomás *et al.*, 2009). Tornaria também a aquacultura mais sustentável, uma vez que a dependência por fontes de origem animal seria diminuída (Martinez-Llorens *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados obtidos para o ensaio propriamente dito, em relação ao parâmetro da sobrevivência, em todas as dietas a sobrevivência foi de 100% e nos três tratamentos os peixes aumentaram tanto em peso como em comprimento ao longo do tempo (figura 10). Este facto também foi comprovado através do índice SGR, que indicou como foi o crescimento dos peixes ao longo do tempo e pelo DGI, crescimento diário durante o ensaio ajudando a entender a variação ao longo do tempo, apesar de estes dois índices só terem sido calculados no fim do ensaio.

Em termos de aumento de peso, apesar de existir um aumento nos três tratamentos, os peixes alimentados com a dieta A foram os que aumentaram menos de peso (figura 10a e 11a), sendo o único tratamento com diferenças estatisticamente significativas. Em relação à variação do comprimento à furca e a variação do comprimento total (figuras 10b, 10c 11b e 11c), foi notável o maior crescimento obtido nos peixes alimentados com a dieta B comparativamente à dieta controlo e à dieta A, existindo diferenças entre todos os tratamentos. Supõe-se que isto pode ter acontecido devido a diversos fatores: i) à percentagem de lípidos ser similar entre a dieta controlo e a dieta B enquanto a percentagem

deste constituinte na dieta A é muito baixa em comparação com os outros tratamentos, ii) a percentagem de proteína ser demasiado elevada na dieta controlo e mais baixa na dieta A e iii) percentagem de hidratos de carbono e vitaminas são diferentes entre os três tratamentos.

Um excesso de proteína presente numa ração torna-se prejudicial ao crescimento do peixe (Lucas & Southgate, 2005; Mohanta & Subramanian, 2011; Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). No presente estudo, a dieta controlo apresenta um excesso de quantidade de proteína que poderá prejudicar o crescimento dos peixes e a dieta A apresenta uma quantidade pequena de lípidos, constituinte este, que é necessário para o crescimento e para constituir as membranas celulares (Lucas & Southgate, 2005; Mohanta & Subramanian, 2011; Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Também são importantes para manter as funções do corpo sendo a única fonte de compostos essenciais (Orvay, 1993; Mohanta & Subramanian, 2011). A dieta A relativamente à variação de peso e comprimentos apresentou os piores resultados porque como foi referido anteriormente, um défice de proteína e lípidos é prejudicial ao crescimento dos peixes - se os peixes não ingerirem a quantidade suficiente de proteína, ocorrerá rapidamente redução e paragem de crescimento ou perda de peso. Neste caso, os peixes utilizarão as reservas acumuladas para manter as funções vitais e os lípidos são uma importante fonte de ácidos gordos e de energia, sendo essenciais para um bom crescimento e sobrevivência dos peixes (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011).

O equilíbrio entre a quantidade de proteína numa dieta e a energia tem um grande impacto sobre a utilização de proteína por parte dos peixes, afetando o rácio entre a oxidação de proteínas para obtenção de energia e a utilização de proteínas na síntese para o crescimento. Também determina o armazenamento de reservas corporais que varia de acordo com as respetivas proporções de macronutrientes fornecidos pela dieta (Mohanta & Subramanian, 2011; Borges *et al.*, 2013). Também já se verificou que os peixes alimentados com uma razão menor de ED:PB (energia digerível: proteína bruta) tinham uma deposição de proteína mais elevada devido ao aumento de consumo de proteínas, podendo afirmar-se que o peixe utiliza as proteínas para manter os requisitos energéticos prejudicando o seu crescimento, já que o nível de proteína também influencia o peso corporal de várias espécies, sendo o constituinte mais fulcral numa ração (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011).

Resumidamente, os peixes quando sujeitos a dietas com maior conteúdo proteico que dietas com baixo teor de proteína, ingerem mais energia metabolizada que aqueles submetidos a um regime proteico mais baixo. Em consequência, utilizam as proteínas com outros fins prejudicando o seu crescimento. Usando dietas mais pobres em lípidos e com excesso de proteínas, os peixes terão que oxidar proteínas para obter energia, uma vez que os lípidos (fonte preferencial de energia) estarão em déficit (Orvay, 1993; Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Por outro lado, se a dieta tiver uma baixa concentração de proteína, como no caso da dieta A, também poderá provocar perda de apetite, redução do crescimento, baixos índices de conversão e menor atividade (Orvay, 1993; Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011).

Um fator importante é a relação entre a quantidade de proteína e a quantidade de lípidos numa dieta. Há autores que defendem que uma dieta saudável é constituída por um elevado teor de proteína de elevada qualidade e baixo teor em gorduras (Barrento *et al.*, 2009). Contudo, se a ração for constituída por uma boa percentagem de proteína e se a quantidade de lípidos numa ração variar entre 8 a 16%, tal potencia e melhora o desempenho do crescimento em algumas espécies como é o caso de *Xiphophorus hellerii* (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Porém, cada vez mais se verifica uma tendência de se formular rações em aquacultura com mais lípidos invés de proteína, para aumentar o crescimento dos peixes e para se poupar no gasto de proteína, visto que a proteína é o constituinte mais caro numa ração (Fernandes *et al.*, 2012).

Em relação aos outros constituintes das dietas, que por motivos já anteriormente referidos, não podem ser revelados neste trabalho, a dieta B é a dieta mais equilibrada de acordo com a bibliografia existente, realçando que os outros constituintes das dietas também têm a sua real importância e influenciam a constituição das dietas podendo ter alguma contribuição nas diferenças existentes entre os tratamentos.

Segundo os autores Lucas & Southgate (2005) e Mohanta & Subramanian (2011), deve-se manter os níveis de hidratos de carbono no intervalo recomendado para as proteínas serem melhor utilizadas, verificando-se que um déficit ou um excesso de hidratos de carbono é prejudicial para o crescimento dos peixes. Dietas que substituam a proteína por igual quantidade de hidratos de carbono têm valores de energia metabolizada mais baixos que as dietas que não substituem a proteína por hidratos de carbono. No entanto, substituir proteína

por hidratos de carbono, faz com que os peixes tenham uma percentagem maior de gordura do que de músculo branco, não apresentando os animais um crescimento saudável, apesar de tal opção tornar a ração mais barata (Orvay, 1993; Halver & Hardy, 2002).

As vitaminas, embora numa percentagem mais reduzida, também são importantes para a constituição da ração ideal já que promovem um correto crescimento, reprodução, bom estado sanitário e ajudam a manter as funções gerais. A falta de vitaminas provoca patologias provocando uma deficiência vitamínica (Orvay, 1993; Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). A dieta B tem a vantagem de possuir um suplemento vitamínico, um ponto forte em relação às outras duas dietas, podendo ser este também um motivo importante nas diferenças observadas entre as dietas.

Os índices SGR (crescimento dos peixes ao longo do tempo) e AGR (aumento médio de peso) comprovam os resultados analisados anteriormente. Ou seja, a dieta A sendo a única com diferenças estatisticamente significativas mostra que foi uma ração que fez com que os peixes apresentassem um défice de crescimento, já que a dieta tem uma baixa concentração lipídica e uma menor concentração de proteína, o que afeta o crescimento dos peixes, juntamente com todos os fatores discutidos anteriormente.

O índice DGI (crescimento diário durante o ensaio) indicou que a dieta A, mais uma vez teve os piores resultados podendo dever-se aos motivos anteriormente mencionados, por sua vez a dieta B apresentou os melhores resultados com diferenças estatisticamente significativas.

