



**Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário
de *Garra rufa* (Heckel,1843), com vista à sua produção
em Aquacultura**

Mónica Raquel Sousa Gomes

2015



**Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário
de *Garra rufa* (Heckel, 1843), com vista à sua produção
em Aquacultura**

Mónica Raquel Sousa Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

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

2015

Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de Garra rufa (Heckel,1843), com vista à sua produção em Aquacultura

Copyrights © Mónica Raquel Sousa Gomes

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.

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer aos pais pelo esforço, principalmente nos últimos tempos por me terem proporcionado a realização deste sonho e de toda a força que me deram. Que me apoiaram e estiveram sempre do meu lado principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão que me ajudou a não desistir e fazer acreditar que eu era capaz de acabar esta etapa sem desmoralizar. E às minhas primas (Rute e Bárbara), que além de puxarem por mim, ajudaram-me a desanuviar a cabeça.

Ao Bruno Martins que apesar de longe neste período de escrita esteve sempre presente.

À Mafalda Catarino por ser uma óptima companheira de trabalho e acima de tudo uma grande amiga e para a vida, que sempre me ajudou em que precisei.

À Sandra Mortágua pela determinação de ajudar no que lhe era possível e muitas vezes impossível, também uma grande amiga para a vida.

À Marcela França, Carmen Pedro e Hugo Morais pela ajuda quando nós precisávamos e por todo o apoio dado.

E acima de tudo às minhas orientadoras, Dr^a Susana Ferreira, pela ajuda essencial, pelas dicas, pelas chamadas de atenção, pelos mails de madrugada e Dr^a Sívila Gonçalves que também ajudou e apoiou sempre que necessário.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto "SpaGaRufa - Produção do peixe *Garra rufa* para fins terapêuticos ", através da Bolsa de ignição INOV C, co-financiado pelo Operacional Programa da Região Centro (+ CENTRO), Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN 2007-2013) e do Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional, desenvolvido pela GIRMIP - Grupo de Investigação em Recursos Marinhos do Instituto Politécnico de Leiria.

Publicações

O presente trabalho resultou diretamente nas seguintes produções científicas:

Publicações em atas de congressos internacionais com arbitragem científica

– Gomes MRS, Catarino MMRS, Gonçalves SC, Ferreira SMF (2015). Insights on the reproduction and embryonic development of *Garra rufa* (Cyprinidae). Frontiers in Marine Science Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology.
doi: 10.3389/conf.fmars.2015.03.00085

Painéis

– 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, Porto (Portugal), 7 a 11 de Setembro de 2015.

No entanto, durante as atividades desenvolvidas no âmbito do projecto "SpaGaRufa - Produção do peixe *Garra rufa* para fins terapêuticos", financiado da Bolsa de ignição INOV C, resultaram também as seguintes produções científicas:

Publicações em atas de congressos internacionais com arbitragem científica

– Catarino MMRS, Gomes MRS, Gonçalves SC, Ferreira SMF (2015). Estimation of the ideal dosage and feeding frequency for *Garra rufa* (Cyprinidae). Frontiers in Marine Science Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology.
doi: 10.3389/conf.fmars.2015.03.00076

Comunicações orais

- 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.

Painéis

– 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, Porto (Portugal), 7 a 11 de Setembro de 2015.

- 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.

Resumo

Garra Rufa é um pequeno ciprinídeo, bentopelágico de água doce, originalmente do sudoeste da Ásia, que se tornou economicamente relevante durante a última década. *G. rufa* é um elemento digno para controlar o crescimento de algas em aquariophilia, mas é conhecido principalmente por seu uso em tratamentos de problemas de pele em Spas e clínicas. Foi feita uma tentativa de reproduzir *G. rufa* em cativeiro, a fim de responder à demanda crescente do mercado para este peixe, além de obter uma visão sobre sua biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário. Grupos de 4 *G. rufa* foram inseridos em 7 aquários de 20 L, com um filtro interno, arejamento e colocado numa sala de temperatura controlada a 26°C. Uma rede colocada 1,5 cm acima do fundo, impedindo os peixe de comer seus próprios ovos. Os peixes foram alimentados três vezes por dia e verificou-se a presença de ovos. Os ovos foram removidos, colocados em aquários separados e fotografados de hora em hora, num microscópio composto Leica DM2000LED, equipado com uma câmara Leica MC 170 HD de 5 megapixéis.

G. rufa apresenta um dimorfismo sexual muito reduzido, exceto pela presença de tubérculos no focinho do macho, que aparece apenas durante o período de reprodução. Os machos são maiores que as fêmeas e executam perseguições de altas velocidade depois atrás das mesmas. Os ovos não apresentaram propriedades adesivas, sendo depositados no fundo dos aquários. Num total de 31 posturas, apenas 19 resultaram em juvenis. A perda de ovos deveu-se maioritariamente a uma contaminação por fungos em torno dos ovos, que levaram à degeneração dos embriões. Houve um sucesso de eclosão médio geral de 61,29%. As estruturas mais proeminentes dos embriões que foram perceptíveis: primórdio da cauda (5h); primórdio óptico e batimentos cardíacos (10h); aparecimento das barbatanas peitorais (13h). Os ovos eclodiram entre 24 a 48h e as larvas consumiam o saco vitelino em 48h, passando a alimentar-se de ração. Em 3 meses, estes peixes poderão ser comercializados e em 6 meses podem ser potenciais reprodutores. Este rápido desenvolvimento, aliado à elevada procura de mercado, torna *G. rufa* numa espécie muito atractiva para apostar na sua produção em Aquacultura e promoção para fins terapêuticos em Saúde e Bem-estar humanos, tal como em Aquariophilia.

Palavras-chaves: Aquacultura, Peixe doutor, Crescimento, Desenvolvimento embrionário, Ciprinídeo

Abstract

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 4 *G. rufa* were inserted in 7 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 Leica MC 170 HD. *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. The eggs showed no adhesive properties, being deposited on the bottom of the aquaria. In a total of 31 postures, only 19 resulted in newly born fish. This was mostly due to fungal development around the eggs that caused the embryos to degenerate. There was an general average hatching success of 61,29%. The most prominent structures of the embryos were noticeable after: 5h - tail bud; 10h - optic primordium and heart beating; 13h - pectoral fin buds. They hatched between 24 to 48h and the larvae consumed the yolk sac in 48h, starting to ingest the supplied feed on their own. In 3 months, these fish can be marketed and in six months may be potential reproducers. This rapid development, combined with the high market demand, makes *G. rufa* a very attractive species to invest in for Aquaculture production and promote therapeutic purposes in Health and Well-being human, as well as Aquariophilia.

Key-words: Aquaculture, Doctor fish, Growth, Embryonic Development, Cyprinid

Índice

1 - Introdução	01
1.1 – Aquariorfilia	01
1.2 - Ictioterapia	03
1.3 - A espécie	05
1.4 – Reprodução	07
1.5 - Generalidade do desenvolvimento embrionário dos peixes	07
1.5.1 – Zigoto	08
1.5.2 – Segmentação	08
1.5.3 – Blástula	08
1.5.4 – Gastrulação	09
1.5.5 – Neurulação	10
1.5.6 -Organogénese e metamerização	10
1.6 Objectivos	11
2- Materiais e métodos	13
2.1 - Aquisição de <i>G. rufa</i> .	13
2.2 - Engorda e maturação de reprodutores.	13
2.3 - Manutenção de <i>G. rufa</i>	14
2.4- Dissecção de indivíduos <i>G. rufa</i>	15
2.5- Ensaio para reprodução de <i>G. rufa</i>	15
2.6- Frequência e sucesso reprodutivo de <i>G. rufa</i>	16
2.7- Desenvolvimento embrionário de <i>G. rufa</i>	16
2.8 - Desenvolvimento larvar e crescimento individual de juvenis <i>G. rufa</i>	18
2.9- Tratamento e análise de dados	18
3 – Resultados	21
3.1- Monitorização dos parâmetros de qualidade da água	21
3.2- Dissecção de indivíduos <i>G.rufa</i>	21
3.3- Engorda e maturação de reprodutores	23
3.4- Ensaio para reprodução natural de <i>G. rufa</i>	25
3.5- Frequência e sucesso reprodutivo de <i>G. rufa</i> em cativeiro	26
3.6- Desenvolvimento embrionário de <i>G. rufa</i>	29
3.7-Desenvolvimento larvar e individual de juvenis <i>G. rufa</i>	35
4– Discussão.	37
5 – Perspetivas futuras	47
Referências bibliográficas	49
Anexos	

Índice de Figuras

- Figura 1: Ictioterapia (autor: Susana Ferreira 2013)-----Pág.4
- Figura 2: Mapa da região geográfica de onde são oriundos os peixes *G. rufa*. In *Garra rufa* (Doctor fish).-----Pág.5
- Figura.3: Aquários destinados à reprodução de *G. rufa*, com 2 tipos de redes protetoras, para evitar que os peixes tivessem contacto com o fundo, e enriquecimento do meio (Autor: Mónica Gomes, 2015). -----Pág.16
- Figura 4: a. Microscópio Leica DM 2000 LED com câmara Leica MC 170 HD incluída (Autoria: Mónica Gomes, 2015) e b. Microscópio estereoscópico de dissecação DM 125 câmara Leica MC 170 HD incluída. (Autoria:<http://www.leica-microsystems.com/products/stereo-microscopes-microscopes/research-manual/details/product/leica-dm125/>)-----Pág.17
- Figura 5: Software Leica Application Suite 4.4.0. (Autoria: Mónica Gomes, 2015).-----Pág.17
- Figura 6: **a.** Frequência absoluta de indivíduos *G. rufa* de sexo indeterminado, fêmea ou macho relativamente ao seu comprimento total, que morreram ao longo do estudo, foram preservados em formalina a 10% e posteriormente dissecados (N = 33); **b.** Número de óvulos observados em fêmeas *G. rufa* dissecadas relativamente ao tamanho das mesmas (equação polinomial fraca e não significativa: $y = -203.09x^2 + 2609.5x - 8203.7$; $R^2 = 0.3741$; $N = 8$; $p > 0,05$)-----Pág. 22
- Figura 7: **a,b.** Fêmea sacrificada onde se pode observar os óvulos no seu interior, fotografados com uma câmara Canon Powershot G15. **c.** Gónada (ampliação total de 10x) e **d.** Pormenor dos diferentes estágios de maturação dos óvulos (ampliação total de 20 x), observados ao microscópio estereoscópico de dissecação.-----Pág. 23
- Figura 8: Crescimento linear de *G. rufa* isolados para obtenção de um conjunto reprodutores, desde o seu tamanho comercial (cm) até serem potenciais reprodutores (entre os 5 a 6 cm de comprimento total).-----Pág. 24
- Figura 9: Fotografias obtidas com uma câmara Canon Powershot G12, de: **a.** um macho *G. rufa*, que apresenta tubérculos brancos junto das narinas e **b.** um peixe de sexo indeterminado, sem os tubérculos.-----Pág. 25
- Figura 10: Fotografia de ovo de *G. rufa* tirada: **a.** um ovo saudável, e **b.** um ovo contaminado com fungos, observados ao microscópio estereoscópico de dissecação (ampliação total de a. 20× e b. 40X)-----Pág.26

Figura 11: **a.** Frequência relativa de desovas de *G. rufa* por aquário, observada entre Outubro de 2014 e Junho de 2015. e **b.** Período com maior ocorrência de desovas (noite – Verificado às 9.00; manhã – Verificado entre as 13h e as 14h, tarde – verificado entre as 14h às 19h).-----Pág.27

Figura 12: Taxa de fecundação (Tf), taxa de eclosão (Te) e taxa de sobrevivência larvar (Tsl) em **a.** todas as desovas (N = 19), excluindo aquelas em que todos os ovos foram inviáveis, devido à contaminação por fungos (N = 12); e **b.** apenas em desovas bem-sucedidas (N = 7; taxa de fecundação superior a 70%, de acordo com Baldisserotto et al (2009)), obtidas entre Outubro de 2014 e Junho de 2015.----Pág. 28

Figura 13: Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário de *G. rufa*, observados ao microscópio composto, com uma ampliação total de 50×.-----Pág. 32

Figura 14: **a.** Juvenis com 2 semanas e **b.** 1 Mês de idade, fotografados com uma câmara Canon 70D. -----Pág. 35

Figura 15: **a.** Crescimento linear individual; e **b.** Taxa de sobrevivência de juvenis *G. rufa*, desde a eclosão até aos 5 meses de idade, monitorizados de uma postura em 2 de Junho de 2015-----Pág. 36

Índice de Tabelas

Tabela I – Posição sistemática de *Garra rufa* (Heckel, 1843), de acordo com a classificação de Mayr (1990).-----Pág.6

Tabela II: Parâmetros de qualidade da água do sistema de suporte de vida de *G. rufa*.-----Pág. 21

Tabela III – Resultados das análises estatísticas (teste Z) para comparar as taxas de fecundação, eclosão e de sobrevivência larvar, entre todas as posturas observadas e somente as bem sucedidas, com ou sem a utilização de azul de metileno.-----Pág.29

Tabela IV – Descrição subjectiva dos estádios de desenvolvimento e horas respectivas.-----Pág.30

1 - Introdução

1.1 - Aquariofilia

Os peixes são considerados como um recurso alimentar desde tempos remotos. No entanto, estes animais começaram a ser mantidos em aquários já desde o tempo do Império Egípcio, não só pelo propósito de alimento, mas também devido aos seus atributos ornamentais (Scott, 1995). Enquanto a maior parte da produção de Aquacultura é voltada para o sector alimentar, a Aquacultura de peixes ornamentais tem vindo a ganhar cada vez mais relevância (Tlusty, 2001). Nas últimas décadas, a Aquariofilia tem registado um rápido crescimento, estando associada às Pescas e ao desenvolvimento da Aquacultura vocacionada para o mesmo sector (Olivotto et al, 2006), sendo uma fonte de rendimento para muitas comunidades rurais e costeiras (FAO, 2014). Nos Estados Unidos da América (EUA), os peixes ornamentais tornaram-se a primeira escolha a nível de animais de estimação, contando com cerca de 7,2 milhões de casas com aquários. Na União Europeia, esse número ronda os 3,2 milhões e tem vindo a aumentar cada vez mais (Yanong, 1996). Segundo a FAO (Food and agriculture Association), esta indústria gera milhares de milhões de dólares anualmente, em que Singapura é a nação principal na exportação de peixes ornamentais, a nível mundial (Ferreira, 2014). Em consequência, começou a haver uma necessidade de analisar os riscos e benefícios envolvidos, pois as suas implicações ecológicas e sociais nem sempre são monitorizadas (Landau, 1992).

O propósito recreativo da Aquariofilia tem dado lugar ao desenvolvimento da Aquariologia, que estuda e desenvolve diversas técnicas de manutenção de espécies com maior interesse económico, procurando recriar o seu ambiente natural. Com vista a responder à crescente procura de mercado por essas espécies, tem havido interesse na sua produção em Aquacultura. Concordantemente, começou a haver espécies criadas especialmente para aquele fim (Yanong, 1996), paralelamente com o desenvolvimento de novos equipamentos e novas rações.

Grande parte das espécies ornamentais já é produzida em cativeiro (Dowes, 1998), sendo a maioria peixes de água doce (Tlusty, 2001). A gestão da reprodução destes animais começou a ter uma elevada importância (Yanong, 1996), pois tem por pretensão, evitar a rutura de mananciais daqueles organismos nos seus ecossistemas naturais (Aquário Vasco da Gama, 2015). Assim, esta prática auxilia na sustentabilidade

da indústria de animais ornamentais, tornando-se assim uma alternativa promissora à captura intensiva de animais selvagens. Esta última incorre muitas vezes na destruição do habitat onde aqueles se encontram e mesmo do ecossistema, em geral, tornando-se um problema na conservação de espécies. E apesar de muitas espécies já serem criadas em cativeiro, a prática da captura continua a ser muito utilizada, devido à grande procura destes animais por parte dos consumidores finais. A sobrepesca das populações selvagens, não é o único problema ecológico levantado pelas práticas comerciais associadas à Aquariofilia. Esta indústria é inadvertidamente um dos principais vetores de introdução de espécies exóticas em sistemas aquáticos a nível global (Scott, 1995). Os peixes que mais se vendem para aquários ornamentais pertencem às famílias Cichlidae e Cyprinidae (Mourão, 2012). De entre estes, algumas espécies têm uma ampla valência ecológica, sendo potenciais invasoras. A introdução de espécies exóticas é um grave problema na degradação de sistemas aquáticos, conduzindo as espécies nativas à beira da extinção, devido à competição por recursos e à inicial ausência de predadores. Muitas das vezes, essa introdução ocorre de forma acidental, outras de forma intencional. Esta última, deriva principalmente da falta de consciencialização, da maioria população humana, para as consequências que tal acarreta para o ambiente. Muitas das vezes, estas introduções incorrem também em graves impactos nas economias locais, com depleção dos recursos naturais dos ecossistemas em que ocorreu a introdução.

A maioria das espécies de peixes dulçaquícolas estão ameaçados de extinção à escala mundial (Duncan e Lockwood, 2001). Além da degradação dos seus ecossistemas naturais por actividades antropogénicas - contaminação ambiental, destruição de habitats, introdução de espécies exóticas, sobrexploração, há também a ameaça das alterações climáticas (Sousa-Santos et al 2013, 2014). A ocorrência de episódios estocásticos de verões quentes e secos, têm conduzindo à eliminação de populações dulçaquícolas, por falta de água nos seus respetivos ecossistemas (Sousa-Santos et al 2013, 2014). Mais recentemente, a aquacultura de espécies dulçaquícolas tem sido utilizada para estabelecer programas de recuperação e conservação das populações selvagens dessas espécies (Tlusty, 2001; Sundarabarathy et al 2005, Rowland 2013; Sousa-Santos et al 2013, 2014).