Os resultados do índice de condição ajudam a fortalecer que a dieta B é a mais adequada para esta espécie, porque foi a única dieta onde o fator de condição obtido foi mais próximo de 1 e sendo de facto significativamente diferente do controlo e da dieta A. Na dieta A e na dieta controlo este índice indica que não terá ocorrido um crescimento equilibrado entre o peso e o comprimento. Os peixes alimentados com estas dietas terão aumentado o seu peso mas mantido o mesmo comprimento, enquanto os peixes alimentados com a dieta B terão tido um crescimento mais equilibrado, crescendo tanto em peso como em comprimento (Vazzoler, 1982; Campbell *et al.*, 2009). Este valor pode variar em função do teor de gordura, adequação ao meio ambiente e desenvolvimento gonadal (Jobling *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2009; FAO, 2015). É um índice muito utilizado em estudos de

biologia pesqueira, pois indica o grau de bem-estar do peixe frente ao ambiente em que vive (Braga, 1986). O fator de condição reflete aspectos nutricionais recentes e/ou gastos de reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies.

Em relação ao IH, ou seja, à proporção entre o tamanho do fígado e o tamanho do peixe, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as dietas testadas, supondo-se que nenhuma dieta provoca aumento ou diminuição do fígado relativamente ao peso corporal do peixe.

O fator de conversão alimentar (FCR) foi maior na dieta B e menor na dieta controle, embora sem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Bilen & Müge Bilen (2013) demonstraram que para *Carassius auratus* os valores de FCR variam entre 2,9 a 7,7, valores que se assemelham aos obtidos no presente estudo com *Garra rufa*.

As vesículas com maior peso apresentado foram observadas nos tratamentos com a dieta controle e com a dieta B, enquanto a vesícula com o menor peso foi obtida nos peixes alimentados com a dieta A registrando-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre a dieta controle e a dieta A. O comprimento da vesícula dos peixes alimentados com a dieta B foi maior, enquanto os peixes alimentados com a dieta A apresentaram vesículas com um comprimento menor tendo-se verificado que a dieta B apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros tratamentos. Supõe-se que a dieta A é a razão que faz com que os peixes tenham as vesículas de menor dimensão e igualmente de comprimentos menores porque teoricamente a dieta A é que a tem menor quantidade lipídica enquanto a dieta controle e a dieta B têm uma concentração lipídica mais elevada. A função da vesícula biliar é armazenar o suco biliar – produzido pelo fígado e atua na digestão de gorduras para evitar a putrefação de alguns alimentos e na absorção de substâncias nutritivas da dieta ao passarem pelo intestino – que se torna mais concentrado após sair do fígado, aumentando sua potência e intensificando o seu efeito nas gorduras. Se a dieta A tem menor concentração lipídica, a vesícula biliar nos peixes que se alimentam desta dieta também é menor, não estando tão desenvolvida como as vesículas dos peixes que se alimentam das outras dietas, pois não terá uma atuação tão desenvolvida como as vesículas dos peixes alimentados com as dietas controle e B.

A examinação direta da anatomia interna e do estado geral dos peixes indicou que os peixes alimentados com a dieta A encontravam-se com os órgãos em pior estado (100%), com a cavidade abdominal negra (100%), e com uma maior percentagem de indivíduos imaturos (14,3%), entre outras. Verificou-se que 100% dos indivíduos analisados para a dieta B e 69% dos indivíduos alimentados com a dieta controlo apresentavam os órgãos avermelhados e com um aspeto saudável, enquanto na dieta A tal não foi observado (0%). Estes aspetos poderão ter sido afetados pelo tipo de dieta a que os peixes foram sujeitos (por todos os pontos já discutidos anteriormente), ou seja, a dieta A foi a pior dieta dada aos peixes, supondo-se que seja devido à baixa concentração de lípidos, proteína e falta de vitaminas. Também pode ser devido a ter uma maior percentagem de proteína vegetal que as outras dietas pois, sendo estes peixes de metabolismo muito acelerado, a ração pode ter défice de proteína animal, essencial para o crescimento de *Garra rufa*. Por outro lado, nos indivíduos alimentados pela dieta B em que se observaram os órgãos com um aspeto mais saudável e mais avermelhados, tal poderá dever-se aos seguintes factos: (i) existência de um maior equilíbrio entre a percentagem dos vários constituintes; (ii) a origem dos constituintes pode ser a mais adequada a esta espécie e (iii) a dieta B ter uma maior proporção relativa de vitaminas comparativamente às restantes, o que pode ser uma mais-valia nesta ração (Lucas & Southgate, 2005, Martinez-Llorens *et al.*, 2009; Mohanta & Subramanian, 2011; Fernandes *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013).

Outro aspeto de grande relevância é o facto de a dieta B ter sido feita de modo artesanal, o que poderia ter provocado falta de apetite aos peixes visto que a textura seria distinta das restantes rações, mas tal não aconteceu. E ter sido feita com ingredientes inovadores, tanto de origem animal como de origem vegetal, bem como, ter um custo de produção mais baixo que as outras rações. Atualmente utilizar óleos de origem vegetal bem como proteína de origem vegetal são válidos para rações de peixes como alternativas sustentáveis para uma aquacultura (Dias *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012). Outro aspeto relevante a ter em consideração é que a dieta B é constituída por ingredientes com uma disponibilidade facilitada. O facto de ter o conhecimento prévio sobre as preferências alimentares desta espécie foi bastante útil para ajudar na formulação da ração. Visto que de acordo com a literatura esta espécie é omnívora (Sayili *et al.*, 2007; Jarvis, 2011), apresenta uma vasta gama de itens na sua dieta alimentar em meio natural. Deste modo, tal permitiu inserir diferentes ingredientes e inovadores que ajudaram a tornar a dieta B mais rica

nutricionalmente e, possivelmente, a mais parecida com a alimentação natural desta espécie, aumentando a procura dos peixes por esta ração.

5. Conclusão

O presente trabalho permitiu a definição da dose *ad libitum* e a frequência ideal necessária para a espécie *Garra rufa*, contribuindo de maneira significativa para a área de nutrição em peixes ornamentais. Este estudo, eventualmente o primeiro a abordar a performance zootécnica destes peixes, vem ajudar a colmatar as lacunas nesta área face ao grande desconhecimento científico que envolve a produção desta espécie.

A dose *ad libitum* determinada foi de 0,04 g.dia⁻¹ por peixe, o que corresponde a 3,2% do peso corporal dos peixes da classe de tamanho testada (peso médio 1,2500 g ± 0,017; comprimento médio 5,0 cm ± 0,025), enquanto a frequência ideal da alimentação, capaz de sustentar um maior crescimento dos peixes, foi de três vezes ao dia.

A ração formulada (dieta B) revelou mais vantagens comparativamente com as outras rações, quer a nível dos parâmetros zootécnicos quer na qualidade dos ingredientes, ainda que a taxa de sobrevivência para cada tratamento tenha sido de 100%. Os ingredientes utilizados na formulação desta ração, apesar de não poderem ser revelados, tornam a ração mais semelhante ao alimento natural da espécie, para além de serem mais ricos nutricionalmente para os peixes. O fator económico, associado à redução de custos envolvidos na sua produção, também é conseguido, uma vez que se consegue uma quantidade mais equilibrada entre proteínas e lípidos na ração formulada, face às restantes testadas.

Apesar de nos três tratamentos os peixes terem apresentado um crescimento positivo, tanto no peso como no comprimento, analisando todos os resultados anteriormente descritos, pode-se concluir que a dieta A foi a menos favorável, enquanto a dieta B claramente foi a melhor, tendo apresentado os melhores resultados quer a nível de crescimento, parâmetros zootécnicos e através das observações percentuais da anatomia interna e do estado geral dos peixes.

Este estudo revela-se de uma grande importância ao estabelecer uma ração adequada a esta espécie que substitua o alimento natural. Esta ração, formulada no presente trabalho, contribui para o rápido crescimento dos peixes de forma saudável, com a vantagem de conseguir uma maior percentagem de lucro, para além de garantir que os parâmetros de qualidade da água se mantenham satisfatórios.

6. Perspetivas futuras

Como complemento a este estudo e contributo ao desenvolvimento científico nesta área sugere-se a realização de outras análises no futuro, nomeadamente:

1. Confirmar se os valores teóricos dos constituintes das três rações aplicadas neste estudo correspondem aos valores efetivos das mesmas, análises essas que poderão ser efetuadas através de:
 - ✓ Análises de perfil lipídico (Cromatografia Gasosa - GC)
 - ✓ Perfil de aminoácidos (Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC)
 - ✓ Proteína Bruta (Método de Kjeldahl)
 - ✓ Gordura total (Método Bligh & Dyer),
 - ✓ Cinzas
 - ✓ Energia bruta.
2. Avaliar a performance zootécnica de crescimento dos peixes *Garra rufa* com as mesmas dietas mas usando outras classes de comprimento.
3. Compreender se a dose *ad libitum* teria efeitos similares noutras classes de comprimento e se seria a mesma.
4. Analisar os órgãos dos peixes, em termos microbiológicos e bioquímicos, a fim de determinar quais os efeitos das dietas testadas nos peixes.
5. Determinar o efeito da dieta formulada no comportamento do peixe no que respeita à ictioterapia.

7. Referências bibliográficas

- Barrento, S., Marques, A., Teixeira, B. Anacleto, P., Vaz-Pires, P., Nunes, M. L. 2009. Effect of season on the chemical composition and nutritional quality of the edible crab *Cancer pagurus*. Journal of agricultural and food chemistry 57, 10814–10824.
- Baeck, G-W., Kim, J-H., Choresca, C. Jr., Gomez, D. K., Shin, S-P, Han, J-E, Park, S-C. 2009. Mass Mortality of Doctor Fish (*Garra rufa obtusa*) Caused by *Citrobacter freundii* Infection. Journal of Veterinary clinic 26, 150-154.
- Bilen, S. & Müge Bilen, A. 2013. Effects of different protein sources on growth performance and food consumption of goldfish, *Carassius auratus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 12, 717-722.
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L., Valente, L. M. P. 2009. Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. British Journal of Nutrition 102, 1007 – 1014.
- Borges, P., Medale, F., Dias, J., Valente, L. M. P. 2013. Protein utilisation and intermediary metabolism of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) as a function of protein:lipid ratio. British Journal of Nutrition 109, 1373 – 1381.
- Campbell, M. D., Patino, R., Tolan, J., Strauss, R., and Diamond, S. L. 2010. Sublethal effects of catch-and-release fishing: measuring capture stress, fish impairment, and predation risk using a condition index. Journal of Marine Science 67, 513–521.
- Dias, J., Conceição, L. E. C., Ribeiro, A. R., Borges, P., Valente, L. M. P, Dinis, M. T. 2009. Practical diet with low fish-derived protein is able to sustain growth performance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during the grow-out phase. Aquaculture 293, 255 – 262.
- Elangovan, A. & Shim, K. F. 1997. Growth response of juvenile *Barbodes altus* fed isocaloric diets with variable protein levels. Aquaculture 158, 321-329.
- Engrola, S., Conceição, L. E. C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M. T. (2007). Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. Aquaculture Research 38, 696-707.
- FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Roma.
- Fernandes, T. J. R., Alves, R. C., Souza, T., Silva, J. M. G., Castro-Cunha, M., Valente, L. M. P., Oliveira, M.B.P.P. Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup,1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein sources. Food Chemistry 134, 1337 – 1342.
- Fracalossi, D. M., Allen, M. E., Nichols, D. K., Oftedal, O. T. 1998. Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. Journal Nutrition 128, 1745-1751.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R. 2001. Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.

- Halver, J. E & Hardy, R. W. 2002. Fish Nutrition. Academic Press.
- Henriques, M.A.R. 1998. Manual de aquacultura. Instituto de ciências Biomédicas de Abel Salazar, Porto.
- James, R. & Sampath, K. 2004. Effect of feeding frequency on growth and fecundity in an ornamental fish, *Betta splendens* (regan). The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 56, 136-145.
- Jarvis, P. L. 2011. Biological Synopsis of *Garra rufa*. Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2946.
- Jobling, M., Meloy, O. H., Santos, J., Christiansen, B. 1994. The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history. Aquaculture International 2, 75-90.
- Kastelein, R. A., Schooneman, N. M., Wiepkema, P. R. 2000. Food consumption and body weight of captive Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*). Aquatic Mammals 26.3, 175 – 190.
- Landau, M. 1992. Introduction of Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc. Canada.
- Lewbart, G. A. 1998. Clinical Nutrition of Ornamental Fish. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Vol 7, No 3, pp 154-158.
- Lim, L. C., Dhert, P., Sorgeloos, P. 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. Aquaculture 227, 319-331.
- Livengood, E. J. & Chapman, F.A. 2007. The Ornamental Fish Trade: An Introduction with Perspectives for Responsible Aquarium Fish Ownership. IFAS Extension, University of Florida.
- Lovell, R. T. 2000. Nutrition of ornamental fish. En: Bonagura J (Ed.), Kirk's Current Veterinary Therapy XIII-Small Animal Practice. W.B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Lozano, N. B. S., Vidal, A. T., Martínez-Llorens, S., Mérida, S. N., Blanco, J. E., López, A. M., Torres, M. P., Cerdá, M. J. 2007. Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal. Aquaculture 272, 528 – 534.
- Lucas, J.S. & P.C. Southgate. 2005. Aquaculture – Farming aquatic animals and plants. Blackwell Publishing, Victoria.
- Majtán, J., Černý, J., Ofúkaná, A., Takáč, P., Kozánek, M. 2012. Mortality of therapeutic fish *Garra rufa* caused by *Aeromonas sobria*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2, 85-87.

- Martínez-Llorens, S., Vidal, A. T., Garcia, I. J., Torres, M. P., Cerdá, M. J. 2009. Optimum dietary soybean meal level for maximizing growth and nutrient utilization of on-growing gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition* 15, 320-328.
- Mestre, P. 2008. Elaboração de um projeto de uma unidade de piscicultura. Mestrado integrado em medicina veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, pp. 1-115.
- Mohanta, K. N. & Subramanian, S. 2011. Nutrition of common freshwater ornamental fishes. ICAR Research Complex for Goa. Old Goa- 403 402, Goa, India.
- Orvay, F. C. 1993. Aquicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. *Ciències Experimentals 4: Matemàtiques*. Universitat de Barcelona.
- Neto, G. M. S. 2011. Avaliação do desempenho de sacos suspensos na coluna de água para o cultivo de bivalves na Ria de Aveiro, com ênfase para a ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) e a amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*). Dissertação de Mestrado em Aquicultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Instituto Politécnico de Leiria.
- Pannevis, M. C. & Earle, K. E. 1994. Maintenance energy requirement of five popular species of ornamental fish. *Journal Nutrition* 124, 2616-2618.
- Pelicice, F. M. & Agostinho, A. A. 2005. Perspectives on ornamental fisheries in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Fisheries Research* 72, 109 – 119.
- Roberts, H. E. 2010. Fundamentals of ornamental fish health. Wiley-Blackwell. USA. pp. 25-32.
- Ruane, N. M., Collins, E.M., Geary, M., Swords, D., Hickey, C., Geoghegan, F. 2013. Isolation of *Streptococcus agalactiae* and an aquatic birnavirus from doctor fish *Garra rufa* L. *Irish Veterinary Journal* 66, 16.
- Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R.W., Sloman, K.A. 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science* 125, 195 – 205.
- Sayili, M., Akca, H., Duman, T., Esengun, K. 2007. Psoriasis treatment via doctor fishes as part of health tourism: A case study of Kangal Fish Spring, Turkey. *Tourism Management* 28, 625-629.
- Truisty, M. 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205, 203 – 219.
- Tomás, A., Martínez-Llorens, S., Jover, M. 2009. The effect of dietary soybean meal on growth, nutrient utilization efficiency, and digestibility of juvenile common dentex, *Dentex dentex* (actinopterygii: perciformes: sparidae). *Acta ichthyologica et piscatoria* 39, 19 – 25.