1.2 – Ictioterapia

Mais recentemente, tem sido amplamente divulgada a prática de terapias com recurso a peixes. O termo “Ictioterapia” foi mencionado pela primeira vez em 1989, em Kangal (Turquia) (Grasseberger et al, 2006). As águas termais daquela localidade são habitadas por um pequeno ciprinídeo – o peixe-doutor *Garra rufa* (Heckel, 1843). Este peixe alimenta-se essencialmente de fito e zooplâncton (Özcelik e Akyol, 2011), mas estes recursos são escassos naquelas águas quentes (35°C). Então, usa outro recurso alimentar: a pele de vertebrados. Há muito tempo que estes peixes são utilizados para limpar, suavizar e ajudar a tratar a pele de banhistas. Só recentemente é que a reputação das suas propriedades curativas se tornou mundialmente reconhecida. Pessoas de todo o mundo procuram tratamento nas águas termais de Kangal (Turquia), para diversos problemas de pele, como: psoríase, eczemas, dermatite, acne, calosidades e durezas (Özcelik e Akyol, 2011). Estes peixes, desprovidos de dentes, removem as células mortas da epiderme das pessoas que se submetem ao contacto com estes seres, dentro de água, sem causar dano. Recentemente descobriu-se que libertam uma enzima na sua saliva, que tem um efeito revitalizador sobre a pele, ajudando a sua renovação, tornando-a mais macia e saudável do que antes do tratamento. Menciona-se que essa enzima seja ditranol – o que será muito improvável, pois esta substância é extraída da árvore Araroba e é usada no tratamento da psoríase (Garra Rufa Europe 2015). É por todas estas razões que este peixe é conhecido como “Doctor Fish” (peixe doutor) (Sayili, 2006).

O *Kangal Fish Health Spa* foi criado em 1960, mas outros têm-lhe sucedido (Sherman, 2012). Estes centros oferecem um tratamento natural, relaxante e livre de dor, completamente baseado no trabalho realizado pelos peixes, enquanto estes se alimentam. Porém, os benefícios de submissão ao morder destes peixes, são considerados, não só uma massagem, mas também tratamentos de exfoliação e renovação celular, para qualquer parte do corpo - por exemplo: manicura e pédicure (Özcelik e Akyol, 2011, Grassberger e Hoch 2006). Desde 2006, Institutos de Beleza, de Bem-Estar e de Saúde Alternativa têm vindo a multiplicar-se mundialmente. A Ictioterapia tem vindo a ser amplamente divulgada, principalmente no Japão, Croácia, entre outros (Sherman, 2012).

Com a proliferação de centros de tratamento com recurso a Ictioterapia, tem havido uma crescente preocupação com a necessidade garantir uma boa qualidade higiénica das instalações, saúde pública, bem-estar animal e com potenciais transmissões de infeções. Os métodos convencionais de esterilização e desinfeção de água/equipamento prejudicam e/ou matam os peixes. Por esse motivo, a Ictioterapia foi

proibida em alguns países, ainda que haja pouca evidência do risco potencial à saúde dos usuários (HPA, 2011; Sirri et al 2013).

Mais ainda, há quem advogue o mau trato de animais nestes tratamentos. Para que se possa manter o interesse de *G. rufa* em se alimentar da pele de vertebrados, que não faz parte da sua típica dieta alimentar (Yalçin-Özdilek e Ekmekçi, 2006), será necessário fornecer-lhes outro tipo de alimento em quantidades reduzidas, fazendo-os passar fome. A falta de orientações no modo de como manter estes peixes em cativeiro, a dificuldade de manter a qualidade da água dos sistemas de tratamento ictioterapêutico, o *stress* induzido pelo contacto com diferentes pessoas, a possibilidade de transmissão de doenças entre peixes e humanos e a indicação precisa de alimento a fornecer para garantir o bem-estar dos peixes, são factores que resultam em mortalidade elevada de *G. rufa* em muitos centros de Ictioterapia. Todos estes motivos combinados levantam muitas questões éticas relativamente à prática da Ictioterapia.

No entanto, as aplicações terapêuticas com estes peixes não deixam de ter valor para quem sofre de doenças dermatológicas, para as quais a Medicina tradicional ainda não conseguiu uma resposta eficaz. Assim, nada impede que sejam desenvolvidos sistemas de manutenção de *G. rufa*, que possam ser utilizados como unidades de terapia unipessoal, para que essas pessoas possam usar em suas casas. Falta desenvolver uma componente de esclarecimento quanto ao melhor modo de manter estes peixes em cativeiro e em garantir o seu bem-estar. Não restarão muitas dúvidas que quem optar por esta via, terá esse tipo de preocupação. Quanto mais não seja, devido ao elevado preço de mercado de *G. rufa*, do investimento em material de aquarofilia e da grande quantidade de peixes que é necessária. Tudo depende da informação disponível às pessoas interessadas.



Figura 1: Ictioterapia (autor: Susana Ferreira 2013)

1.3- A espécie

Garra rufa é uma espécie de peixe pertencente à família Cyprinidae (Tabela I). São originários de rios, pequenas lagoas, lagos e bacias do Médio Oriente, especialmente na Turquia, Síria, Iraque e Irão (Sherman, 2012). É uma espécie subtropical, bento-pelágica, não migratória e bastante comum na sua área de distribuição geográfica (Özcelik e Akyol, 2011).

G. rufa é considerada uma espécie bastante resistente flutuações das condições ambientais, pois pode encontrar-se a temperaturas entre os 15°C e os 36°C (Jarvis, 2011; Coad, 2012).

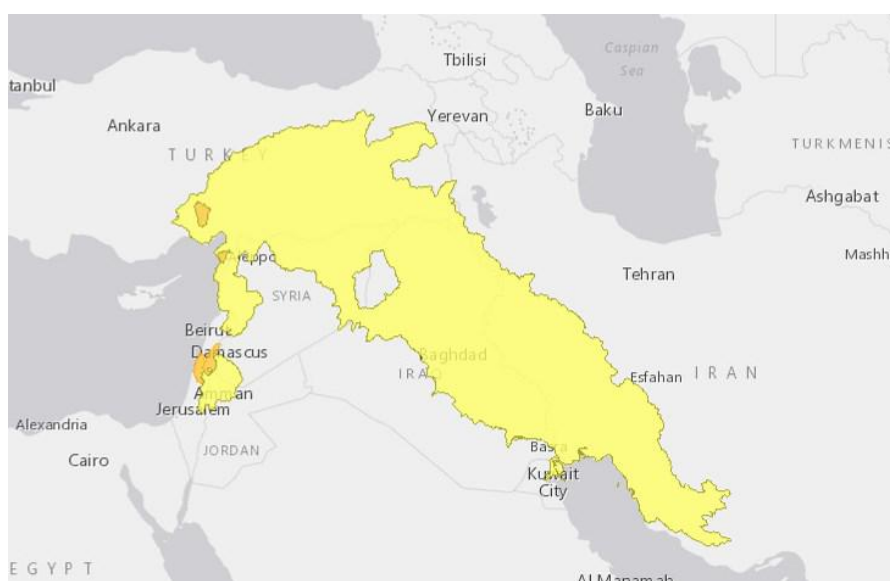


Figura 2: Mapa da região geográfica de onde são oriundos os peixes *G. rufa*. In *Garra rufa* (Doctor fish), Rapid Risk Assessment Summary, Update: September 2015

G. rufa alimentam-se normalmente de fito e zooplâncton (Grassberger e Hoch, 2006), nomeadamente de diatomáceas (*Achnanthes* sp., *Amphora* sp., *Cocconeis* sp.); Algas verdes (*Actinastrum* sp., *Chaetophora* sp., *Chlorococcum* sp., *Coelastrum* sp.), Algas azuis-verdes (*Anacystis* sp., *Chroococcus* sp., *Dactylococcopsis* sp., *Merismopedia* sp.).(Fishbase 2015), Cianobactérias (Chrysophyta e Chlorophyta, sendo esta última mais comum), Rotíferos e protozoários (Yalçin-Özdilek e Ekmekçi, 2006). É conhecido também por aderir às rochas, fazendo sucção com a boca (disco bucal que serve de ventosa) para se alimentar de material vegetal bentónico.

Tabela I – Posição sistemática de *Garra rufa* (Heckel, 1843), de acordo com a classificação de Mayr (1990).

Domínio	Eukarya
Subdomínio	Metabionta
Reino	Animalia
Infra reino	Deuterostomia
Filo	Chordata
Sub filo	Vertebrata
Super classe	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Ordem	Cypriniformes
Família	Cyprinidae
Género	<i>Garra</i> (Hamilton 1822)
Espécie	<i>Garra rufa</i> (Heckel 1843)

A espécie *G. rufa* caracteriza-se por ser um dos mais pequenos membros da família Cyprinidae e é uma das cerca de 73 espécies do género *Garra* (Jarvis, 2011). Morfologicamente, *G. rufa* possui o corpo fusiforme, ligeiramente achatado na parte abdominal. Apresenta sistema de linha lateral visível, possuindo entre 31 a 38 escamas, desde a barbatana dorsal até à pélvica. Possui escamas ciclóides, de tamanho moderado a grande. Têm células mucosas abundantes na epiderme, que lhes confere um aspecto oleoso, tornando-os bastantes escorregadios. A cabeça é desprovida de escamas e é comprimida dorso-ventralmente, oferecendo uma menor resistência durante a natação. Apresentam dois pares de barbilhos, um lateral e outro superior à boca. Esta tem posição inferior e é convertida em forma de disco adesivo. Este disco permite ao peixe alimentar-se e ficar estável em correntes fortes. Têm apenas uma barbatana dorsal posicionada anteriormente às barbatanas pélvicas, sendo que estas últimas têm localização abdominal. A barbatana caudal é homocérquica e furcada. O número de raios das barbatanas varia, mas tipicamente possuem 8 raios na barbatana dorsal, 12 a 14 nas barbatanas peitorais, 7 a 8 nas barbatanas pélvicas, 5 na barbatana ventral e 17 na barbatana caudal (Coad 2012).

A coloração de *G. rufa* varia entre um cinza clarinho e um cinza escuro. Esta coloração varia consoante a luz e as cores do ambiente em que o peixe se encontra. As barbatanas, por vezes, possuem uma coloração avermelhada nas extremidades e um ponto preto na base da barbatana caudal (Jarvis 2011).

1.4– Reprodução

A Reprodução é um processo biológico muito importante nos organismos, pois é dela que depende a sua sobrevivência e a perpetuação das espécies. Por isso a possibilidade de controlar o ciclo reprodutivo dos organismos é um factor de grande importância, assegurando assim o êxito em aquacultura e a propagação no meio natural.

Os machos e as fêmeas *Garra rufa* são muito similares entre si, daí ser difícil separá-los por género. Apesar de muito limitado, esta espécie possui dimorfismo sexual, devido aos tubérculos brancos que os machos apresentam temporariamente, durante a época de reprodução, entre os olhos e as narinas. Estes tubérculos são formações dérmicas arredondadas que são parecidas com verrugas (Coad 2012). Os machos podem adquirir uma coloração mais brilhante nessa altura (Coad 2012), sendo ligeiramente maiores que as fêmeas. As fêmeas na altura da desova apresentam as bases das barbatanas peitorais, pélvicas e anais diferentes dos machos (Coad 2012).

Esta espécie é ovípara, ou seja, os embriões são gerados dentro de um ovo. A fecundação é externa. As fêmeas libertam os óvulos e os machos libertam espermatozóides que irão fecundar os óvulos. A época de reprodução é adaptada a cada população, o habitat em que vivem e as condições ambientais a que estão sujeitos (Miller, 1979). Ainda assim, muito pouco se sabe sobre a reprodução de *G. rufa* e as condições em que tal ocorre. A forma do peixe, tamanho (Jonsson e Jonsson, 1999) e a idade (Thorpe et al, 1984) e outros inúmeros factores, tais como a estação do ano, habitat, maturação das gónadas, o suplemento de alimento, a temperatura (Fleming and Gross, 1990) e o estado de saúde influenciam a reprodução das várias espécies (Tesch, 1968)

1.5 - Generalidades do desenvolvimento embrionário em peixes

O desenvolvimento embrionário é um processo que se inicia desde a fecundação do óvulo até a eclosão do organismo (Kimmel et al, 1995).

Os ovos de peixes teleósteos são telolecíticos, ou seja, têm uma grande quantidade de vitelo no qual o embrião irá nutrir-se durante a embriogénese e que servirá de suplemento nutricional à larva após a eclosão (Woynarovich e Horváth, 1980). De acordo com Kimmel et al, (1995) o desenvolvimento embrionário pode ser

dividido nas seguintes fases: Zigoto, Segmentação, Blástula, Gástrula, Metamerização, Faríngula e Eclosão.

1.5.1 - Zigoto

Imediatamente após a fecundação, há a formação do zigoto. Este resulta da fusão entre o óvulo e o espermatozóide e é constituído apenas por uma célula. Esta fase dura apenas até ocorrência da primeira divisão mitótica.

1.5.2 - Segmentação

Trata-se de uma fase que decorre desde a primeira divisão mitótica. O ovo sofre várias divisões sincronizadas, em apenas num dos polos (polo animal), formando então o blastodisco. O blastodisco vai aumentando o número de células, dando origem ao embrião. No final desta fase é atingido um total de 64 células, mas sem haver aumento de tamanho do ovo em si.

Este tipo de segmentação designa-se por segmentação meroblástica discoidal, pois as células só se desenvolvem no polo germinativo (animal), sendo implícita nos ovos telolecíticos (Kimmel et al 1995).

1.5.3 – Blástula

A partir das 64 células, inicia-se o estágio de blástula. Este é caracterizado pelo aumento da duração do ciclo celular, pela perda das divisões sincronizadas e início da motilidade celular (Kimmel et al, 1995). Isto significa que os ciclos começam a ser assíncronos e mais longos e ocorre aumento do tamanho do ovo. O blastodisco começa a tornar-se menor e a quantidade de material nuclear do citoplasma aumenta. Forma-se a camada sincicial protoplasmática - o periblasto. O Periblasto e o blastodisco estão confinados no polo animal.

1.5.4 – Gastrulação

De acordo com Warga e Kimmel, (1990), a gastrulação em peixe-zebra envolve três movimentos celulares: epibolia, involução e extensão convergente.

A epibolia, resulta num ajuste do blastodisco em relação ao vitelo. A epibolia caracteriza-se pelo facto dos micrómetros (células mais pequenas do embrião) se multiplicarem mais rápido e deslocarem-se para rodear os macrómeros (células maiores do embrião), formando respectivamente os folhetos germinativos ectoderme e endoderme. Esses movimentos de epibolia continuam até o fim da gastrulação, quando o blastodisco envolve completamente a célula de vitelo (Santos, 2012). Nesta fase, o blastodisco achata-se contra o vitelo e expande-se, envolvendo-o, mantendo uma espessura constante.

A involução inicia-se quando o blastodisco cobre 50% da célula do vitelo por epibolia. Dá origem ao início dos movimentos morfogenéticos da gastrulação. As células da camada do lado do polo vegetativo, em redor da margem do blastodisco, envolvem por baixo da margem, em direção da superfície da célula de vitelo subjacente. Depois estas migram da região marginal, por cima da célula do vitelo ou das células circundantes. Estes movimentos resultam na formação do anel embrionário – uma dupla camada de células, em que as circundantes fazem parte do epiblasto e as mais internas formam o hipoblasto.

Uma vez formado o anel, o epiblasto e o hipoblasto intercalam-se no futuro lado dorsal do embrião e formam o escudo embrionário. A camada envolvente do vitelo é rigidamente ligada ao blastodisco e é puxada por este (Kimmel 1995). É devido á movimentação destas estruturas que leva à formação da mesoderme que se vai deslocando para o futuro lado anterior do embrião.

A mesoderme e a endoderme situam-se subjacentes à ectoderme. A fase de gastrulação é caracterizada pelo movimento de involução de futuras células endérmicas e mesodérmicas e também pelos movimentos convergentes das células interiorizadas em direção à linha média dorsal o que permite a formação do corpo do embrião ao redor da massa vitelina (Kimmel, 1995).

Surge um pequeno espessamento na periferia do blastodisco, onde será a extremidade posterior do embrião, surgindo o blastóporo. Dará início à formação da cauda. Após isso, o blastodisco vai espessar ao longo de todo o embrião, ocorrendo um espessamento mais proeminente na futura região anterior do embrião, que irá originar posteriormente a cabeça.

1.5.5 - Neurulação

A fase de neurulação é caracterizada pelo aparecimento do tubo neural e dos sómitos (Kimmel et al, 1995).

Inicialmente, como nos outros vertebrados, a ectoderme torna-se mais espessa e forma a placa neural. Nos peixes não surgem pregas neurais óbvias que resultem num tubo com lúmen. Ao invés disso, forma-se uma estrutura compacta - quilha neural, que se separa da restante ectoderme formando um tubo celular compacto. Posteriormente, esse tubo sofre cavitação, dando origem ao canal neural. O resto da ectoderme torna-se a pele (Kimmel et al, 1995).

As células hipoblásticas do escudo embrionário convergem e estendem-se, estreitando-se ao longo da linha dorsal média do hipoblasto. A cor dorsal é formada através da mesoderme (Kimmel et al ,1995).