Trbovic', D., Markovic, Z., Milojkovic- Opsenica, D., Petronijevic, R., Spiric, D., Djinovic-Stojanovic, J., Spiric, A. 2013. Influence of diet on proximate composition and fatty acid profile in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of food composition and analysis 31, 75-81.

Velasco-Santamaría, Y. & Corredor- Santamaría, W. 2011. Nutritional requirements of freshwater ornamental fish: a review. Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia 16, 2458-2469.

Yanong, R. P. E. 2001. BSAVA Manual of ornamental fish. British Small Animal Veterinary Association.

Recursos eletrónicos:

Bourne, J. K. 2014. Aquicultura. National Geographic Portugal. Disponível em: <http://www.nationalgeographic.pt/index.php/artigos-arquivados/arquivo/70-159/225aquicultura>. Acedido a 28 de Dezembro de 2014.

Country List. 2015. Garra rufa was reported from 8 countries/islands. Fishbase. Disponível em:<http://fishbase.sinica.edu.tw/country/CountryList.php?id=26483&genusname=Garra&speciesname=rufa&lang=vietnamese>. Acedido a 17 de Janeiro de 2015.

8. Anexos



EVENT ABSTRACT

[← Back to Event](#)

Estimation of the ideal dosage and feeding frequency for *Garra rufa* (Cyprinidae)

Mafalda M. R. S. Catarino¹, Mónica R. S. Gomes¹, Sílvia C. Gonçalves^{1, 2} and Susana M. F. Ferreira^{1, 3*}

¹ MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic Institute of Leiria, Portugal

² MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Portugal

³ CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

Garra rufa are widely used in skin treatments at beauty and wellness institutes. This freshwater species is native from Eurasia and has a large distribution area, including river basins in Turkey and Iran. It has a high commercial value and arouse interest among fish farmers. Even so,

G. rufa methods of production are still unknown. In fact, aspects that sustain a rapid and healthy growth of these fish need to be investigated, like an adequate daily dose and feeding frequency. This work aimed to establish: 1) the optimal feed dose per day, correspondent to the amount necessary for obtaining satiation, with a commercial granulated food; and 2) the optimal frequency of feeding for intensive production of *G. rufa* in Aquaculture. A total of 60 fishes underwent a 3 weeks acclimation period in laboratory, distributed by 6 aquaria, containing 10 fishes with similar body weight and length. The animals were initially fed with a dose correspondent to 10% of their body weight. This dose was gradually increased until complete satiation of the fishes. An optimal dose of 0.04 g fish⁻¹ day⁻¹ was found. Afterwards, the same fishes went through a 1 month experimental trial to evaluate the ideal feeding frequency. Fish growth was compared between feeding 0.2 g twice per day and 0.1333 g three times per day. Variations in size (total and fork length), plus body weight were evaluated at the end of the trial. One-Way ANOVA procedures revealed that the variations in weight and in fork length were similar between treatments, but the variation in total length was significantly higher with 3 daily feeding moments ($p < 0.05$). In conclusion, the present results showed that the optimal dose that ensures satiation for *G. rufa* is 0.04 g fish⁻¹ day⁻¹ and that 3 daily feeding moments promotes higher growth rates.

Acknowledgements

This work was developed in the scope of the project “SpaGaRufa – Production of the fish *Garra rufa* for therapeutic purposes”, an Ignition Fund INOV C, co-financed by the Operational Programme of the Centre Region (+ CENTRO), National Strategic Reference Framework (QREN 2007-2013) and the European Fund for Regional Development, developed by GIRM-IPL – Group of Investigation in Marine Resources from the Polytechnic Institute of Leiria.

Keywords: Aquaculture, Diet, Doctor fish, Growth, ad libitum

Conference: XV European Congress of Ichthyology, Porto, Portugal, 7 Sep - 11 Sep, 2015.

Presentation Type: Poster Presentation Topic: Physiology, Behavior and Toxicology

Citation: Catarino M, Gomes M, Gonçalves S and Ferreira S (2015). Estimation of the ideal dosage and feeding frequency

[Abstract Info](#)[Abstract](#)[Supplemental Data](#)[Export Citation](#)[The Authors in](#)[Frontiers](#)[Google](#)[Google Scholar](#)[PubMed](#)[Related Article](#)[in Frontiers](#)[Google Scholar](#)[PubMed](#)

for Garra rufa (Cyprinidae). *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology*. doi: 10.3389/conf.fmars.2015.03.00076

Received: 11 Nov 2015; Published Online: 17 Nov 2015.

* Correspondence: Prof. Susana M. F. Ferreira, MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic Institute of Leiria, Peniche, 2520-641, Portugal, susana.ferreira@ipleiria.pt

[Back to top ▲](#)

[Home](#)
[About Frontiers](#)
[Journals A-Z](#)
[Institutional Membership](#)

[Contact](#)
[Press Relations](#)
[News](#)
[Blog](#)

[Submit](#)
[FAQs](#)
[Terms & Conditions](#)

[Newsletters](#)
[RSS/Twitter](#)
[Team](#)
[Careers](#)



© 2007 - 2015 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved



EVENT ABSTRACT

[« Back to Event](#)

Insights on the Reproduction and Embryonic Development of *Garra rufa* (Cyprinidae)

Mónica R S Gomes¹, Mafalda M R S Catarino¹, Sílvia C Gonçalves^{1, 2} and Susana M F Ferreira^{1, 3*}

¹ MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic Institute of Leiria, Portugal

² MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Portugal

³ CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

Garra rufa is a small freshwater benthopelagic cyprinid, originally from Southwest Asia, which has become economically relevant during the last decade. *G. rufa* is a worthy element to control algae growth in aquariophilia, but it is mostly known for its use in treatments of skin problems in spa's and clinics. It was made an attempt to reproduce *G. rufa* in captivity, in order to respond to an increasing marketing demand for this fish, plus to get an insight on its reproductive biology and embryonic development.

Groups of 5 *G. rufa* were inserted in twelve aquaria of 20 l, with an internal filter, aeration and placed in a controlled temperature room at 26°C. A net placed 1.5 cm above the bottom prevented the fish from eating their own eggs. The fishes were fed three times per day and checked for the presence of eggs. The eggs were removed, placed on separate aquaria and photographed hourly at a Leica DM2000LED compound microscope, equipped with a Leica DMC2900 camera

G. rufa showed almost no sexual dimorphism, except for the presence of tubercles on the snout of males, which appeared only during the reproduction period. Males were larger than females and executed high velocity persecutions after them.

In a total of 28 postures, only 17 resulted in newly born fish. This was mostly due to fungal development around the eggs that caused the embryos to degenerate. There was a hatching success of 60%. The eggs showed no adhesive properties, being deposited on the bottom. The most prominent structures of the embryos were noticeable after: 3h - tail bud; 6h - optic primordium; 10h - heart beating; 15h - pectoral fins buds. They hatched between 24 to 48h and the larvae consumed the yolk sac in 48h.

Acknowledgements

This work was developed in the scope of the project “SpaGaRufa – Production of the fish *Garra rufa* for therapeutic purposes”, an Ignition Fund INOV C, co-financed by the Operational Programme of the Centre Region (+ CENTRO), National Strategic Reference Framework (QREN 2007-2013) and the European Fund for Regional Development, developed by GIRM-IPL – Group of Investigation in Marine Resources from the Polytechnic Institute of Leiria.

Keywords: Aquaculture, Doctor fish, Growth, Embryonic Development, Cyprinid

Conference: XV European Congress of Ichthyology, Porto, Portugal, 7 Sep - 11 Sep, 2015.

Presentation Type: Poster Presentation Topic: Physiology, Behavior and Toxicology

[Abstract Info](#)[Abstract](#)[Supplemental Data](#)[Export Citation](#)[The Authors in](#)[Frontiers](#)[Google](#)[Google Scholar](#)[PubMed](#)[Related Article](#)[in Frontiers](#)[Google Scholar](#)[PubMed](#)

Citation: R S Gomes M, M R S Catarino M, C Gonçalves S and M F Ferreira S (2015). Insights on the Reproduction and Embryonic Development of Garra rufa (Cyprinidae). *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology*. doi: 10.3389/conf.fmars.2015.03.00085

Received: 12 Nov 2015; Published Online: 17 Nov 2015.

* Correspondence: Prof. Susana M F Ferreira, CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Coimbra, 3001-401, Portugal, susana.ferreira@ipleiria.pt

[Back to top ▲](#)

Home	Contact	Submit	Newsletters
About Frontiers	Press Relations	FAQs	RSS/Twitter
Journals A-Z	News	Terms & Conditions	Team
Institutional Membership	Blog		Careers

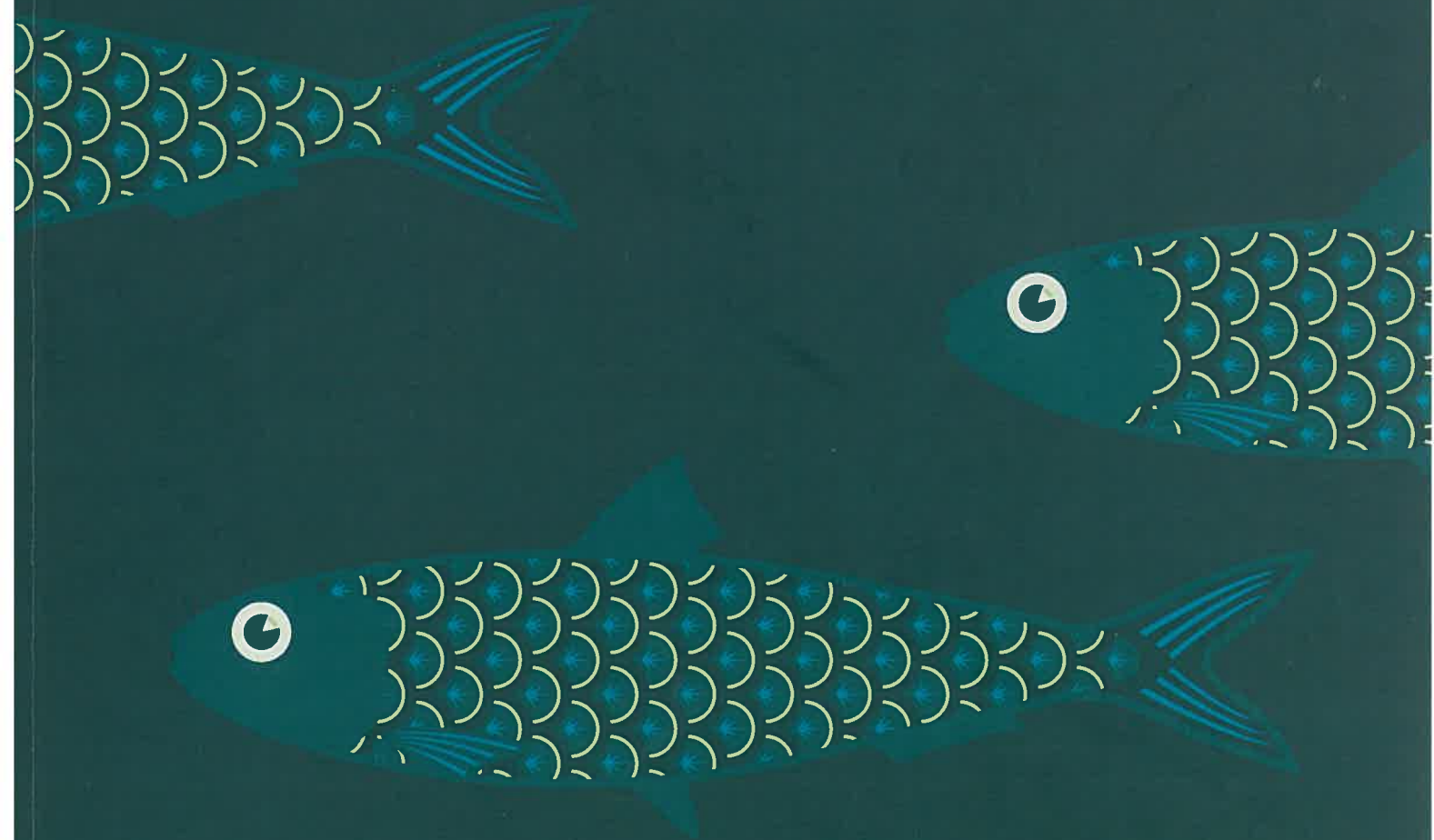


© 2007 - 2015 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved

XV

EUROPEAN CONGRESS OF ICHTHYOLOGY

ABSTRACT BOOK



Estimation of the ideal dosage and feeding frequency for *Garra rufa* (Cyprinidae)

Catarino MMRS¹, Gomes MRS¹, Gonçalves SC^{2,1} and Ferreira SMF^{3,1*}

¹ MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic Institute of Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal

² MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

³ CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Apartado 3046, 3001-401 Coimbra, Portugal

*Corresponding author: susana.ferreira@ipleiria.pt

Garra rufa are widely used in skin treatments at beauty and wellness institutes. This freshwater species is native from Eurasia and has a large distribution area, including river basins in Turkey and Iran. It has a high commercial value and arouse interest among fish farmers. Even so, *G. rufa* methods of production are still unknown. In fact, aspects that sustain a rapid and healthy growth of these fish need to be investigated, like an adequate daily dose and feeding frequency. This work aimed to establish: 1) the optimal feed dose per day, correspondent to the amount necessary for obtaining satiation, with a commercial granulated food; and 2) the optimal frequency of feeding for intensive production of *G. rufa* in Aquaculture. A total of 60 fishes underwent a 3 weeks acclimation period in laboratory, distributed by 6 aquariums, containing 10 fishes with similar body weight and length. The animals were initially fed with a dose correspondent to 10% of their body weight. This dose was gradually increased until complete satiation of the fishes. An optimal dose of 0.4 g day⁻¹ 10 fish⁻¹ was found. Afterwards, the same fishes went through a 1 month experimental trial to evaluate the ideal feeding frequency. Fish growth was compared between feeding 0.2 g twice per day or 0.1333 g three times per day. Variations in size (total and fork length), plus body weight were evaluated at the end of the trial. One-Way ANOVA procedures revealed that the variations in weight and in fork length were similar between treatments, but the variation in total length was significantly higher with 3 daily feeding moments ($p < 0.05$). In conclusion, the present results showed that the optimal dose that ensures satiation for *G. rufa* is 0.4 g day⁻¹ 10 fish⁻¹ and that 3 daily feeding moments promotes higher growth rates.