1.5.6 - Organogénese e metamerização

Começam a aparecer as fases rudimentares dos principais órgãos e o sulco da cauda começa a ficar mais proeminente. O sulco da cauda começa a alongar-se pelo comprimento do embrião e começa a segmentar. Esses segmentos dão origem aos sómitos, que aparecem sequencialmente pelo tronco e depois pela cauda. O embrião começa a alongar-se e a cauda forma-se do lado do blastóporo, à semelhança da linha evolutiva dos deuterostómios.

A cabeça começa a tornar-se cada vez mais evidente e as vesículas ópticas começam a aparecer. Estas originarão os olhos. Tornam-se evidentes após o fecho do blastóporo

Posteriormente, a vesícula auditiva torna se visível, com o aparecimento dos otólitos.

A convergência e a extensão no epiblasto trazem as células presuntivas do cérebro de todo o epiblasto para a linha média dorsal onde formam a quilha neural.

Nesta fase os sómitos também começam a notar-se cada vez mais. Começa a haver separação da cauda.

A morfogénese do cérebro está avançada. As barbatanas dorsais, caudal e anal, começam a aparecer. O coração começa a dividir-se, em 2 câmaras. A cabeça separa-se do vitelo e a cauda continua a aumentar de comprimento. Do vitelo resta apenas

uma parte que irá fornecer nutrientes à larva. O embrião estará pronto então para nascer.

As larvas eclodem ao fim de um determinado tempo, variável de espécie, para espécie. Estas são muito vulneráveis durante os primeiros estágios de desenvolvimento. Durante os primeiros tempos de vida, dependem das reservas vitelinas. Após a Abertura da boca e protrusão da mandíbula, poderão começar a alimentar-se. A sua sobrevivência depende da conciliação da poupança das reservas no saco vitelino até se encontrarem aptas a alimentar-se por si sós.

1.6 – Objetivos

Este trabalho teve por objetivo principal tentar reproduzir *Garra rufa* em cativeiro. Em consequência, idealizou-se um sistema de suporte de vida que permitisse a reprodução destes peixes e a obtenção dos seus ovos. Para tal, forneceram-se condições ambientais semelhantes às dos seus habitats naturais e fizeram-se adaptações, à medida que se foi conhecendo um pouco mais sobre o comportamento destes animais. Os peixes foram monitorizados pelo seu comportamento e forma física, para tentar determinar a época/ocorrência de reprodução, tentando distinguir machos de fêmeas e verificar a existência de rituais de acasalamento. Quando se verificou a presença de ovos nos aquários, procurou avaliar-se o sucesso reprodutivo do cultivo de *G. rufa*, nomeadamente a frequência de posturas, a suas respetivas taxas de fecundação, eclosão e de sobrevivência larvar. Esses ovos foram também monitorizados, de forma a observar e estimar a duração dos principais eventos do desenvolvimento embrionário de *G. rufa*, sob as condições ambientais estabelecidas. Entre os peixes adquiridos para este trabalho e os que nasceram entretanto, avaliou-se o tempo decorrido entre o seu nascimento até que atingiram um tamanho comercial (3 a 4 cm de comprimento total), bem como a sua taxa de sobrevivência. Estabeleceu-se também o tempo decorrido até serem potenciais reprodutores. Esta avaliação será uma mais-valia para determinar a potencial viabilidade económica da produção de *G. rufa* em Aquacultura, para posterior comercialização.

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Aquisição de *G. rufa*

Os espécimes *Garra rufa* foram adquiridos a um Importador Português, em diferentes lotes provenientes de produtores Indonésios, ao longo dos anos de 2013 e 2014.

Os lotes foram mantidos separadamente em diferentes tanques de 2 sistemas de suporte de vida.

Um dos sistemas de suporte de vida (nº 1) consistiu num sistema fechado de recirculação de água, com: 6 tanques de 55 L, 1 bomba de circulação de água Hailea 6850, filtro mecânico (lã de vidro), filtro biológico (biobolas), filtro UV TMC V²ecton 600, arejamento forte e termóstato Eheim Jeiger 300 regulado para 26°C. Este sistema tinha por finalidade receber os lotes de peixes adquiridos, de forma a assegurar o seu controlo sanitário (quarentena) e aclimatá-los nas novas instalações de temperatura controlada (28 ± 1.1° C).

Em seguida os peixes eram transferidos para outro sistema (nº 2), que era em tudo idêntico ao anterior, excepto no facto de ser constituído por 12 aquários de 45 l.

2.2 - Engorda e maturação de reprodutores

O sistema destinado à engorda e maturação de reprodutores contou com 24 aquários de pequenas dimensões (≈ 8 L), à semelhança dos dois sistemas anteriores para quarentena e manutenção do manancial de *G. rufa*. No entanto, este sistema contou com um filtro UV TMC V²ecton 400.

Este sistema destinava-se à obtenção de peixes reprodutores, procurando distinguir machos e fêmeas. O isolamento diminuiria a competição dos indivíduos por recursos, como o alimento e espaço, deixando-os mais aptos para crescerem e se reproduzirem.

2.3 – Manutenção de *G. rufa*.

O laboratório de aquacultura ornamental estava provido de fotoperíodo de 12h luz/escuro e mantinha temperatura ambiente de 26°C, por meio de um aparelho de ar condicionado.

Os peixes foram alimentados *ad libitum* 3 vezes ao dia, com a ração comercial *Dr. Bassleer Biofish Food Regular M* (Aquarium Münster, Telgte, Germany): às 9h, 13h e 19h, respectivamente.

Semanalmente, procedeu-se a mudas parciais de água ($2/3$), sifonagem do fundo dos tanques e da *sump*, limpeza dos filtros e das bombas. A água era proveniente da rede de abastecimento público de Peniche (Portugal). No dia anterior à muda parcial de água dos sistemas de suporte de vida, a água da rede pública era armazenada num tanque, para garantir perda de cloro (ainda que parcial) e aquecimento para uma temperatura compatível àquela em que os peixes *G. rufa* se encontravam.

A qualidade da água de cada sistema de suporte de vida foi monitorizada 2 vezes por semana, com *Speedy-Test*, para a avaliação imediata de pH, GH, KH, cloro, nitritos e nitratos, e com o teste rápido de amónia da Prodac (Pro.d.ac International S.r.l., Cittadella, Italy). Estes testes permitiam saber rapidamente se as condições ambientais nos sistemas de suporte de vida eram compatíveis como bem-estar dos peixes *G. rufa*.

A quantificação destes parâmetros foi avaliada com maior rigor uma vez por mês, usando uma sonda multiparamétrica YSI Professional Plus (YSI Incorporated, Yellow Springs, E.U.A.) para avaliação de pH, temperatura e oxigénio dissolvido na água. E usaram-se testes de avaliação de amónia, nitritos e nitratos para o fotómetro HANNA HI 83203 (HANNA Instruments, Póvoa de Varzim, Portugal). Estas medições mais rigorosas ocorreram aleatoriamente antes ou depois da muda parcial de água dos sistemas, para se ter uma indicação quantitativa das melhores e piores condições da qualidade da água dos sistemas de suporte de vida de *G. rufa*.

Um termómetro indicador das temperaturas mínima e máxima por dia foi colocado junto dos sistemas de suporte de vida, para fornecer informação da variação da temperatura diária do ar no laboratório.

Durante os primeiros 6 meses, os peixes eram monitorizados quinzenalmente relativamente à sua condição física. Eram medidos com uma escala de bancada, para determinar o seu comprimento total, com auxílio de uma rede camaroeira. Posteriormente, este procedimento passou a ser executado mensalmente.

Durante todos os momentos de execução das rotinas diárias de manutenção dos sistemas de cultivo, os peixes eram observados para se determinar se havia ocorrência de mortalidade, lesões, peixes doentes e presença de peixes nas *sumps* ou no chão. O

comportamento destes peixes foi também alvo de interesse, prestando-se atenção: à forma como nadavam, se demonstravam medo dos cuidadores, se se escondiam ou imobilizavam no fundo dos tanques, se nadavam contra as paredes dos tanques, se faziam perseguições aos outros peixes, se mostravam frenesim por alimento e pela presença dos cuidadores, se todos apresentavam apetência pelo alimento, se todos se alimentavam e se havia algumas tentativas de saltar para fora dos tanques.

2.4- Dissecção de indivíduos *G. rufa*

Peixes encontrados mortos desde Fevereiro 2014, mas em bom estado de conservação, foram preservados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente foi avaliado o seu comprimento total e foram dissecados. Desta forma procurou-se detectar a presença de gónadas, avaliar se eram do género masculino ou feminino e avaliar o seu estado de maturação.

No caso das gónadas femininas, muitas não se encontravam em bom estado de conservação para se medir, nem aos seus óvulos. No entanto, sempre que possível, as gónadas e os óvulos foram medidos ao microscópio estereoscópico de dissecção Leica DM 125, que se encontrava ligado a uma camera de 5 megapixéis Leica MC 170. As imagens foram processadas através do Software Leica Application Suite 4.4.0.

2.5 – Ensaios para reprodução natural de *G. rufa*

Em finais de Junho de 2014, montaram-se 7 aquários com uma capacidade de 20 L equipados com um filtro interno com sistema *venturi* PAT MINI da Aqual (Varsóvia, Polónia), arejamento forte e um sistema duplo de redes no fundo, para evitar o contacto dos peixes com este (Fig.3.&b.). Materiais de enriquecimento ambiental foram inseridos nos aquários, tais como berlindes (para imitar o substrato), tubos de PVC (7 cm de comprimento e ¼” de diâmetro para providenciar refúgio) e pequenos tufos de musgo de Java.

Foram colocados grupos de 4 peixes *G. rufa* em cada aquário. Colocou-se película aderente no topo destes, de modo a tapar e evitar que os peixes saltassem para fora do aquário. Os peixes foram selecionados como sendo os maiores entre o sistema de reprodutores e os tanques comunitários do sistema nº2, de menor densidade.

G. rufa foram mantidos à semelhança dos restantes, com excepção de: 1) não se monitorizar a condição física dos peixes mensalmente e 2) da necessidade de sifonar o fundo dos aquários a cada 2 a 3 dias, com o intuito de remover o excesso de comida.

Desta forma, o fundo do aquário era inspecionado para detetar a presença de ovos, imediatamente antes de se fornecer o alimento, 3 vezes ao dia.

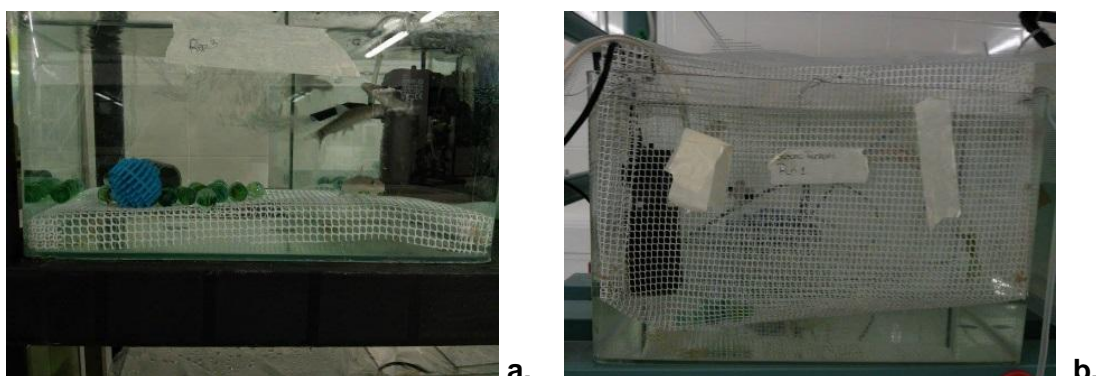


Figura 3: Aquários destinados à reprodução de *G. rufa* com dois tipos de redes protectoras, para evitar que os peixes tivessem contacto e enriquecimento do meio. (Autoria. Mónica Gomes).

2.6 - Frequência e sucesso reprodutivo de *G. rufa* em cativeiro

O fundo dos aquários era observado 3 vezes por dia, no horário de fornecimento de alimento, de modo a verificar a ocorrência de aparecimento de ovos. Caso houvesse postura, os progenitores eram retirados dos aquários. Os ovos que se encontravam em bom estado eram removidos com uma pipeta de Pasteur, de ponta cortada, e colocados num aquário à parte, com arejamento suave. Neste procedimento, os ovos foram contabilizados e monitorizados ao longo do tempo, de modo a determinar o sucesso reprodutivo (Baldisserotto et al, 2009). Ovos que apresentassem fungos, ou que mostrassem degeneração, eram removidos.

Face à perda de várias posturas por causa da presença de fungos, optou-se por utilizar azul metileno, nas últimas desovas, com uma concentração de 0.5 mg l^{-1} (Bassler 2009). Alguns dos ovos foram retirados à parte e monitorizados hora a hora pela forma como se processava o seu desenvolvimento embrionário. Após a eclosão, forneceu-se a ração comercial moída às larvas. Observou-se qual o momento em que estas se alimentaram pela primeira vez e o seu comportamento foi monitorizado à semelhança dos outros peixes.

2.7 - Desenvolvimento embrionário de *G. rufa*

Alguns dos ovos foram escolhidos a partir das desovas que se sabia terem ocorrido muito recentemente à sua descoberta, para serem monitorizados hora a hora, com vista ao estudo do seu desenvolvimento embrionário. Os ovos foram fotografados com um

microscópio óptico composto Leica DM 2000 LED (Fig. 4a) ou com um microscópio estereoscópico de dissecação Leica DM 125 (Fig. 4b), equipados com uma câmara de 5 megapixéis Leica MC 170 HD. As imagens foram processadas através do Software Leica Application Suite 4.4.0. (Fig. 5). Algumas das vezes, os embriões foram retirados do interior do ovo, com recurso a pinças de relojoeiro nº 5, para melhor se observar as diferentes estruturas. Assim, determinou-se a duração e ocorrência de alguns dos principais eventos de desenvolvimento embrionário de *G. rufa*.



Figura 4: **a.** Microscópio Leica DM 2000 LED com câmara Leica MC 170 HD incluída (Autoria: Mónica Gomes, 2015) e **b.** Microscópio estereoscópico de dissecação DM 125 câmara Leica MC 170 HD incluída. (Autoria: <http://www.leica-microsystems.com/products/stereo-microscopes-microscopes/research-manual/details/product/leica-dm125/>).

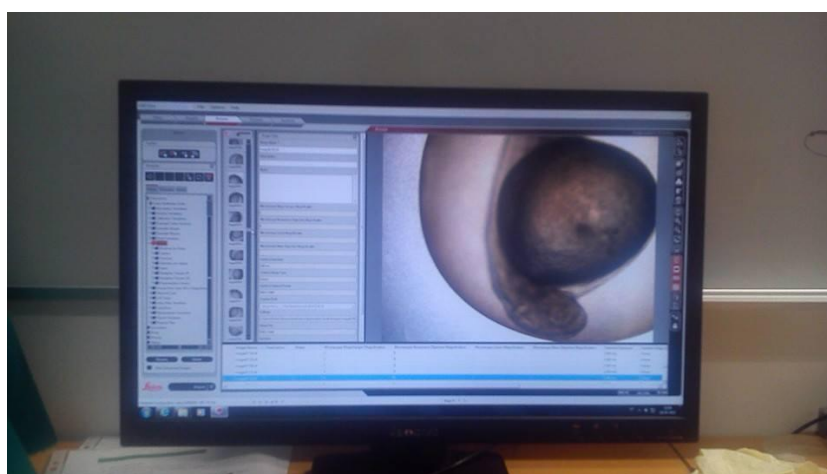


Figura 5: Software Leica Application Suite 4.4.0. (Autoria: Mónica Gomes, 2015).

2.8 - Desenvolvimento larvar e crescimento individual de juvenis

G. rufa

Após a eclosão, procedeu-se à alimentação, monitorização dos sistemas de suporte de vida e observação do comportamento das larvas e juvenis, à semelhança dos restantes peixes *G. rufa*. Os juvenis foram mantidos num aquário de 60 l, com filtro externo Prodac Magic Filter 2, com UV integrado (Pro.d.ac International S.r.l., Cittadella, Italy). Devido à fragilidade e ao reduzido tamanho das larvas a quando da eclosão, o comprimento total destas foi determinado ao microscópio estereoscópico de dissecação Leica DM 125 (Fig. 4b), equipado com uma câmara de 5 megapixéis Leica MC 170 HD, com auxílio do processamento de imagem através do *software* Leica Application Suite 4.4.0.. Ao fim de 15 dias após a eclosão, executou-se o mesmo procedimento para avaliar o comprimento total dos juvenis. Posteriormente, optou-se por fazer as medições mensalmente, com uma régua de bancada, à semelhança dos restantes *G. rufa*. A avaliação do crescimento linear dos juvenis foi executada em indivíduos de uma postura obtida em 2 de Junho, que foi monitorizada até ao final de Outubro de 2015.

2.9 – Tratamento e análise de dados

A maioria dos resultados foi apresentada como valor da média \pm erro padrão ou somente a média.

Para avaliar o sucesso de reprodução, procedeu-se ao cálculo das taxas de fecundação (Tf), eclosão (Te), à taxa de sobrevivência larvar (Tsl).

De acordo com o autor Baldisserotto et al (2009), a taxa de fecundação é calculada pela relação entre o número de ovos fertilizados e o número total de ovos libertados, expressa em percentagem, ou seja: **Tf = nº de ovos fertilizados / nº de ovos inviáveis) \times 100**. De acordo com estes autores, uma postura só poderá ser classificada como bem sucedida se tiver valores superior a 70%.

A taxa de eclosão, de acordo com o autor Reis (2003), é calculada em função do número de larvas eclodidas em relação ao total da amostra, o que inclui os ovos não eclodidos, sendo expressa em percentagem: **Te = (nº de larvas eclodidas / nº de ovos fecundados totais) \times 100**.