Theme Session: Physiology, Behaviour and Toxicology

Presentation type: Poster

Spatial and temporal fish diversity patterns from Santa Catarina Island, Brazil

Cattani AP^{1*}, Ribeiro GC², Spach HL¹, Correia AT^{3,4} and Silva MH⁵

¹ Graduate Program in Coastal and Oceanic Systems, Marine Studies Center Federal University of Paraná, Brasil

² Federal University of Santa Catarina, Marine Studies Group, University Campus, SC, Brazil

³ Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Rua dos Bragas 289, 450-123 Porto, Portugal

⁴ Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. Rua Carlos da Maia 296. 4200-1250 Porto. Portugal

⁵ Centro Universitário Norte do Espírito Santo—CEUNES—UFES—Rodovia BR 101 Norte, Km. 60, Bairro Litorâneo, São Mateus—ES 29.932-540 Brazil

*Corresponding author: cattani.andre@gmail.com

The Santa Catarina Island has a mosaic of ecosystems, with great importance for the fishes. There is the presence of estuaries, lagoons, mangroves and sandy beaches in the same island. Thus, the objectives of this study were to evaluate the spatio and temporal fish diversity patterns in estuaries, lagoons and beach systems of Santa Catarina Island, Santa Catarina, Brazil. Fish data collected between 1983 to 2011 in the baía Norte, saco dos Limões, Itacorubi and Ratoões mangroves, Conceição lagoon and Índio beach was analyzed. Fish were sampled with different gear techniques. In the North Bay and saco dos Limões individuals were caught by trawl, but in the mangroves and lagoon were used gillnets, cast nets and dip nets. In the Índio beach the fishes were collected using fyke nets. For each local, species accumulation curves were plotted to compare the observed pattern with modelled data, using first order Jackknife estimator. Species richness differences among locals and seasons were tested using PERMANOVA, followed by a canonical analysis of principal coordinates (CAP). To assess the taxonomic structures at each location, the average taxonomic distinctness (AvTD) and the variation in taxonomic distinctness (VarTD) were also used. Higher average species richness was found in the saco dos Limões (mean \pm SE; 59.8 \pm

and logistic regression performed best, although all approaches predicted non-native fish establishment with moderate to excellent results. Detailed evaluation among the models corresponded with differences in variables importance, with three biological variables (parental care, distance from nearest native source and maximum size) and two variables of human interest (prior invasion success and propagule pressure) being important in predicting establishment. The analyzed statistical methods presented have a high predictive power and can be used as a risk assessment tool to prevent future freshwater fish invasions in this region with an imperiled fish fauna.

Theme Session: Ecology, Conservation and Invasive Species
Presentation type: Oral

Fish Biodiversity in the Mediterranean Coast of Israel

Golani D^{1*}

¹ Dept. of Ecology, Evolution & Behavior, Hebrew University, 91904 Jerusalem, Israel

*Corresponding author: dani.golani@mail.huji.ac.il

Located at the far eastern edge of the Mediterranean and near the northern entrance to the Suez Canal, Israeli Mediterranean waters are experiencing dynamic changes in ichthyofauna. The total number of Israeli Mediterranean fish species is 448, of which the vast majority is of Atlanto-Mediterranean origin. But many species have migrated via the Suez Canal into this area ("Lessepsian migrants"); eighty-eight (out of nearly 100 known Red Sea migrant fish species) have been recorded so far in Israel. The rate of Lessepsian migration has increased sharply; since the beginning of the 21st century, 30 new fish species have been recorded. Most Lessepsian migrant fish are found in shallow waters where they constitute 60-70% of the biomass. This Lessepsian migration and consequent population establishment is profoundly changing the entire structure of Israeli and Eastern Mediterranean ichthyofauna.

Theme Session: Ecology, Conservation and Invasive Species
Presentation type: Oral

Insights on the Reproduction and Embryonic Development of *Garra rufa* (Cyprinidae)

Gomes MRS¹, Catarino MMRS¹, Gonçalves SC^{2,1} and Ferreira SMF^{3,1*}

¹ MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic Institute of Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal

² MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

³ CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Apartado 3046, 3001-401 Coimbra, Portugal

*Corresponding author: susana.ferreira@ipleiria.pt

Garra rufa is a small freshwater benthopelagic cyprinid, originally from Southwest Asia, which has become economically relevant during the last decade. *G. rufa* is a worthy element to control algae growth in aquariophilia, but it is mostly known for its use in treatments of skin problems in spa's and clinics. It was made an attempt to reproduce *G. rufa* in captivity, in order to respond to an increasing marketing demand for this fish, plus to get an insight on its reproductive biology and embryonic development. Groups of 5 *G. rufa* were inserted in twelve aquaria of 20 l, with an internal filter, aeration and placed in a controlled temperature room at 26°C. A net placed 1.5cm above the bottom prevented the fish from eating their own eggs. The fishes were fed three times per day and checked for the presence of eggs. The eggs were removed, placed on separate aquaria and photographed hourly at a Leica DM2000LED compound microscope, equipped with a Leica DMC2900 camera. *G. rufa* showed almost no sexual dimorphism, except for the presence of tubercles on the snout of males, which appeared only during the reproduction period. Males were larger than females and executed high velocity persecutions after them. In a total of 28 postures, only 17 resulted in newly born fish. This was mostly due to fungal development around the eggs that caused the embryos to degenerate. Among these last, there was a hatching success of 60%. The eggs showed no adhesive properties, being deposited on the bottom. The most prominent structures were noticeable after: 3h - tail bud; 6h - optic primordium; 10h - heart beating; 15h - pectoral fins buds. They hatched between 24 to 48h and the larvae consumed the yolk sac in 48h.

Theme Session: Physiology, Behaviour and Toxicology
Presentation type: Poster

Ontogenetic Development of the Stomach in *Scyliorhinus canicula*

Gonçalves OM^{1,2}, Castro LFC¹, Freitas R³, Barroso F³, Ferreira P^{1,2}, Mazan S⁴ and Wilson JM^{1,5*}

¹ Laboratory of Molecular Ecophysiology CIIMAR/CIMAR University of Porto, Portugal

² Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, ICBAS, University of Porto, Portugal

³ Instituto de Biologia Molecular e Celular, IBMC, University of Porto, Portugal

⁴ Station Biologique Roscoff, France

⁵ Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo Canada

*Corresponding author: wilson.jm.cimar@gmail.com

The gastrointestinal tract (GIT) of vertebrates develops from a simple undifferentiated tube into highly differentiated regions for the digestion and absorption of nutrients. Each region has a different histological structure and gene expression profile that enables the performance of their different functions. The stomach is the most highly derived GIT region and gastric glands are responsible for the secretion of HCl and pepsinogen that enables acid-peptic digestion, representing a functional innovation found exclusively in jawed vertebrates. The mechanisms of GIT organ specification are well studied in some vertebrates including mouse, *Xenopus*, chicken and some teleost fishes. General embryonic development has been studied in chondrichthyans but not GIT development (Ballard et al. 1993 JexpZool267:318). In this study we characterize the development of the GIT in the catshark *Scyliorhinus canicula*, an elasmobranch with a ~5 month development spanning 34 developmental stages. As a representative of basal jawed vertebrate for which genomic information is currently available, the catshark became a suitable model system to characterize the ancient expression and function developmental of physiologically relevant genes. Therefore, during this study we used embryos from a brood stock held in our fish facility to conduct gene expression, protein detection and histological analyses. Our aim was to characterize, molecular and morphologically, the stomach development and the differentiation of its characteristic secreting glands. The differentiation of the stomach from the intestine seems to be around stage 24. The immunohistochemistry indicates a later gastric glands development visible before the hatching at stage 34.