A taxa de sobrevivência larvar foi considerada como sendo o número de larvas eclodidas que conseguiram sobreviver as primeiras 48h de vida, até à completa

absorção do saco vitelino e primeira ingestão de alimento: **Tsl = (nº de juvenis / nº de larvas eclodidas) × 100.**

A análise estatística dos dados foi executada recorrendo ao *software* SigmaStat 2.0 (Systat Software, San Jose, California). Os dados foram analisados relativamente à sua distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Se esses pressupostos se cumprissem, realizaram-se testes paramétricos, caso contrário, usaram-se testes não paramétricos

Testes *Z* foram executados para comparar as taxas de fecundação, eclosão e sobrevivência larvar entre todas as posturas e somente as bem sucedidas, bem como entre as posturas em que se usou, ou não, azul de metileno como desinfectante. Os resultados foram apresentados como ($Z_{(graus\ de\ liberdade)}$ = valor do teste; valor de significância *p*)

Uma análise de regressão polinomial foi realizada para relacionar o comprimento total das fêmeas e o número de óvulos presentes nas suas gónadas. Os resultados foram apresentados como (equação; R^2 = valor do coeficiente de determinação; valor de significância *p*).

3 - Resultados

3.1 – Monitorização dos parâmetros de qualidade da água

Os vários sistemas de suporte de vida, utilizados para a manutenção e reprodução de *G. rufa*, apresentaram sempre valores aceitáveis ao bem-estar dos animais, relativamente aos vários parâmetros de qualidade da água, que foram monitorizados ao longo do tempo (Tabela II).

A temperatura manteve-se na gama média da amplitude referenciada para a espécie *G. rufa*, mas os valores elevados traduziram-se em valores de oxigénio dissolvido ligeiramente inferiores aos recomendados. O pH apresentou valores na ordem 8. Os valores de amónia, nitritos e nitratos ficaram abaixo dos valores referenciados pela Directiva 2006/44/EC para Águas de ciprinídeos e valores recomendados por marcas de produtos para Aquariorfilia (Keppler, 2009).

Tabela II: Parâmetros de qualidade da água do sistema de suporte de vida de *G. rufa*

<u>Parâmetro</u>	<u>Valor</u>	<u>Referência</u>	
		Directiva 2006/44/EC	(Keppler, 2009)
Temperatura (°C)	28,4 ± 1,1	-	24 – 28
Oxigénio dissolvido (mg l ⁻¹)	4,5 ± 0,25	≥ 5	-
pH	8,01 ± 0,16	6 - 9	6,5 – 7,5
Amónia (mg l ⁻¹)	0,16 ± 0,07	< 0,2	< 0,25
Nitritos (mg l ⁻¹)	0,09 ± 0,11	< 0,03	< 0,1
Nitratos (mg l ⁻¹)	9,80 ± 5,96	-	< 50

3.2 - Dissecação de indivíduos *G. rufa*

Através da dissecação dos peixes que morreram ao longo dos procedimentos experimentais, preservados em formalina tamponada a 10%, pôde verificar-se que não se conseguiu diferenciar o sexo dos indivíduos até ao comprimento total de 4,6 cm (Fig. 7a.). O menor macho foi observado com 4,8 cm de comprimento total, ao passo que a menor fêmea apresentou 5,0 cm. De acordo com estes valores, a maturação

sexual de *G. rufa* deverá ter ocorrido quando os peixes atingiram tamanhos entre os 4,5 os 5,5 cm de comprimento total.

Não se encontrou nenhuma relação biométrica entre o tamanho das fêmeas e o número de óvulos apresentados (Fig. 6b.). Só se verificou a presença de óvulos bem distintos em fêmeas partir dos 5,5 cm de comprimento total. Uma fêmea de 5,7 cm de comprimento total apresentou um número mínimo de 91 óvulos e o número máximo de 282 óvulos foi alcançado numa fêmea de 6,5 cm.

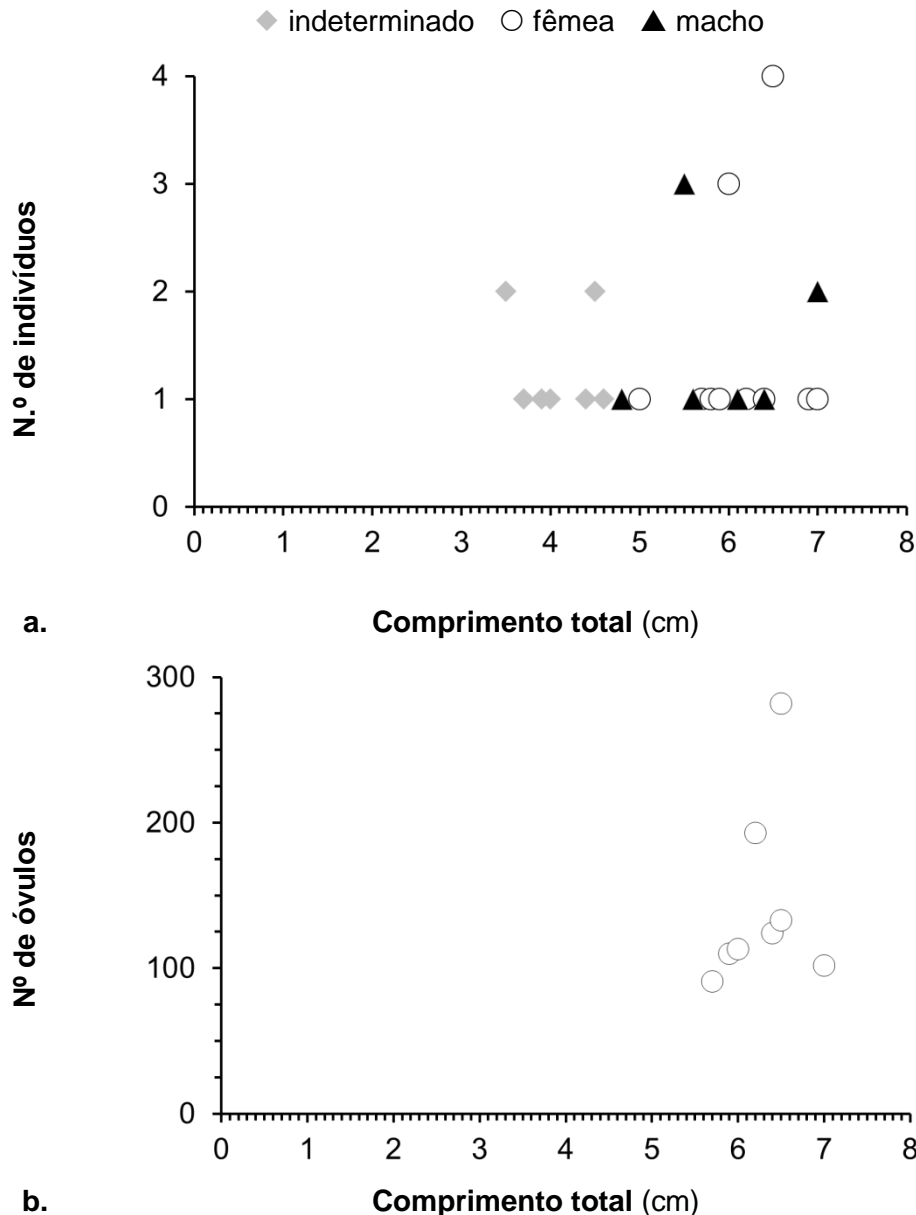


Figura 6: **a.** Frequência absoluta de indivíduos *G. rufa* de sexo indeterminado, fêmea ou macho relativamente ao seu comprimento total, que morreram ao longo do estudo, foram preservados em formalina a 10% e posteriormente dissecados (N = 33); **b.** Número de óvulos observados em fêmeas *G. rufa* dissecadas relativamente ao tamanho das mesmas ((equação polinomial fraca e não significativa: $y = -203.09x^2 + 2609.5x - 8203.7$; $R^2 = 0.3741$; $N = 8$; $p > 0,05$)

Os óvulos apresentaram tamanhos diferentes, no interior das fêmeas, correspondentes a diferentes estágios de maturação (Fig. 7). No entanto, a maioria encontrava-se em mau estado de conservação para obter uma biometria fidedigna. Ainda assim, observaram-se óvulos desde 395,14 μm a 863,33 μm de diâmetro e as gónadas mediam aproximadamente 18,7% do comprimento total das fêmeas.

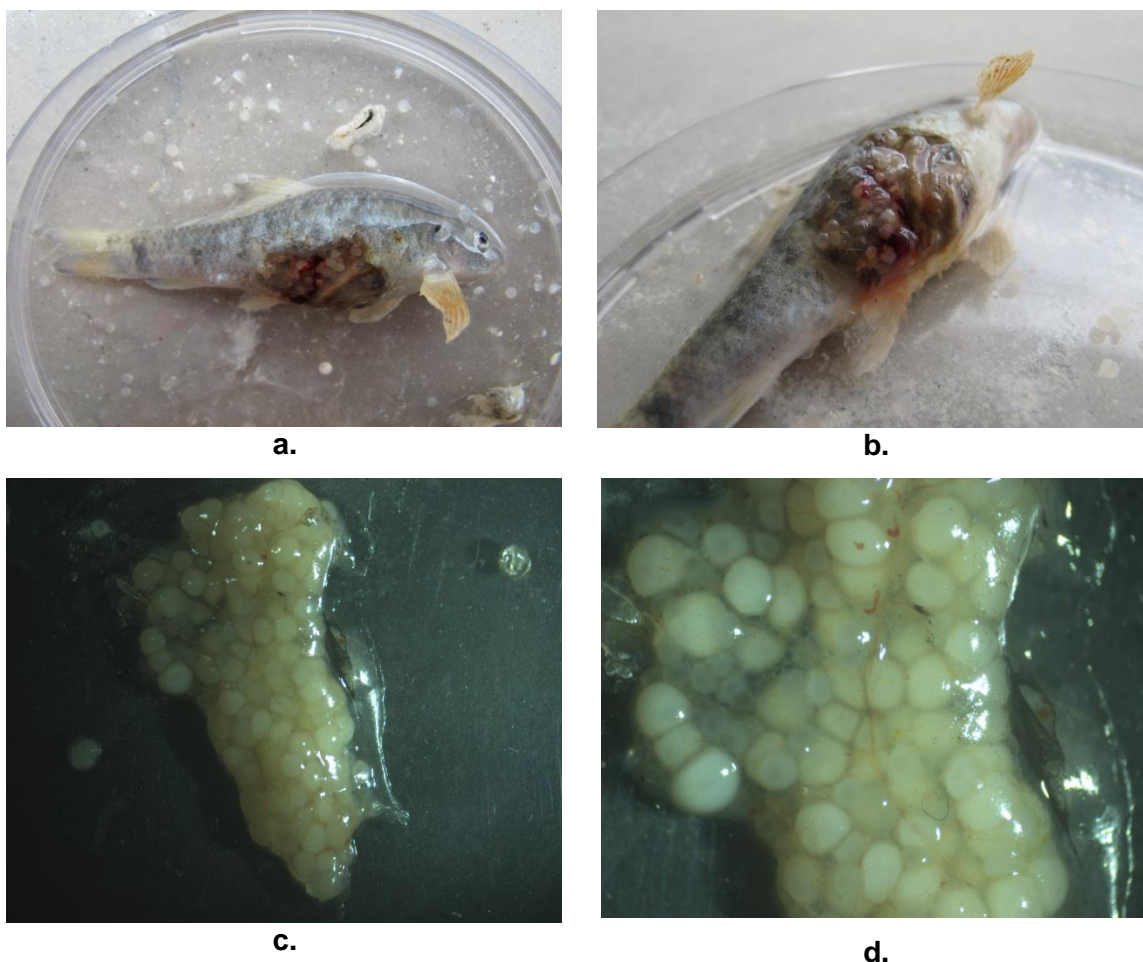


Figura 7: **a,b.** Fêmea sacrificada onde se pode observar os óvulos no seu interior, fotografados com uma câmara Canon Powershot G15. **c.** Gónada (ampliação total de 10x) e **d.** Pormenor dos diferentes estágios de maturação dos óvulos (ampliação total de 20 x), observados ao microscópio estereoscópico de dissecação. (Autoria: Mónica Gomes, 2015).

3.3 - Engorda e maturação de reprodutores

A manutenção de peixes *G. rufa* isolados, com vista à obtenção de um conjunto de reprodutores, demonstrou ser ineficaz. Os peixes demonstraram-se agitados ao serem isolados e confinados a um volume reduzido. Todos os dias, várias vezes ao dia, encontraram-se peixes que haviam saltado para o aquário vizinho ou para o chão. A tentativa de vedar a superfície dos aquários com rede não os impediu de tentar escapar dos aquários. Registou-se 50% de mortalidade (N = 40 peixes), neste sistema de

suporte de vida. A monitorização do seu crescimento individual também não foi possível de executar fidedignamente. Quando os peixes *G. rufa* saltavam para o aquário vizinho, não se conseguiu diferenciar e identificar os 2 ou mais indivíduos, relativamente ao seu aquário original.

No tanque comunitário de baixa densidade ($0,32$ peixes l^{-1}), os peixes *G. rufa* apresentaram crescimento individual de $0,7 \pm 0,05$ cm $mês^{-1}$, Tendo sido adquiridos com o tamanho inicial/comercial de $3,69 \pm 0,07$ cm de comprimento total, demoraram 3 meses a atingir o tamanho de 5,5 cm, em que seriam potenciais reprodutores (Fig. 8).

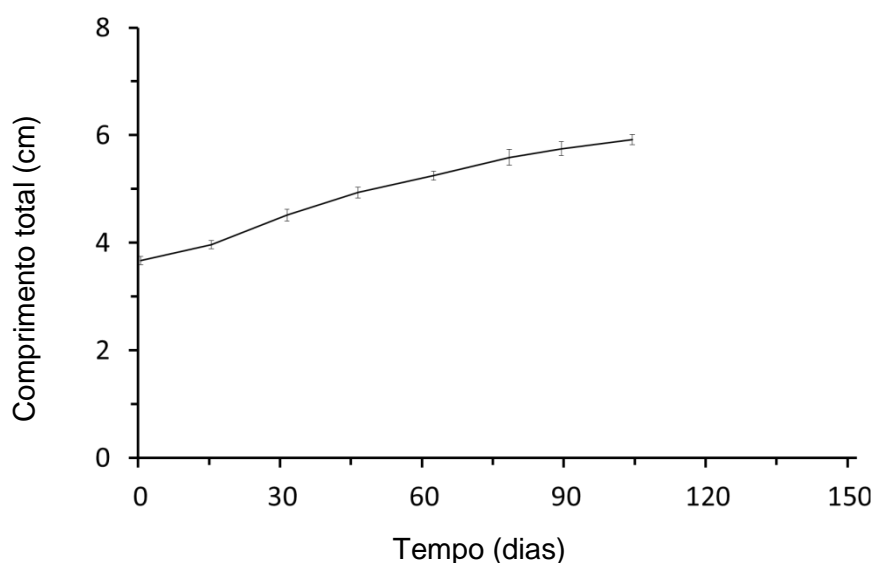


Figura 8: Crescimento linear de *G. rufa* isolados para obtenção de um conjunto reprodutores, desde o seu tamanho comercial (cm) até serem potenciais reprodutores (entre os 5 a 6 cm de comprimento total). (N=40).

A distinção entre machos e fêmeas de *G. rufa* foi possível somente no momento de reprodução. Observou-se que as fêmeas portadoras de ovos maduros, prestes a desovar, apresentavam a região abdominal muito dilatada e redonda (Fig. 7 a,b.). Passados uns dias, as fêmeas voltavam à forma esguia e fusiforme inicial, mas nunca se conseguiu observar a presença de ovos no fundo dos aquários.

Por sua vez, os machos eram mais largos e com a parte ventral achatada. Raramente foi possível distinguir os tubérculos brancos ao redor das narinas, típicos dos machos ciprinídeos (Fig. 9 a,b.). A dificuldade nessa observação deveu-se maioritariamente ao comportamento irrequieto destes peixes e à cor clara que eles adoptaram nos aquários do sistema de suporte de vida. Para obter uma confirmação da presença de tubérculos, foi necessário mudá-los para recipientes escuros, de forma a

mudarem a cor da pigmentação da pele, mas mesmo assim, foram raras as observações positivas.

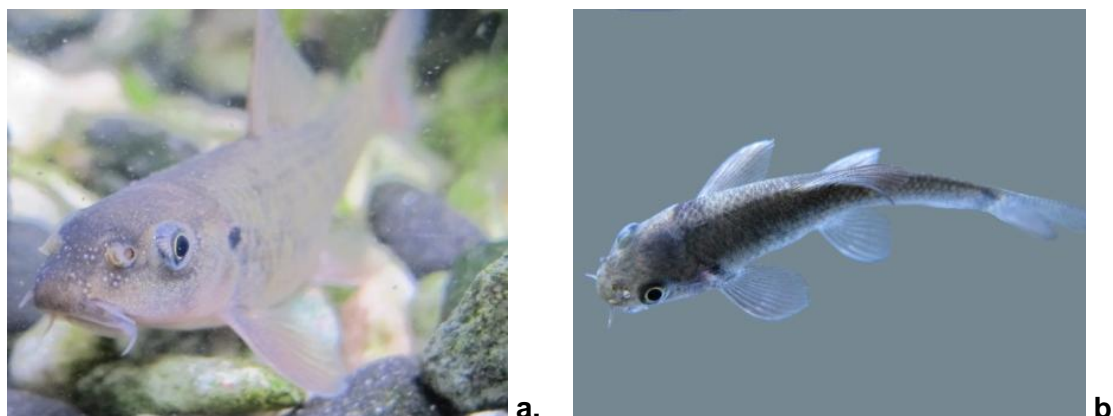


Figura 9: Fotografias obtidas com uma câmara Canon Powershot G12, de: **a.** um macho *G. rufa*, que apresenta tubérculos brancos junto das narinas e **b.** um peixe de sexo indeterminado, sem os tubérculos. (Autoria: Susana Ferreira, 2013).

3.4 – Ensaios para reprodução de *G. rufa*

Os reprodutores selecionados demoraram cerca de 1 semana a adaptarem-se às novas condições ambientais. Nesse período, os peixes foram relutantes em demonstrar interesse pela presença dos cuidadores, especialmente no horário normal de alimentação, mas evidenciaram sempre apetência pelo alimento. Observou-se igualmente que permaneciam quietos durante longos períodos de tempo, escondidos por detrás dos filtros internos e de alguns dos materiais de enriquecimento ambiental.

Na segunda semana de aclimação, os peixes começaram a demonstrar o seu comportamento normal: inquietos, exploratórios e a exibição de frenesim na presença dos cuidadores, especialmente no horário normal de fornecimento de alimento.

Ao fim de 2 meses, observou-se que os indivíduos mais largos e de ventre achatado (em princípio, machos, embora não fosse possível observar os tubérculos brancos na cabeça) perseguiram a indivíduos mais esguios e fusiformes (em princípio, fêmeas). A perseguição era executada em grande velocidade, até a fêmea conseguir encontrar um abrigo. Nunca se observou qualquer outro comportamento agressivo (como, morder, expulsão do abrigo, competição pelo alimento) ou lesões resultantes da perseguição. Posteriormente, passou a observar-se movimentos de natação sincronizada entre os dois indivíduos, em círculos, com contacto físico entre os corpos de ambos. Tal assemelhava-se a um comportamento de acasalamento ou corte nupcial.

Foram necessários 4 meses, para conseguir observar uma primeira postura de *G. rufa*, desde a colocação nos aquários dos reprodutores. Os ovos desta espécie foram

encontrados depositados no fundo do aquário (demersais), com forma redonda, transparentes, não adesivos (livres). Estes apresentavam aproximadamente $1,69 \pm 0,02$ mm (N = 3; Fig. 5a.) de diâmetro. Apesar das várias posturas que se seguiram, nunca se observaram as fêmeas redondas, com o ventre dilatado pela presença de ovos maduros.

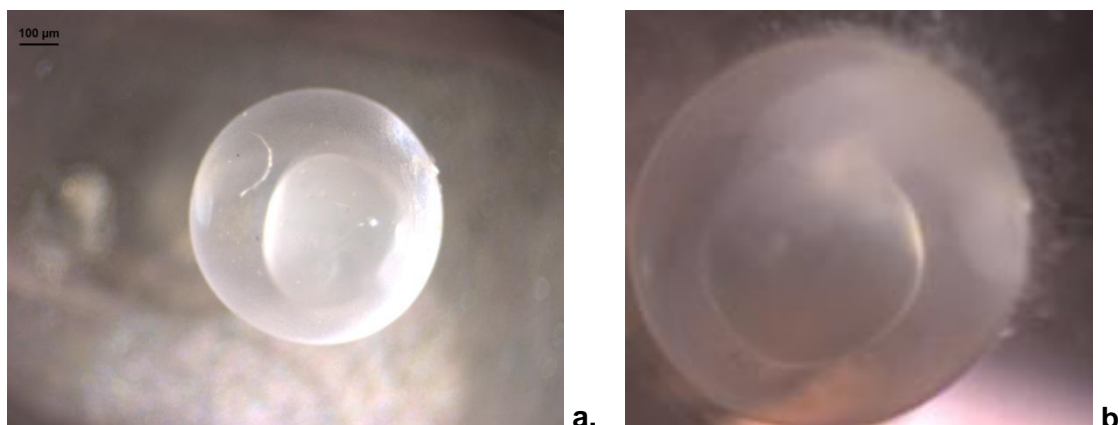


Figura 10: Fotografia de ovo de *G. rufa* tirada: **a.** um ovo saudável, e **b.** um ovo contaminado com fungos, observados ao microscópio estereoscópio de dissecação (ampliação total de a. 20× e b. 40X). (Autoria: Mónica Gomes, 2015).

O sistema de redes nos aquários nem sempre foi eficaz para evitar que os reprodutores tivessem acesso ao fundo. Foi frequente encontrar os reprodutores no fundo dos aquários a explorar pela procura de alimento

3.5 - Frequência e sucesso reprodutivo de *G. rufa* em cativeiro

De Outubro de 2014 a Junho de 2015, ocorreu um número total de 31 posturas. Essas posturas verificaram-se todos os meses, aumentando progressivamente a frequência de Outubro de 2014 ($0,67$ desovas aquário⁻¹) a Março de 2015 ($2,50$ desovas aquário⁻¹) (Fig.11a). Após isso, o número de desovas foi decrescendo consideravelmente, com valores inferiores a $0,25$ desovas aquário⁻¹, incluindo Fevereiro de 2015 ($0,08$ desovas aquário⁻¹). As posturas ocorreram com maior frequência durante a noite/madrugada (45,16%), seguidas do período da tarde (29,03%) e com menor frequência de manhã (25,81%) (Fig. 11b.)

Das posturas mais bem sucedidas, 3 foram durante a manhã e 4 durante a tarde. A maioria das posturas inviáveis foram as que ocorreram durante a noite.

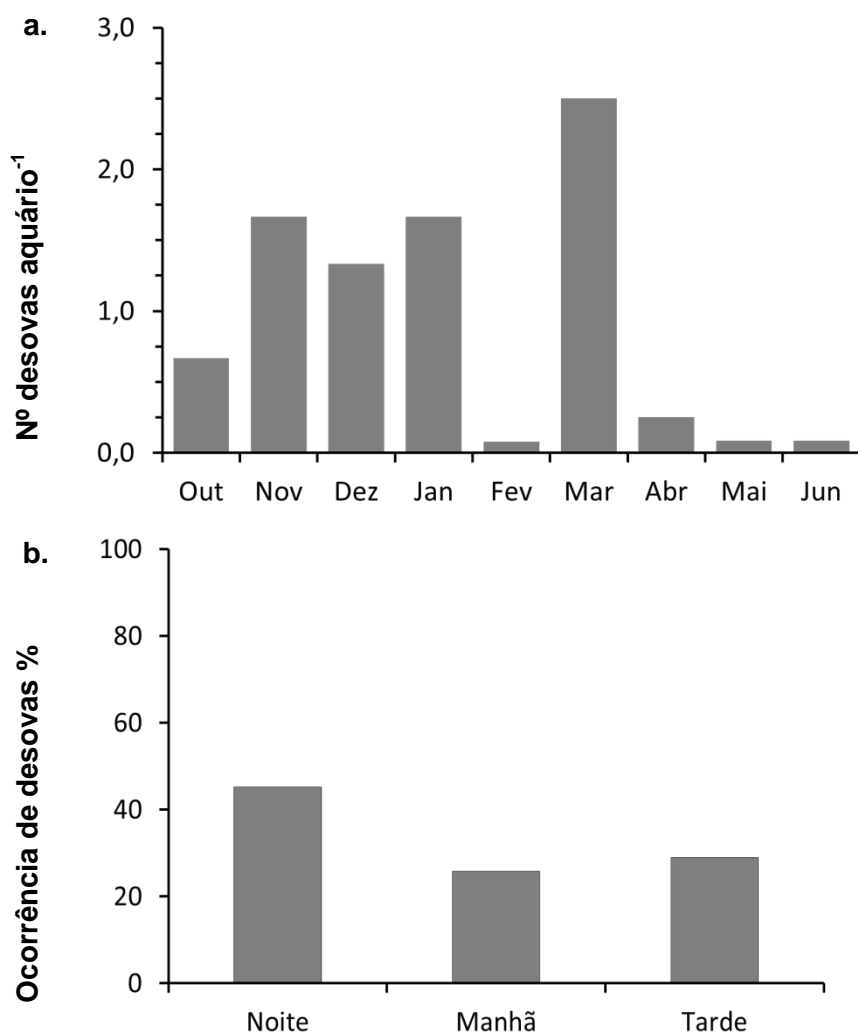


Figura 11: **a.** Frequência relativa de desovas de *G. rufa* por aquário, observada entre Outubro de 2014 e Junho de 2015. e **b.** Período com maior ocorrência de desovas (noite – Verificado às 9.00; manhã – Verificado entre as 13h e as 14h, tarde – verificado entre as 14h às 19h).

Doze das posturas de *G. rufa* (38,71%), obtidas neste estudo, foram completamente inviáveis, tendo os ovos sido encontrados já inteiramente cobertos por uma película de fungos brancos (Fig. 10b).

As restantes 19 posturas (61,29%) apresentaram uma taxa de fecundação de $47,26 \pm 0,29\%$ (Fig. 12a.). Entre estas, apenas 7 (22,58%) puderam ser consideradas como bem-sucedidas [$> 70\%$; de acordo com Baldisserotto et al (2009)], apresentando uma taxa de fecundação superior $83,21 \pm 0,46\%$ (Fig. 12b.), ainda que esta comparação não apresentasse suporte estatístico (Tab.III).

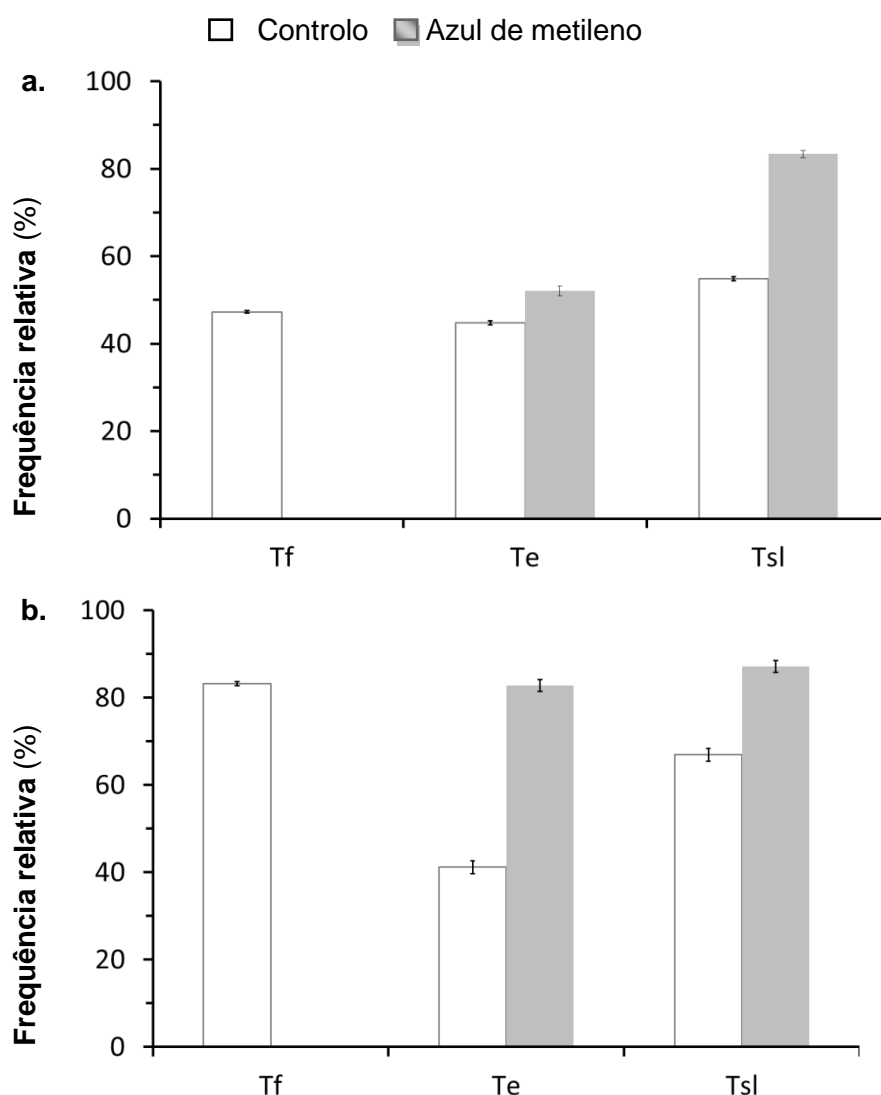


Figura 12: Taxa de fecundação (Tf), taxa de eclosão (Te) e taxa de sobrevivência larvar (Tsl) em **a.** todas as desovas (N = 19), excluindo aquelas em que todos os ovos foram inviáveis, devido à contaminação por fungos (N = 12); e **b.** apenas em desovas bem-sucedidas (N = 7; taxa de fecundação superior a 70%, de acordo com Baldisserotto et al (2009)), obtidas entre Outubro de 2014 e Junho de 2015.

As posturas viáveis, apresentaram uma taxa de eclosão de $44,73 \pm 0,47\%$ sem a utilização de azul de metileno (Fig. 12a.), comparável aos $52,10 \pm 1,08\%$ das posturas bem sucedidas, na mesma condição (Fig. 12b.; Tab.III). Em geral, a utilização de azul de metileno obteve taxas de eclosão mais elevadas, especialmente notável no caso das posturas bem-sucedidas ($82,77 \pm 1,31\%$) (Fig. 12b.) em relação à totalidade das posturas viáveis ($52,10 \pm 1,08\%$ Fig. 12a.), embora não se tivesse comprovado estas diferenças em termos estatísticos (Tab. III).

A taxa de sobrevivência larvar foi semelhante no cenário da totalidade das posturas viáveis e no da análise das posturas que foram unicamente bem-sucedidas (Tab.III), quer na situação de controlo ($66,91 \pm 1,70$ e $54,85 \pm 0,50\%$, respectivamente;

Fig. 12a. e Fig. 12b.), quer na utilização de azul de metileno ($87,14 \pm 1,02$ e $83,41 \pm 0,82\%$, respectivamente; Fig. 12a.e Fig. 12b; Tab. III). No entanto, a taxa de sobrevivência das larvas eclodidas foi superior quando se utilizou azul de metileno, ainda que não se tenha obtido confirmação estatística deste resultado. Quase todas as posturas viáveis resultaram em juvenis saudáveis. Somente duas ocorrências de anomalias foram registadas: 1) em que os juvenis apresentavam deformações da corda dorsal e da cauda e 2) em que os juvenis apresentavam uma relação comprimento total / largura do corpo bem mais reduzida que os seus semelhantes.

Tabela III – Resultados das análises estatísticas (teste Z) para comparar as taxas de fecundação, eclosão e de sobrevivência larvar, entre todas as posturas observadas e somente as bem sucedidas, com ou sem a utilização de azul de metileno.

Taxa	Posturas	Teste Z	Valor de p	Diferenças estatisticamente significativas
Fecundação	Todas x Bem sucedidas	$Z_{25} = 1,342$	$p > 0,05$	Não
Eclosão	Todas: Controlo x Azul de metileno	$Z_{17} = 0,195$	$p > 0,05$	Não
	Bem sucedidas: Controlo x Azul de metileno	$Z_5 = 0,331$	$p > 0,05$	Não
	Controlo: Todas x Bem sucedidas	$Z_{15} = 0,451$	$p > 0,05$	Não
	Azul de metileno: Todas x Bem sucedidas	$Z_7 = 0,165$	$p > 0,05$	Não
Sobrevivência larvar	Todas: Controlo x azul de metileno	$Z_7 = 0,691$	$p > 0,05$	Não
	Bem sucedidas: Controlo x Azul de metileno	$Z_5 = 0,272$	$p > 0,05$	Não
	Controlo: Todas x Bem sucedidas	$Z_5 = 0,152$	$p > 0,05$	Não
	Azul de metileno: Todas x Bem sucedidas	$Z_7 = 0,835$	$p > 0,05$	Não

3.6 - Desenvolvimento embrionário de *G. rufa*

Durante o presente estudo, não se conseguiu assistir à desova e fecundação. Devido à ausência de órgãos copuladores dos machos, crê-se que a fertilização seja externa e que ocorra durante a execução de uma corte nupcial, semelhante às observadas. Da mesma forma, nunca se observou o zigoto e os primeiros estádios do embrião.

O estudo do desenvolvimento embrionário deste peixe foi possível de observar devido à transparência dos ovos. Os ovos encontrados e recolhidos mais próximos da ocorrência da fecundação, permitiram estimar aproximadamente o tempo de duração das diferentes etapas do desenvolvimento embrionário desta espécie (Tabela IV).

Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel 1843), com vista à sua produção em Aquacultura

Tabela IV – Descrição subjectiva dos estádios de desenvolvimento e horas respectivas.

*- Não definido.

Estádio	Descrição	Ocorrência
Zigoto	Ovo recém fertilizado, composto por uma única célula.	0h
Segmentação	Ciclo de mitoses sucessivas até à fase de blástula.	*
Blástula	Fase de 128 células, em que estas se situam na periferia do embrião (blastodisco) a rodear uma cavidade cheia de fluidos.	2h30
Gástrula	Por epibolia (os micrómeros sofrem mitoses sucessivas e mais rápidas, que envolvem os macrómeros) – diminuição da espessura e alastrar de ambos o blastodisco e a camada sincicial do vitelo sobre a célula do mesmo, até envolverem o vitelo por completo.	3h30
Metamerização	Inclui a formação da corda dorsal, tubo neural (neurulação), sómitos, primórdio caudal, início da organogénese e movimentação.	5h
Faríngula	Estádio filotípico dos vertebrados, com cefalização pronunciada, primórdios dos olhos, ouvidos, arcos faríngicos, fendas branquiais, barbatanas, coração (circulação), sómitos, corda dorsal, tubo neural, cauda e pigmentação.	10h
Eclosão	Libertação da larva, que rompe o invólucro do ovo e nada livremente na água.	36h
Larva	Absorção de todo o saco vitelino e respectivo vitelo, formação da boca, capacidade de ingestão autónoma de alimento.	48h

Os ovos de *G. rufa* são telolecíticos - o pólo animal se encontra posicionado no topo de uma grande camada de vitelo, pelo que desenvolveram uma segmentação meroblástica discoidal.