Supported by NSERC to JMW.

Theme Session: Physiology, Behaviour and Toxicology
Presentation type: Poster

Comparative population genetic structure and demographic patterns of two killifish species (*Aphanius baeticus* and *Aphanius iberus*) at the Iberian Peninsula

Gonzalez EG^{1*}, Pedraza C¹, Cunha C¹, Oliva-Paterna F², Torralva M² and Doadrio I¹

¹ Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, MNCN-CSIC, José

Gutiérrez Abascal, 2; 28006 Madrid, Spain

² Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Murcia; 30100 Murcia, Spain

*Corresponding author: elenag@mncn.csic.es

The killifish, *Aphanius baeticus* and *Aphanius iberus* (Cyprinodontidae) are endemic species restricted to river basins on Spain's southern Atlantic and Mediterranean coastline, respectively. As a secondary fresh-water fish fauna of the Iberian Peninsula basin, their distribution is primary restricted to local coastal streams, salt water creeks, and man-made salt evaporation ponds, which are susceptible to periodical flood and drought events. For small species with low dispersal capacity such as *A. baeticus* and *A. iberus* these events may influence severely in their demography. However, despite having similar ecological traits and living in similar environmental conditions, both species show striking differences in their levels of genetic diversity and demography. Other factors, such as historical events and more recently human-mediated threats may have contributed differently in shaping current genetic structure of killifish ichthyofauna from the Iberian Peninsula. In this work, we present comparative genetic structure, diversity and historical demography analyses of *A. baeticus* and *A. iberus* using mitochondrial (cytochrome *b*, gene) and nuclear (microsatellite) markers in both natural and introduced populations across their



ACTAS DEL
XV

CONGRESO NACIONAL Y
I CONGRESO IBÉRICO DE
ACUICULTURA

CASA COLÓN 13/16 OCTUBRE
HUELVA 2015
ACUICULTURA, CULTIVANDO EL FUTURO



ORGANIZAN:



**Sociedad
Española de
Acuicultura**



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Utilização do anestésico MS-222 em peixes ciprinídeos *Garra rufa* (Heckel, 1843)

S. M. F. Ferreira ^{*1,2}, M. R. S. Gomes ², M. M. R. S. Catarino ², I. F. A. Afonso ²,
C. B. C. L. Simões ², A. Pombo ², Teresa Baptista ² e S. C. Gonçalves ^{2,3}

¹ CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Apartado 3046, 3001-401 Coimbra, Portugal.

E-mail: susana.ferreira@ipleiria.pt

² MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Superior School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic Institute of Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal

³ MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

Abstract

A trial was conducted to evaluate the anesthetic efficacy of MS-222 in *G. rufa* and to determine the minimum concentration required for performing routine procedures, in order to evaluate the physical condition of these fish in aquaculture. In a committed relationship between the faster induction and recovery times, with full immobilisation of the fishes during 90s, the concentration 425 mg l⁻¹ of MS-222 appeared to be the most effective.

Resumo

Realizou-se um ensaio para avaliar a eficácia anestésica de MS-222 em *G. rufa*, bem como para determinar a concentração mínima necessária, para executar procedimentos rotineiros de avaliação da condição física destes peixes, em aquacultura. Numa relação de compromisso entre os tempos mais rápidos de indução e de recuperação, com imobilização total dos peixes em 90s, a concentração 425 mg l⁻¹ de MS-222 pareceu ser a mais eficaz.

Introdução

O ciprinídeo *Garra rufa* (Heckel, 1843) é conhecido como peixe doutor e tem em elevado valor económico. Existe uma elevada procura de mercado destes animais, quer em termos de aquariofilia, quer para tratamentos de pele, em clínicas e spa's. Por estes motivos, há interesse em produzir *G. rufa* em aquacultura e a sua utilização em procedimentos terapêuticos e/ou experimentais envolve questões do foro ético e moral. A Directiva 2010/63/CE recomenda o uso de anestésicos durante os procedimentos que envolvem animais vertebrados e cefalópodes, a fim de evitar causar-lhes angústia, sofrimento, dor e possíveis danos permanentes. Assim, realizou-se um ensaio para avaliar a eficácia anestésica de MS-222 em *G. rufa*, bem como para determinar a concentração mínima necessária, para executar procedimentos rotineiros de avaliação da condição física destes peixes, em aquacultura.

Materiais e Métodos

Peixes *G. rufa* foram adquiridos e mantidos em aquários independentes de 20 l, com um sistema *Venturi* de filtragem interna. Os peixes foram aclimatados durante 2 semanas, alimentados três vezes por dia *ad libitum* e a água em seus sistemas foi parcialmente substituída a cada semana. Os peixes foram distribuídos em grupos de 10 indivíduos com tamanho semelhante (4 a 5 cm de comprimento total). Estes foram submetidos a 12 concentrações diferentes de MS-222, de 125 a 425 mg l⁻¹, com um incremento de 25 mg l⁻¹. Os procedimentos anestésicos foram realizados com água dos sistemas de cultivo (Ackerman *et al.*, 2005), com forte arejamento e os seguintes parâmetros de qualidade de água doce: 20°C, pH 7,5, NH₄⁺ <0,28mg l⁻¹; NO₃⁻ <0,42 mg l⁻¹, NO₂⁻ <17,1 mg l⁻¹. Os peixes foram mantidos em jejum durante o dia do ensaio (Treves-Brown, 2000). Eles foram monitorizados desde a sua inserção em um recipiente com solução anestésica e forte arejamento. O tempo de indução da anestesia foi medido até que o peixe se imobilizasse prostrado lateralmente, sem movimentos operculares. Posteriormente, avaliou-se o seu comprimento total, biomassa e possíveis movimentos durante 90 s. Em seguida, os peixes foram inseridos num recipiente com forte arejamento. O tempo de recuperação foi medido até que eles nadassem voluntariamente, com controlo perfeito de fluabilidade. Os peixes foram alimentados após o término os ensaios experimentais, com a diária de 0.4 g dia⁻¹ 10 peixes⁻¹. O seu comportamento foi monitorizado durante 0,5 a 1 h.

Resultados e discussão

Os peixes *G. rufa* na concentração MS-222 de 225 mg l⁻¹ foram significativamente maiores (comprimento total e biomassa) que os peixes utilizados nas outras concentrações. Os tempos de indução da anestesia foram distintos entre concentrações abaixo e acima de 350 mg l⁻¹. A concentração 125 mg l⁻¹ foi ineficaz e a de 400 mg l⁻¹ apresentou os tempos mais rápidos (41,9 ± 6.8 s), seguida da de 425 mg l⁻¹ (46,7 ± 13.1 s). Poucos *G. rufa* suportaram o efeito anestésico durante 90s, em concentrações inferiores a 225 mg l⁻¹ de MS-222. Acima dessa concentração quase todos os peixes permaneceram imóveis durante os 90s, com uma exceção de 1 peixe na concentração a 325 mg l⁻¹ e outro a 400 mg l⁻¹. Os tempos de recuperação foram muito variáveis. Os mais longos foram observados nas concentrações de 375 mg l⁻¹ (104,9 ± 31,8 s), seguidos dos da de 300 mg l⁻¹ (96,1 ± 33,0 s), 325 mg l⁻¹ (87,8 ± 20,7 s) e 400 mg l⁻¹ (86,8 ± 27,5 s). Os tempos mais rápidos de recuperação foram obtidos nas

concentrações de 200 mg l⁻¹ (36,9 ± 14,6 s), seguido de 150 mg l⁻¹ (56,2 ± 5,5 s) e 425 mg l⁻¹ (62,5 ± 20,4 s). Consequentemente, não foi encontrada qualquer correlação entre os tempos de indução e os tempos de recuperação para cada concentração de MS-222. Todos os peixes anestesiados demonstraram apetência por alimento após os ensaios experimentais, independentemente da concentração de MS-222 utilizada. Eles geralmente ingeriram a dose diária de ração, no prazo de 10 a 30 min. Numa relação de compromisso entre os tempos mais rápidos de indução e de recuperação, com imobilização total dos indivíduos em 90s, a concentração 425 mg l⁻¹ de MS-222 pareceu ser a mais eficaz. Esta será a dose mínima recomendada para procedimentos rotineiros de avaliação da condição física dos peixes *G. rufa*. Nenhuma mortalidade foi observada durante ou após os procedimentos experimentais, até três semanas depois.

Bibliografia

- Ackerman, P.A., J.D. Morgan e G.K. Iwama. 2005. Anesthetics. Em: Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. *Canadian Council on Animal Care (CCAC)*. 87p.
- Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010, relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 276 33-79.
- Treves-Brown, K.M. 2000. Anaesthesia. p.206-217. Em: *Anaesthetics in Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p.328.

Agradecimentos

Este trabalho decorreu no âmbito do projecto *SpaGaRufa*, Bolsa de Ignição INOV C, co-financiada pelo Programa Operacional da Região Centro (mais CENTRO), 7º Quadro de Referência Estratégica Nacional (QREN 2007-2013) e Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

AE2015 JOIN US IN THE NETHERLANDS



Images courtesy of Rotterdam Marketing, the Dutch Mussel Promotion Board and Holland Aqua B.V.



eas european aquaculture society
easonline.org

Organised by the European Aquaculture Society in cooperation with IMARES Wageningen UR



AE2015 Gold Sponsor



THE USE OF 2-PHENOXYETHANOL AS AN ANAESTHETIC IN CYPRINID FISH *Garra rufa* (HECKEL, 1843)

S. M. F. Ferreira*^{1,2}, M. R. S. Gomes², M. M. R. S. Catarino², I. F. A. Afonso², C. B. C. L. Simões²
and S. C. Gonçalves^{2,3}

¹ CFE - Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Apartado 3046, 3001-401 Coimbra, Portugal.

² MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Polytechnic Institute of Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal

³ MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

Email: susana.ferreira@ipleiria.pt

Introduction

The doctor fish *Garra rufa* (Heckel, 1843) raises a huge commercial interest, both in terms of aquariophilia and therapeutically/cosmetically treatments in specialized clinics and spas. According to the Directive 2010/63/EC, the use of anaesthetics is recommended during procedures involving vertebrates and cephalopods, in order to avoid causing them anguish, suffering, pain and possible permanent damage. As so, an essay was performed to assess the efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for the commercial size of *G. rufa* and establish the minimum concentration producing desirable anaesthetic effects on this species.

Materials and methods

G. rufa, were purchased and reared in independent aquaria of 20 l, with an internal Venturi filtering system. The fish were left to acclimate for 2 weeks, fed 3 times per day *ad libitum* and the water in their systems was partially replaced every week. *G. rufa*, were distributed into groups of 10 fishes with similar size (\bar{x} 4.57±0.50cm total length) and were subjected to 9 different concentrations of 2-phenoxyethanol, from 300 to 1050mg l⁻¹, with an increment of 150mg l⁻¹ each time.

The anaesthetic procedures were performed with water from the rearing systems (Ackerman et al., 2005), which presented the following freshwater quality: 20°C, pH 7.5, NH₄⁺<0.28mg l⁻¹; NO₃⁻<0.42mg l⁻¹, NO₃⁻<17.1mg l⁻¹ and strong aeration. The fish fasted since the day before the trial was conducted (Treves-Brown, 2000). They were monitored since their insertion in a recipient with the anaesthetic solution and strong aeration. The anaesthesia induction time was measured until the fish laid quiet sideways on the bottom, ceased the opercular movements and were removed. Afterwards, they were measured for total length, wet weighed and observed for 1.5min, checking for any possible movements. Then, the fish were inserted in a recipient with strong aeration and the recovery time was measured until they willingly swam with perfect buoyancy control. Food was supplied to the fish after ending each experimental treatment. Their behaviour was monitored during 30min.

Results

There were no statistically significant differences in size (total length and biomass) among the groups of fish used in the several anaesthetic concentrations.

Concentrations \geq 675mg l⁻¹ presented similar induction times (below 2min), but the concentration 825mg l⁻¹ showed lower values (56.50±7.46 seconds; mean \pm standard deviation) than all the others. Some fish subjected to concentrations <675mg l⁻¹ did not undergo anaesthesia in a 5min time. All fish endured the anaesthetic effect for a full 1.5min at 900mg l⁻¹ of 2-phenoxyethanol, although only a single individual showed opercular movements before that time at concentrations 975 and 1050mg l⁻¹, plus two individuals at 825mg l⁻¹. There was a statistically significant positive correlation (Pearson correlation: r_{90} =0.307, p <0.01) between the anaesthesia induction time and the anaesthesia recovery time for *G. rufa* subjected to the different concentrations of 2-phenoxyethanol. The fastest the anaesthesia state was induced, the faster the fish recovered. The recovery time of fish submitted to 2-phenoxyethanol revealed to be significantly higher at 300mg l⁻¹. Although no statistically significant differences were observed between the other concentrations, the fishes recovered faster at 825mg l⁻¹ (67.60±13.59 seconds; mean \pm standard deviation) than in all the other concentrations.

(Continued on next page)

All the fish presented will to eat after the anaesthesia procedures, regardless of the 2-phenoxyethanol concentration used. They usually ate the daily dosage of $0.4\text{gday}^{-1}10\text{fish}^{-1}$ within 10 to 30 min.

No mortality was observed during or after the experimental procedures, until three weeks past it.

Conclusion

Overall, *Garra rufa* showed to be very resilient to anaesthesia procedures, supporting higher concentrations than those recommended for other fish species, even of larger body sizes like Atlantic salmon, rainbow trout, common carp and Nile tilapia (Iwama and Ackerman, 1994; Neiffer and Stamper, 2009). To better handle *Garra rufa* during routine aquaculture procedures, 825mg l^{-1} of 2-phenoxyethanol was the minimum concentration producing desirable anaesthesia. Reason for which, it is recommended to be used for this species, regarding its commercial size (total length of 3 to 5 cm). Nevertheless, higher concentrations should be considered for larger *G. rufa*, especially for longer procedures. This suggestion is substantiated by the observation of opercular movements in some fish, at the highest dose used in this trial (1050mg l^{-1}), during the monitoring routine that took 1.5min at most.

References

- Ackerman, P.A., J.D. Morgan, G.K. Iwama. 2005. Anesthetics. In: Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. Canadian Council on Animal Care (CCAC). 87p.
- Iwama G.K., P.A. Ackerman. 1994. Anaesthetics. p.1-15. In: Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 3. Hochachka P., T. Mommsen (Eds.). Elsevier Publishers, Kidlington.
- Neiffer D.L., M.A. Stamper. 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. ILAR J. 50: 343-360.
- Treves-Brown, K.M. 2000. Anaesthesia. p.206-217. In: Anaesthetics in Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p.328.