Aproximadamente 2h30 após a fecundação, conseguiu observar-se a fase de blástula (Fig. 13a.).

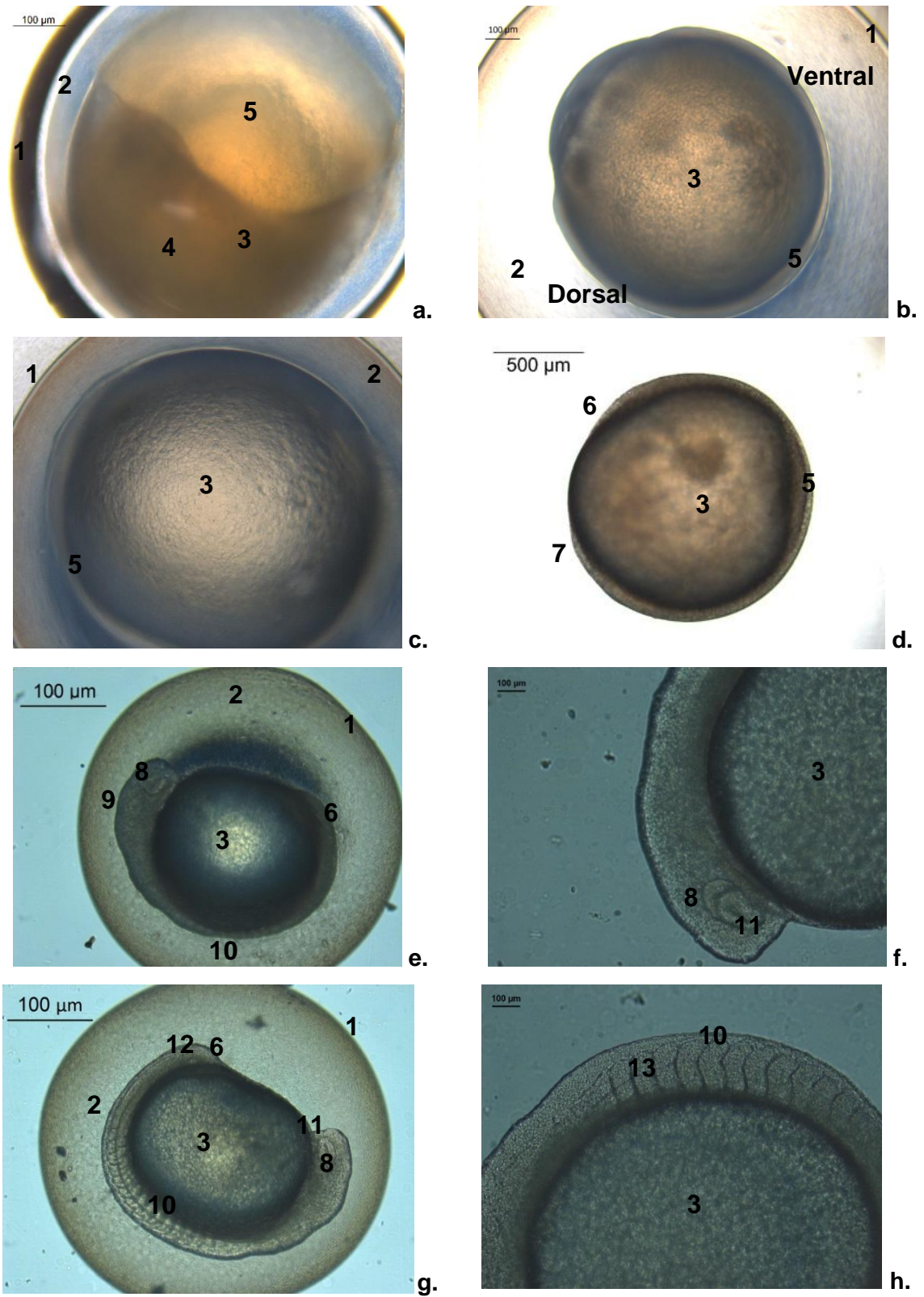
Posteriormente, os micrómeros começam a envolver o macrómero que detém as substâncias de reserva, por mitoses sucessivas – processo de epibolia, originando a gástrula (Fig. 13b). Neste processo ocorreu diminuição da espessura do blastodico e este, juntamente com a camada sincicial do vitelo, alastraram-se sobre o vitelo até o envolverem por completo (Fig. 13c.&d.), o que ocorreu 3h30 após a fecundação.

Depois observou-se o espessamento de uma das extremidades do embrião, do qual resultou o primórdio caudal (Fig. 13d.). Em seguida, a região anterior do embrião também se tornou mais espessa, onde se diferenciou a cabeça (Fig. 13e.), ao fim de 5h após a fecundação. Seguiu-se a diferenciação dos primórdios ópticos e das lentes oculares (cristalino) (Fig. 13f.)

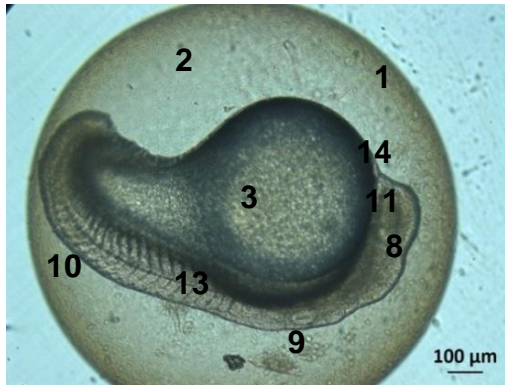
Os primeiros sómitos começaram a aparecer após 6h (Fig. 13e). O seu desenvolvimento acompanhou o alongamento do tronco (Fig. 13g.& h.), aumentando em número. Nessa altura, a cauda começou a destacar-se do saco vitelino, ao passo que houve um alongamento do embrião e do saco vitelino, de forma a endireitarem-se rectilaneamente no interior do córion (Fig. 13i.&j.), ao fim de 7h. Ao mesmo tempo, destacou-se a presença da notocorda. Às 10h já se podia observar batimentos cardíacos e o sangue a circular no interior do coração (Fig. 13i.& j.).

Posteriormente, a cabeça começou a destacar-se do saco vitelino e a cauda alongar-se cada vez mais (Fig. 13l.&m.). As barbatanas peitorais surgiram 13 h após a fecundação (Fig. 13n.). Por esta altura, a forma exterior da larva estava já definida, verificando-se apenas um aumento de tamanho e desenvolvimento dos diferentes órgãos nas 10h seguintes.

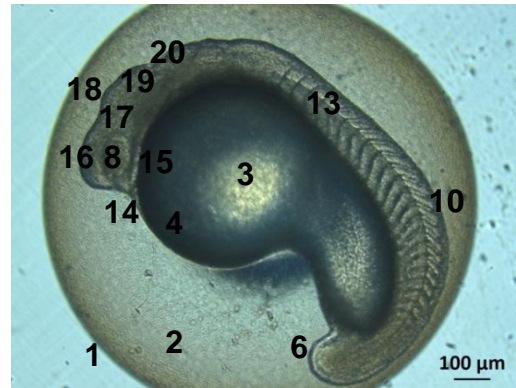
Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel 1843), com vista à sua produção em Aquacultura



Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel 1843), com vista à sua produção em Aquacultura



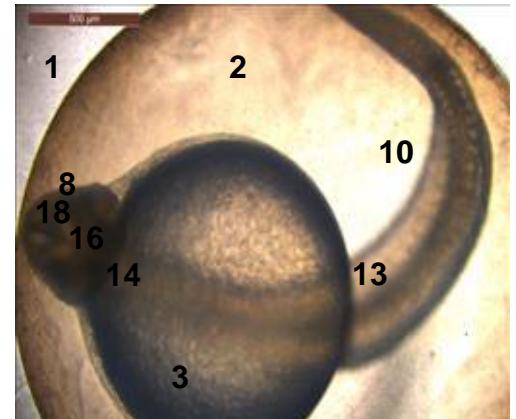
i.



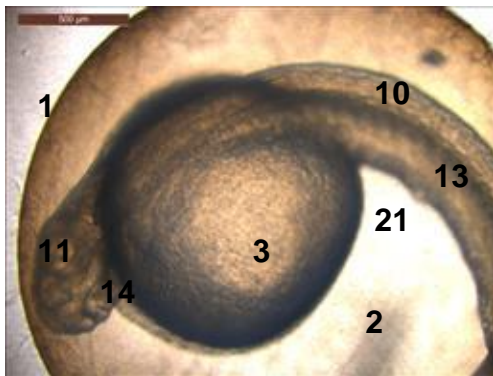
j.



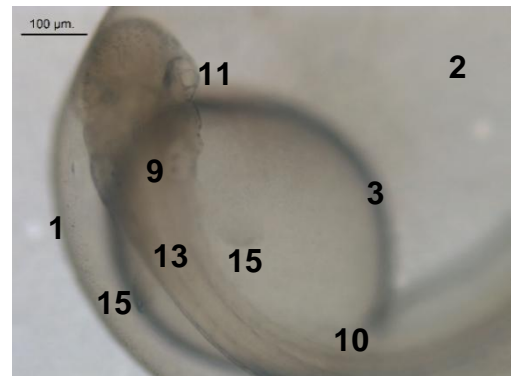
k.



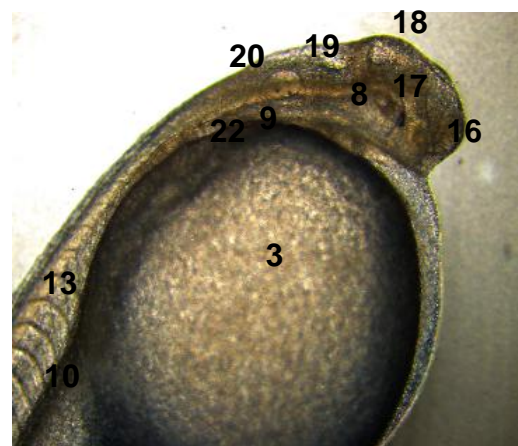
l.



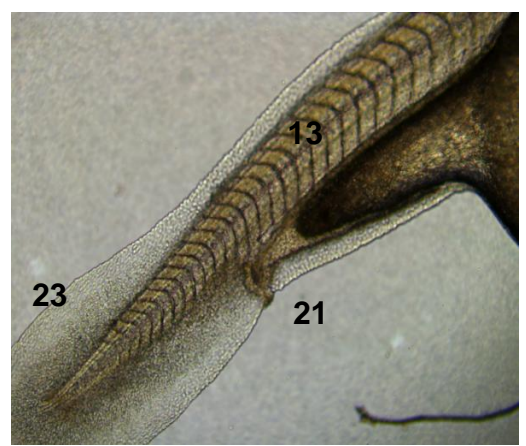
m.



n.



o.



p.

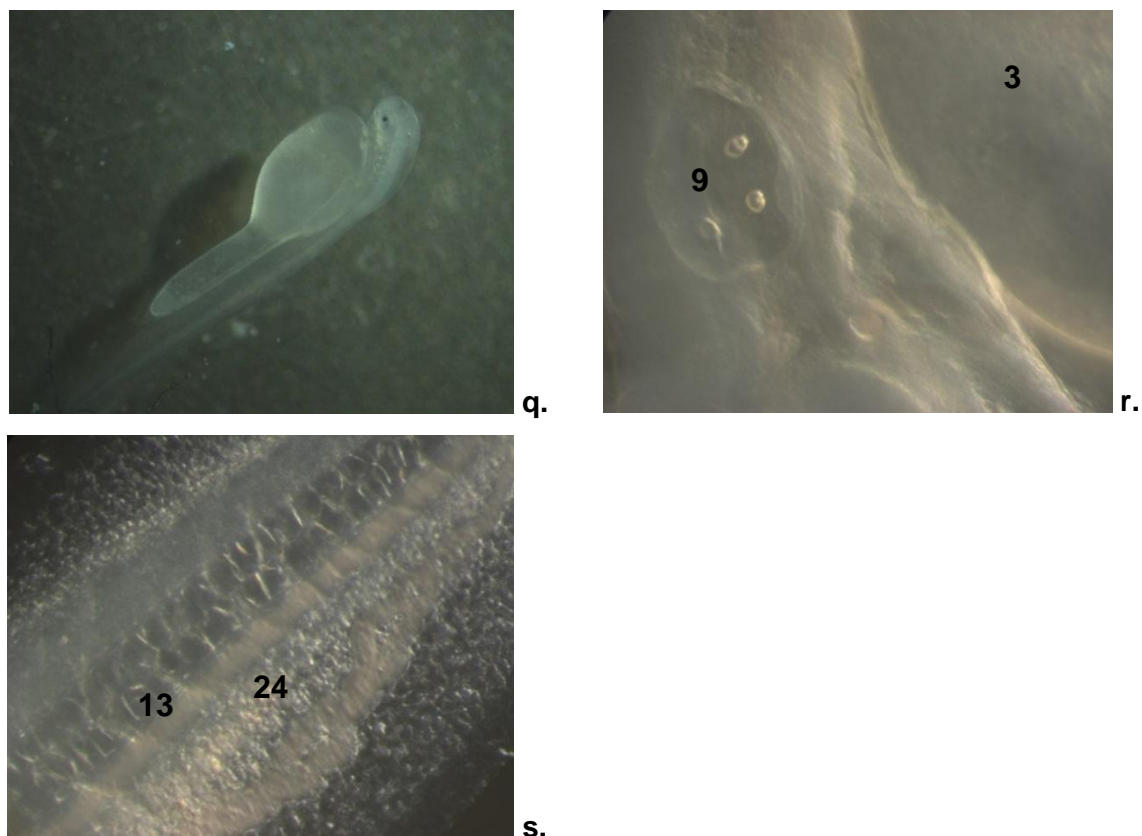


Figura 13: Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário de *G. rufa*, observados ao microscópio composto, com uma ampliação total de 50x. (Autoria: Mónica Gomes, 2015):

a. Blástula; **b.** Gástrula (75% epibolia); **c.** Gástrula (90% epibolia); **d.** Gástrula (90% epibolia), com remoção do córion; **e.** Organogénese – fase de 5 sómitos; **f.** Organogénese – fase de 5 sómitos, embrião sem córion, detalhe da região anterior; **g.** Organogénese – fase de 10 sómitos; **h.** Organogénese – fase de 14 sómitos, pormenor dos mesmos; **i.** e **j.** Organogénese – fase de 21 sómitos, diferentes perspectivas; **k.** Faríngula ainda não dobrada no ovo; **l.** Embrião – vista ventral; **m.** Embrião – vista ventro-lateral; **n.** Embrião pronto a eclodir; **o.** Larva recém-eclodida – região anterior; **p.** Larva recém-eclodida – região posterior; **q.** Larva recém-eclodida, observados ao microscópio estereoscópico de dissecção, com uma ampliação total de 20x; **r.** Destaque da vesícula auditiva com otólitos na larva; **s.** Destaque da corda dorsal, sómitos e tubo neural e na larva, observados ao microscópio óptico estereoscópico de dissecção, com uma ampliação total de 40x.

A numeração utilizada corresponde às seguintes estruturas: **1.** Córion; **2.** Espaço perivitelino; **3.** Vitelo/Saco vitelino; **4.** Glóbulo lipídico; **5.** Blastodisco; **6.** Primórdio da cauda; **7.** Região anterior do embrião; **8.** Primórdio óptico; **9.** Vesícula auditiva com otólitos; **10.** Sómitos; **11.** Primórdio da lente; **12.** Vesícula de Kupffer; **13.** Corda dorsal; **14.** Coração; **15.** Primórdio da barbatana peitoral; **16.** Telencéfalo; **17.** Diencefalo; **18.** Epífise; **19.** Mesencefalo; **20.** Cerebelo; **21.** Ânus; **22.** Primórdios dos arcos faríngeos; **23.** Barbatana caudal; **24.** Tubo neural.

A eclosão das primeiras larvas ocorreu ao fim de 36h, nadando contra o córion, até a cabeça conseguir romper o córion. Algumas demoraram mais tempo a sair do ovo, até às 48h (Fig. 13o.p.&q.). Algumas larvas foram incapazes de romper o córion e acabaram por sucumbir antes da eclosão. As larvas nasceram completamente transparentes, com os olhos já pigmentados de preto. Somente o saco vitelino e o tubo digestivo apresentavam uma cor branca mais opaca. Era possível observar o batimento cardíaco e o sangue a circular pelo corpo. Quando nasceram (Fig. 13q.), as larvas

tinham aproximadamente 5 mm de comprimento total e o saco vitelino ocupava a maior parte do seu corpo, tendo proporcionalmente 3 mm de comprimento.

3.7 - Desenvolvimento larvar e crescimento individual dos juvenis *G. rufa*

As larvas esgotavam as reservas do saco vitelino, enquanto seu sistema digestivo se desenvolvia e a boca se tornava funcional. O saco vitelino era reabsorvido em aproximadamente 48h após a eclosão. A partir dessa altura, as larvas passavam a alimentar-se, ingerindo pequenas partículas de ração moída que assentassem no fundo do aquário. Ao fim de 5 dias, já nadavam até à superfície da água para apanhar o alimento que lhes era fornecido pelos cuidadores.

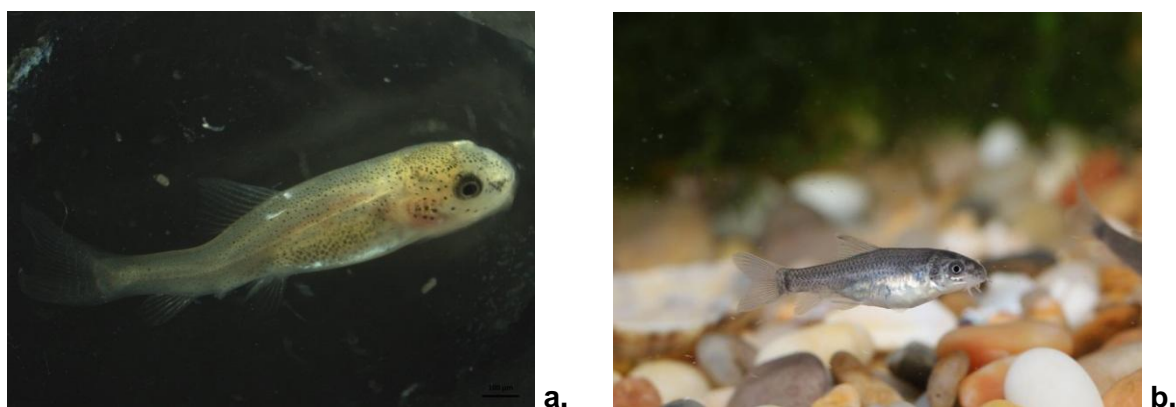


Figura 14: **a.** Juvenis com 2 semanas e **b.** 1 mês de idade, fotografados com uma câmara Canon 70D. (Autoria: Mónica Gomes, 2015).

Ao fim de 2 semanas, os juvenis apresentavam já alguma pigmentação da pele (Fig. 14a.), embora tivessem uma tonalidade esverdeada e ainda fossem transparentes em certas partes do corpo. Só aproximadamente 1 mês, depois de nascerem, é que os juvenis começaram a assemelhar-se com os adultos (Fig.14b.), de cor cinzenta metalizada.

Após a eclosão, as larvas *G. rufa* duplicaram o seu comprimento total nos primeiros 15 dias de vida. Depois, quadruplicaram de tamanho ao final do 1º mês e cresceram 1 cm no 2º mês de vida. O seu crescimento individual foi abrandando gradualmente, à medida que o seu tamanho aumentava. Os peixes demoraram 4 a 5 meses até atingirem o tamanho comercial, que corresponde a aproximadamente 3 a 4 cm de comprimento total (Fig. 15a.). Durante esse período, a mortalidade juvenil foi muito baixa, sendo que a postura monitorizada não registou a ocorrência de qualquer mortalidade de juvenis (Fig. 15b.).

Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel 1843), com vista à sua produção em Aquacultura

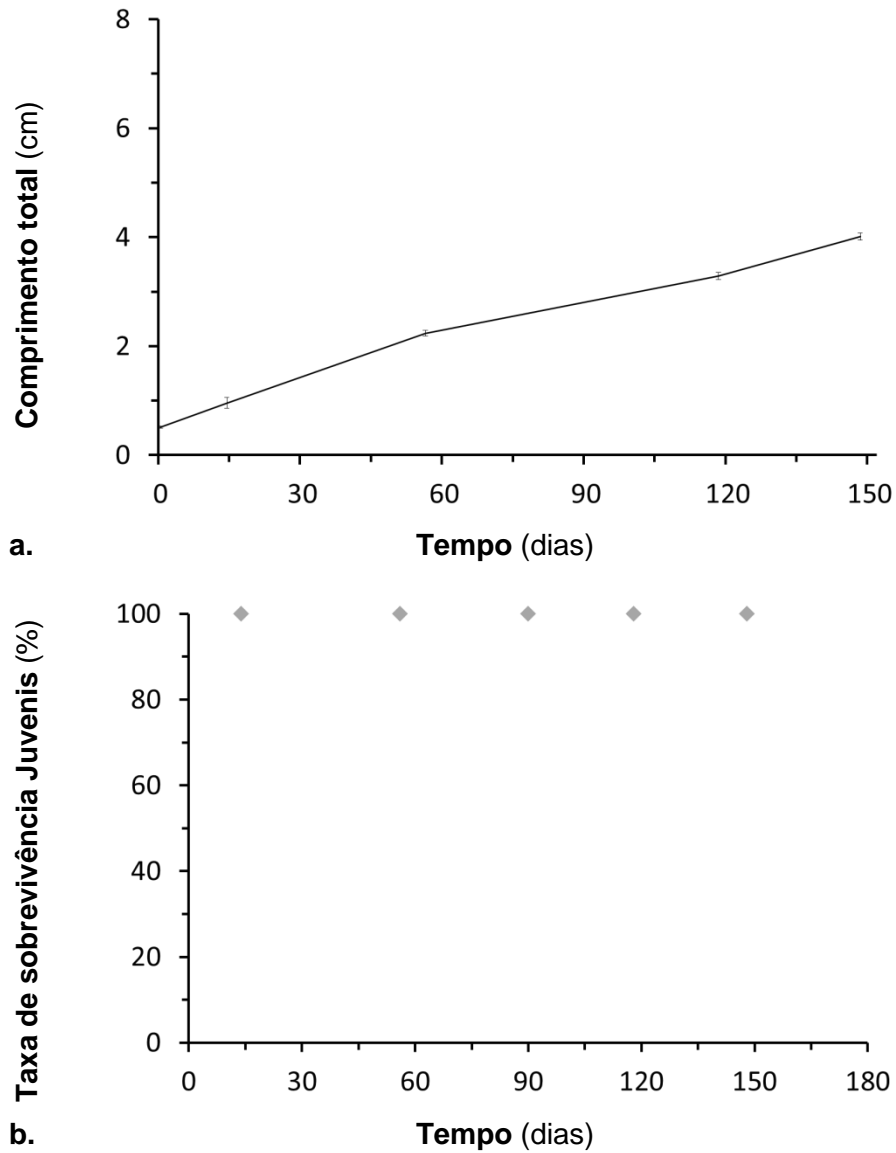


Figura 15: a. crescimento linear individual; e b. taxa de sobrevivência de juvenis *G. rufa*, desde a eclosão até aos 5 meses de idade, monitorizados de uma postura em 2 de Junho de 2015 (N = 32)

4 – Discussão

Os peixes de água doce são um importante recurso natural, mas as diversas atividades antropogénicas têm afetado adversamente os ecossistemas aquáticos, conduzindo muitas espécies a entrarem em vias de extinção (Rowland, 2013). A destruição de habitats é um desses principais mecanismos. Por outro lado, a introdução de novas espécies traduz-se numa diminuição dos mananciais ou erradicação das espécies nativas, devido à competição por alimento, refúgio e habitat (Ricciardi, 2004). Na Europa, nomeadamente na Península Ibérica, a introdução “intencional” de novas espécies de peixes é maioritariamente devida à falta de consciencialização para as consequências ecológicas e, conseqüentemente, económicas dessa prática. Para além de outros motivos, muitas espécies têm sido introduzidas em rios, lagos e albufeiras com vista à Pesca Desportiva. Outras têm surgido, porque as pessoas libertam os animais que cresceram demais para manter em aquários em sua casa, ou porque representam muitas despesas em alimentação e manutenção para um simples passatempo de Aquarioria (Duggan et al, 2006).

A procura de espécies para Aquarioria poderá conduzir à exaustão de certas espécies, que ainda são capturadas nos ecossistemas naturais, por sobre-exploração dos seus mananciais. Desta forma, a Aquacultura apresenta-se como uma alternativa viável à captura de organismos selvagens (Tlusty, 2002). A maioria de produção em Aquacultura é referente a peixes de água doce (Tlusty, 2002). E, ainda assim, também esta poderá ser responsável pela acidental introdução de peixes e outros organismos, tais como plantas e moluscos, em ecossistemas onde eles não são oriundos (Duggan, 2010).

Os peixes de água doce estão ameaçados de extinção à escala mundial, (Duncan e Lockwood, 2001). Desde 1900, a distribuição e abundância de peixes de água doce, nativos no interior e nas zonas costeiras da Austrália, têm sofrido uma redução acentuada (Rowland, 2013). Em Portugal, 67% dos ciprinídeos já são considerados espécies “Ameaçadas” de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN; Cabral et al. 2005). Por esse motivo, começou a haver uma preocupação em desenvolver programas de recuperação dos mananciais das diferentes espécies, nos ecossistemas em que são naturais, através da produção em cativeiro (Sundarabarathy et al 2005; Rowland, 2013; Sousa-Santos et al. 2013).

Assim, tem-se investido no melhoramento das práticas de produção de larvas e alevins (Rowland, 2013), de modo a assegurar o êxito básico e inicial da reprodução dessas espécies (Bock e Padovani, 2000). Apesar de tudo, o problema de extinção e de apanha excessiva não se resolve na totalidade. A vantagem da reprodução em cativeiro é que pode haver produção de ovos e juvenis fora da época normal de reprodução, o que pode contribuir para reforçar os mananciais selvagens (Woynarovich & Harvath, 1983).

A família Ciprinidae é uma das maiores famílias de vertebrados, sendo também uma das mais procuradas/usadas em aquarioria (Abedi et al, 2011). Compreende mais de 220 géneros e 2420 espécies diferentes (Nelson, 2006). Nas zonas Mediterrâneas, os ciprinídeos são das espécies de peixes mais abundantes (Doadrio et al 2011; Coad 2012) e afectadas devido à introdução de espécies exóticas, degradação de habitats e verões muito secos, que levam à deterioração e falta de água (Collares-Pereira e Cowx, 2004; Sousa-Santos et al. 2013, 2014)..

Atualmente, *Garra rufa* é uma espécie importada para todo o mundo, especialmente para a América do Norte e a Europa, para ser usado na indústria de Spas e para aquários públicos (Scott, 1996). Todos os anos, cerca de 5000 doentes com psoríase (e outras doenças dermatológicas) visitam o *Kangal Fish Health Spa*, na Turquia, onde usam a interação com estes ciprinídeos como método terapêutico (Ozçelik e Akyol, 2011). No entanto, estes números têm vindo a aumentar. Crê-se que o número de pessoas que procuram estes tratamentos na Turquia possam atingir as 60000 anualmente (Garra Rufa Europe 2015). Embora, *Garra rufa* seja uma das espécies nativas, com ampla dispersão, na Eurásia; pouco se sabe acerca da Biologia e Ecologia desta espécie. Mais ainda, o estado dos seus mananciais naturais é completamente desconhecido. No entanto, considerando a importância económica desta espécie e a sua elevada procura nos mercados internacionais, se ainda não se encontrarem ameaçados, poderão sê-lo muito em breve. De tal forma, que a Turquia proibiu completamente a captura, comercialização e exportação destes animais em 1996. *G. rufa* é um importante estandarte do Turismo Termal neste país, que é o principal promotor da Ictioterapia a nível internacional (Sayili et al, 2007). A estância termal de Kangal (Turquia) foi também o berço da ação terapêutica destes peixes e da transferência deste conhecimento para o mundo (Sayili et al, 2007).

Uma das formas de evitar a ameaça de depleção dos mananciais naturais de *G. rufa*, por sobre-exploração desta espécie, é através da sua produção em aquacultura. Para tal, o conhecimento do seu ciclo reprodutivo e dos factores que o influenciam é muito importante (Abedi et al, 2011). Segundo Esmaeili et al (2005), a população de *G. rufa* encontra-se em declínio no Sul do Irão. Sundarabarathy et al

(2005) evocam ainda que se trata uma espécie altamente ameaçada em várias regiões da Eurásia, defendendo que a conservação desta espécie poderá ter de passar pela sua produção em Aquacultura, de maneira a reabilitar os ecossistemas aquáticos de onde são provenientes.

Até ao momento, produção científica relativamente à espécie é bastante reduzida, limitando-se 1) referenciar o desempenho destes peixes no tratamento da psoríase (Grassberger e Hoch, 2006; Sayili et al, 2007; Kazandjieva et al, 2008; Ozçelik e Akyol, 2011), 2) registar algumas infecções por *Aeromonas* (Majtan et al, 2012) e nemátodes (Moravec e Rahemo, 1993); 3) avaliar os efeitos do uso de desinfectantes na água para os peixes (Sirri et al, 2013); 4) determinar a sua dieta natural (Yalçın-Özdilek e Ekmekçi, 2006); 5) fazer a descrição morfológica (Teimori et al, 2011); 6) resumir do que se conhece sobre estes organismos (Jarvis, 2011; Coad, 2012) e 7) algumas publicações relativas a alguns aspectos da dinâmica populacional e da biologia reprodutiva de populações de *G. rufa* na Turquia (Bardakci et al, 2000) e Irão (Esmaeili et al, 2005; Yazdanpanah, 2005; Esmaeili e Ebrahimi, 2006; Karahan & Ergene, 2009; Patimar et al, 2010; Abedi et al, 2011; Gerami et al, 2013). No entanto, estes trabalhos referem-se maioritariamente a estudos de biometria e longevidade ecológica, proporção sexual e do processo de oogénese nas fêmeas. Só mais recentemente, foi publicado um trabalho relativo aos efeitos de um agente indutor de libertação de gâmetas em *G. rufa* e comparação de duas dietas na sobrevivência das larvas mantidas em cativeiro (Vazirzadeh et al, 2014). No entanto, a forma como estes organismos se reproduzem naturalmente, as condições ambientais que os induzem a reproduzir, a descrição e cronologia do seu desenvolvimento embrionário, são parâmetros importantes de conhecer para se avançar com produção deste organismos em aquacultura.

Abedi et al, (2011) observaram que as populações de *G. rufa* do rio Armand (Irão central), apresentam uma proporção sexuada equilibrada de 1:1. O índice gonadosomático e o tamanho dos óvulos aumentava gradualmente até Abril, surgindo fêmeas em estado de pré-desova em Maio. Posteriormente, ambos os parâmetros decresciam até Novembro, refletindo uma longa época de reprodução. Patimar et al, (2013) reforçaram as mesmas conclusões, estudando uma população do rio Kangir (Irão ocidental). Estes autores, afirmaram que a época de desova ocorria entre Abril e Maio. Já Bardakci et al, (2000) compararam a população da estância termal de Kangal com a do rio Topardıç (Turquia) e concluíram que o período de desova ocorreria em Julho. No presente estudo, a sazonalidade de fatores ambientais foi anulada, com a estabilização da temperatura do ar a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Desta forma, foi possível obter as primeiras desovas,

4 meses após a inserção dos reprodutores nos sistemas de suporte de vida. A partir desse momento, houve ocorrência de posturas todos os meses, apesar da diminuição da sua frequência, verificada a partir de Abril de 2015. Assim, pode obter-se indivíduos reprodutores possivelmente durante todo o ano, sem que ainda se tivesse recorrido a outros métodos que induzam artificialmente a libertação de óvulos e espermatozóides, tais como choques térmicos ou fornecimento de substâncias hormonais (Vazirzadeh et al, 2014).

Comparativamente aos outros ciprinídeos, *G. rufa* é uma espécie que possui uma fecundidade relativamente baixa (Abedi et al, 2011). Esta é geralmente relacionada com o tamanho e idade da fêmea, tal como a abundância de alimento e a temperatura da água (Fleming e Gross, 1990; Bardakci et al, 2000). No presente estudo, só se distinguiram machos e fêmeas acima de 4,8 e 5,0 cm, respectivamente. No entanto, só se verificaram óvulos bem distintos e desenvolvidos em fêmeas com comprimento acima dos 5,0 cm. Os óvulos apresentavam tamanhos distintos, entre os 395,14 µm a 863,33 µm de diâmetro. Os valores foram similares aos de Bardakci et al, (2000) – máximo de 700 e 1125 µm, respectivamente em águas quentes termais e de rio com variações sazonais; Abedi et al, (2011) – média de 670 µm e Patimar et al, (2010) – média de 800 µm. As dimensões dos ovos recém-fecundados ($\approx 1,7$ mm) foram também semelhantes aos estudados por aqueles autores. No entanto, não se verificou qualquer relação biométrica entre o número de óvulos e o tamanho da fêmea. Tal dever-se-á à conjugação de dois fatores: 1) aos óvulos e fêmeas não estarem nas melhores condições de preservação, uma vez que resultou da análise de indivíduos encontrados mortos e preservados em formalina e 2) ao reduzido tamanho da amostra utilizada.

No presente estudo, a fecundidade absoluta (número de óvulos presentes na gónada feminina) variou entre os 91 óvulos para uma fêmea com 5,7 mm de comprimento total e 282 óvulos para uma fêmea com 6,5 mm de comprimento total. Estes valores foram bastante inferiores aos registados em outros estudos de populações selvagens de *G. rufa*, na Eurásia. Num estudo de dinâmica populacional no rio Kangir (Irão ocidental), Patimar et al, (2010) observaram um mínimo de 1680 óvulos em fêmeas com 2 anos de idade ($6,8 \pm 1,4$ cm de comprimento total) e 13927 óvulos para fêmeas com 5 anos de idade ($10,0 \pm 1,0$ cm de comprimento total). Yazdanpanah (2005 in Coad, 2012) observou valores de fecundidade bem mais reduzidos entre 184 a 2396 (média de 760) óvulos num sistema de ribeiros em Zanjiran, no Sul do Irão. É de salientar que no presente estudo, as fêmeas podem atingir as dimensões de 7 cm de comprimento total em apenas 9 meses a 26°C, em vez de 2 anos como em Kangir

(Patimar et al, 2010). No presente caso, a energia investida na produção somática para obter valores de crescimento individual mais rápidos poderá ter custos elevados, reduzindo a energia disponível para investir na produção gonadal. E assim sendo, poder-se-á traduzir numa baixa fecundidade absoluta, com as fêmeas a produzirem um número reduzido de óvulos. Por outro lado, a ração comercial fornecida na manutenção de *G. rufa* em cativeiro, continha 18% de gordura bruta. Os peixes criados neste estudo demonstraram sempre condições físicas bastante robustas (autores, dados não publicados). A quantidade de gordura corporal poderá ter condicionado a fecundidade absoluta neste estudo, reduzindo o espaço da cavidade corporal destinada ao desenvolvimento das gónadas. A questão da temperatura da água elevada representa também um problema para algumas das populações selvagens de *G. rufa*. Bardakci et al (2000) observaram uma redução da vitelogénese na população das águas termais de Kangal (Turquia), com menor índice gonadossomático, menos óvulos, presença de vários óvulos em diferentes fases de maturação e a presença de oócitos atrésicos, em comparação a uma população de um rio nas imediações próximas. Estes autores atribuíram as diferenças observadas em consequência do esforço metabólico desenvolvido a 35°C e a escassez de alimento resultante dessas condições ambientais. Por outro lado, Patimar et al (2010) advogam que os peixes de rio apresentam indivíduos mais pequenos do que os das termas, devido ao facto das condições do rio serem mais severas do que nas termas, indutoras de maior *stress* ambiental que abrandam o crescimento dos peixes.

Um outro aspeto relevante relaciona-se com o facto de os óvulos serem encontrados em diferentes estágios de desenvolvimento nas gónadas femininas, nas diferentes populações de *G. rufa*, suporta a teoria de que esta espécie seja um reprodutor assíncrono (Patimar et al, 2010). Ou seja, as fêmeas serão capazes de executar várias posturas consecutivas (tal como se verificou neste estudo), o que facilita a sua produção em aquacultura. De acordo com Davies et al (1986) e Mills (1991), a carpa comum (*Cyprinus carpio*) também é um ciprinídeo assíncrono, exibindo um intervalo de 3-4 meses até os oócitos mais pequenos maturarem nas gónadas femininas. Em cativeiro os *Garra rufa*, tiveram maior frequência de desova em Novembro e depois em Março. Este intervalo de tempo poderá indicar um período de maturação semelhante. Os ovos fecundados, que se observaram neste trabalho, apresentaram diâmetro análogos (1,69 µm) a outros estudados em populações selvagens (Bardakci et al, 2000; Yazdanpanah, 2005; Patimar et al, 2010; Abedi et al, 2011). No entanto, podemos descrevê-los como sendo redondos, com o córion branco

(mas não totalmente opaco), demersais e não adesivos - que ainda não se havia reportado.

Garra rufa são peixes que não prestam cuidado parental aos ovos e juvenis, nem constroem ninhos, espalhando os seus ovos sobre os fundos. A fecundação acontece na coluna de água, quando as fêmeas desovam e os machos libertam os espermatozóides que fecundam os óvulos. Posteriormente, os ovos vão depositar-se entre os vários elementos nos fundos dos sistemas aquáticos (Baensch and Riehl, 2004). No presente trabalho, devido à dificuldade de se distinguir machos e fêmeas, com base em caracteres sexuais secundários morfológicos externos, optou-se por inserir 4 indivíduos num mesmo aquário, na expectativa de conseguir ter peixes de ambos os géneros em cada sistema. Não se conseguiu assistir ao exacto momento de desova e fecundação. No entanto, pôde observar-se que, em cativeiro, os machos fazem persistentes perseguições às fêmeas, até que estas os aceitem. A partir desse momento, passam a executar cortes nupciais que consistem em natação sincronizada, rodopiando em torno um do outro. Por outro lado, também se observou que os machos de maior porte se impõem e afastam os seus concorrentes, perseguindo-os até que estes encontrem um abrigo.

De acordo com Baldisserotto et al (2009) só se poderá considerar uma desova como bem-sucedida quando ocorrerem taxas de fecundação na ordem dos 70%. Das 31 posturas obtidas, apenas 7 foram consideradas bem-sucedidas.

A predação dos ovos pelos próprios progenitores foi o principal problema à obtenção e observação de posturas. Mesmo com a imposição das redes de contenção, era frequente os peixes conseguirem penetrar a barreira e banquetear-se no fundo dos aquários. Inclusivamente, houve situações que o número de ovos recolhidos foi inferior ao suposto, devido à presença de um peixe intruso. *G. rufa* revelaram-se como peixes muito enérgicos, irrequietos, curiosos, exploradores e muito inovadores no que respeita à fuga dos sistemas de suporte de vida. Esta característica revela-se como um desafio à produção destes organismos em Aquacultura.

No sistema de isolamento de reprodutores, os peixes *G. rufa*, saltavam para os aquários ao lado e muitas vezes até para fora do sistema, o que provocava a sua morte. Então, verificou-se que os indivíduos desta espécie entram em *stress* quando isolados e espaços reduzidos. Os peixes ficavam imóveis no fundo, encostados ao vidro posterior na presença dos cuidadores, até arranjam posteriormente uma maneira de escapar. Quando foram transferidos para os novos sistemas de reprodução, escondiam-se por detrás do filtro interno, dentro dos abrigos de PVC e entre as redes e a parede do

aquário. Demoraram uma semana a adaptarem-se e a exibirem um comportamento esufiante, na presença dos cuidadores e no horário de alimentação. Durante 2 meses, foi frequente encontrá-los no fundo dos aquários, por baixo das redes, pelo que estas tiveram de ser reforçadas. Só 2 meses depois é que se observou a primeira postura de ovos. Mesmo assim, houve peixes que conseguiram executar fugas ocasionais até debaixo das redes.

Por outro lado, a contaminação por fungos foi a principal causa de degeneração de ovos e morte embrionária. A contaminação fúngica dos sistemas de suporte devida deverá ter sido derivada ou potenciada pela ração fornecida aos peixes. A ração comercial *Dr. Bassler Biofish Food Regular M* (Aquarium Münster, Telgte, Germany) é enriquecida com probióticos, inclusivamente *Saccharomyces cerevisiae*. Os fungos são patogénicos oportunistas e uma vez presentes na superfície do ovo, podem causar a morte destes (Bergh et al, 1991). Os ovos mortos também são um excelente substrato para a propagação de fungos, contaminando os ovos viáveis, causando a sua morte (Rach, 2004). A combinação destes factores poderá ter sido sinérgica, O intervalo de tempo que decorreu entre o momento da desova e a detecção/recolha dos ovos dos sistemas, terá sido determinante no sucesso reprodutivo de *G. rufa* em cativeiro. Quanto maior fosse o tempo decorrido entre os 2 momentos, maior seria a probabilidade de contaminação dos ovos. Assim, os mais degradados poderão ter sido considerados como ovos não fecundados e a maioria dos restantes acabaria por degenerar, devido à ação dos fungos. Houve 12 posturas completamente inviáveis, em consequência deste tipo de infeção. A maioria ocorreu em posturas ocorridas durante a noite. Quando as posturas ocorreram de manhã ou à tarde, o tempo para a contaminação era mais reduzido, devido ao intervalo de tempo que decorria entre as alimentações e simultânea verificação do sistema. Quanto mais recente era a postura, maiores eram as taxas de fecundação e eclosão. Os únicos fatores de referência da brevidade entre a postura e a sua deteção terão sido: 1) o horário de alimentação e 2) o estágio de desenvolvimento embrionário em que se encontravam os ovos.

A frequência das infeções fúngicas dos ovos despoletou a decisão de recorrer ao uso de azul de metileno. Este é conhecido há muito tempo como um desinfetante eficaz de ovos de peixe em Aquariofilia, protegendo-os contra fungos e bactérias (Bassler, 2009). A desinfeção dos ovos reduz a probabilidade de desenvolvimento de patogénicos, mas requer a utilização de produtos que sejam inócuos para os ovos. O azul de metileno revelou-se como um produto versátil, eficaz e seguro para este fim (Chambel et al, 2014). A qualidade de ovos de reprodutores selvagens tem uma qualidade superior à dos ovos de reprodutores em cativeiro (Brooks et al, 1997).. A

justificação para tal, prende-se com o facto dos reprodutores em cativeiro estarem sujeitos a maiores condições de *stress* ambiental (derivado do seu maneio, densidades populacionais elevadas, reduzido enriquecimento ambiental, etc..) e a uma alimentação menos variada que em meio natural. Estes fatores poderão contribuir para um enfraquecimento do seu sistema imunitário. Igualmente, a qualidade e a quantidade das substâncias do vitelo poderão ser igualmente alteradas em função da dieta fornecida. Por outro lado, a qualidade da água de um sistema de suporte de vida com recirculação de água será sempre diferente da encontrada nos seus ecossistemas naturais (Brooks et al, 1997). Por todos estes motivos, ovos de animais reproduzidos em cativeiro e os seus progenitores são mais propensos a infeções por fungos, bactérias, vírus e outros parasitas, transmissíveis aos próprios ovos (Baldisserotto et al, 2009). Efetivamente, nas posturas em que se usou azul metileno, a taxas de eclosão e de sobrevivência larvar foram superiores do que naquelas posturas em que não se usou o desinfetante, à semelhança do observado para os ovos de peixe zebra *Danio rerio*, escalar *Pterophyllum scalare* e tetra viúva preto *Gymnocorymbus ternetzi* (Chambel et al 2014). Ainda assim, não se pode descartar a ocorrência de alguns fatores desconhecidos que poderão ter influenciado a viabilidade das posturas, nomeadamente a nível genético (Brooks et al, 1997). Apesar de se ter adquirido os peixes em diferentes lotes de produtores distintos, a possibilidade de anomalias genéticas derivada de efeitos de consanguinidade foram uma preocupação. Houve ocorrência de 2 tipos de anomalias: 1) em que os juvenis resultaram com deformações da corda dorsal e da cauda e 2) em que os juvenis são têm uma relação comprimento total / largura do corpo bem mais reduzida que os seus semelhantes. A deformação da cauda poderá ter resultado igualmente da contaminação fúngica, em posturas prévias à utilização de azul de metileno. Esse foi um dos motivos pelo qual se observou mortalidade larvar, em que as larvas apresentavam tufo de fungos na cauda, depois de eclodir.

No desenvolvimento embrionário de *Garra rufa*, não foi possível observar a desova e as primeiras fases de desenvolvimento. Devido ao facto do ovo ter o córion transparente, permitiu observar e registar o desenvolvimento do embrião a partir da fase de blástula. Os ovos eclodiram maioritariamente entre as 24 e as 36h, embora alguns embriões tenham demorado até ao máximo de 48 horas. Estes animais apresentaram um desenvolvimento embrionário, comparável ao tetra cardinal *Paracheirodon axelrodi* (Anjos e Anjos 2006) e mais rápido que outras espécies similares: 48h para o peixe-zebra *Danio rerio* (Kimmel et al, 1995); peixe dourado *Carassius auratus* (Hsin-Yuan et al 2013); 76h em *Cyprinus carpio* (Bădiliță et al, 2010), a temperaturas semelhantes

Vazirzadeh et al (2014) alimentou juvenis de *G. rufa* com náuplios de *Artémia* sp., a uma temperatura de 30°C, e verificou uma taxa de sobrevivência maior do que com fitoplâncton e infusões. *Artémia* sp. têm um valor altamente nutricional (Lavens & Sorgeloos, 1996). No presente estudo, as larvas eram capazes de ingerir alimento ao final de 48h após a eclosão, em que lhe foi fornecida a mesma ração que os progenitores, apenas moída para ter uma menor granulometria. A sobrevivência larvar foi próxima dos 100%, duplicando de tamanho quinzenalmente de início e aproximadamente 1 cm mês⁻¹, ao final de 1 mês de idade. Em apenas 3 meses atingiram o comprimento total de 3 cm, a partir do qual já podem ser comercializados. Comercialização. Aproximadamente aos 6 meses de idade atingem o tamanho de 5,5 cm de comprimento total, a partir do qual podem apresentar as gónadas maduras. Neste estudo, os peixes permaneceram com aproximadamente 7 cm nos sistemas de suporte de vida comunitários, estagnando o seu crescimento. Tal pode ter sido devido à limitação ambiental de alguns recursos (nomeadamente espaço). Mas os reprodutores cresceram até aos 10 cm nos aquários de 20 l. Este valor é semelhante ao observado por Patimar et al (2010), corresponde à longevidade ecológica de 5 anos no rio Kangir (Irão ocidental). É também concordante com os de Bardakci et al (2000) em Kangal (Turquia) e Abedi et al (2011) no rio Armand (centro do Irão). Rahemo (1995) estudou uma população do rio Tigre (Iraque), em que os indivíduos maiores apresentavam até 24 cm de comprimento total e uma longevidade de 7 anos. Indivíduos criados em cativeiro podem alcançar uma maior longevidade, entre 6 a 7 anos (FishSpa Solutions, 2010).

Ao longo de todas as tarefas executadas ao longo deste estudo, *G. rufa* demonstrou ser uma espécie bastante resiliente a condições esporadicamente desfavoráveis. No entanto houve 2 fatores aos quais se demonstrou menos adaptado: diminuição de oxigénio dissolvido na água e diminuição da temperatura da mesma, nomeadamente durante o seu transporte (autor, dados não publicados). Por este último motivo, esta espécie representará um baixo risco de se tornar uma espécie exótica invasora dos ecossistemas dulçaquícolas, em Portugal. No entanto, essa ameaça carece de comprovação científica, inclusivamente envolvendo experimentação da capacidade adaptativa desta espécie.

Este estudo permitiu observar e registar as diferentes fases embrionárias de *G. rufa* e estudar um pouco do seu potencial de produção em aquacultura. Determinou-se algumas das estratégias e condições ambientais necessárias para obter reprodução destes peixes. Após a desova, *G. rufa* pode eclodir entre 24 a 36h, quando criados em cativeiro a uma temperatura de 28 ± 1.1°C. Em 3 meses pode ser comercializado e em

Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel 1843), com vista à sua produção em Aquacultura

6 meses pode ser um potencial reprodutor. Este rápido desenvolvimento, aliado à elevada procura de mercado, torna *G. rufa* numa espécie muito atractiva para apostar na sua produção em Aquacultura e promoção para fins terapêuticos em Saúde e Bem-estar humanos, tal como em Aquariofilia.

5 - Perspectivas Futuras

Numa perspectiva futura, o desenho experimental do sistema de reprodução de *G. rufa* deverá ser melhorado: 1) de modo a haver mais controlo nas desovas. Poderá ser experimentada a aplicação de choques térmicos, simulação de correntes ou de precipitação, que estimulam a maioria dos peixes tropicais a desovar. A injeção de substâncias hormonais poderá ser também uma solução. 2) Os aquários utilizados devem ser espelhados por dentro, para que não haja interação de peixes com os seus cuidadores ou perturbação pela execução das rotinas diárias de Aquacultura. 3) Evitar a contaminação de fungos, usando: outro tipo de rações sem leveduras, procedendo mais vezes à limpeza do fundo, mas de modo a não stressar os reprodutores. 4) Melhorar o acondicionamento dos ovos até à eclosão. 5) Melhorar o desenho das redes, de forma a evitar o contacto com o fundo dos aquários, mas diminuir o stress dos reprodutores e evitando que se magoem. 6) Avaliar até que ponto *G. rufa* poderá representar perigo de se tornar uma espécie invasora nos sistemas dulçaquícolas Europeus.

Referências bibliográficas

- Abdoli, A. (2000). The inland water fishes of Iran. – Museum of Nature and Wild life of Iran, Tehran. 377 pp.
- Abedi M. , Shiva A. H. , Mohammadi. H. e Malekpour R. (2011). Reproductive biology and age determination of *Garra rufa* (Heckel, 1843 (Actinopterygii: Cyprinidae) in central Iran. *Turkich Journal of Zoology*; 35(3): 317-323
- Da Aquariofilia à Aquariologia. A evolução da técnica. Aquário Vasco da Gama (2015). acessado em Novembro 2014. http://aquariovgama.marinha.pt/PT/aquariologia/Pages/aquariofolia_aquariologia.aspx
- Anjos H.e Anjos C. (2006). Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do Cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em *Laboratorio. Brasil. Instituto pesca, São Paulo*, 32(2): 151-160
- Bădiliță M., Ardelean, A., Bănătean-Dunea, I., Brudiu I., Rada O., Petcu M.e Cazacu, M. (2010). Study on Embryo development in Carp (*Cyprinus carpio*) depending on water with dieferent hardness degrees. *Research Journal of Agricultural Science*, 42 (2).
- Baensch, H.A., e Riehl, R. (2004). *Baensch Aquarium Atlas, Volume 3. Melle: Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde, Germany.* 1104 p.
- Baldisserotto B., Silva L. e Fernandes M. (2009). Incubação e desenvolvimento de peixes aplicados à piscicultura: necessidades e cuidados. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo, Tavares-Dias, M. (organizador). Embrapa amapa: 64-88*
- Bardakci, F., Ozansoy, Ü. e Koptagel, E. (2000). A comparison of oogenesis under constant and fluctuating temperatures in Doctor Fish, *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae). *The World Wide Web Journal of Biology Vol. 5: 3*
- Bock ,C. L. e Padovani, C. R. (2000) Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. *Acta Scientiarum* 22 (2). 495-501.
- Brown C.L. e Cato J. C., *Marine Ornamental Species*, 1º edition, USA, Iowa State Press, 2003
- Brooks S., Tyler C. R. e Sumpter J. P., (1997) Egg quality in fish: What makes a good egg?. *Fish Biology and Fisheries* 7: 387-416.
- Bromage N. e Roberts R. (2001). *Broodstock management and egg and larval quality*, 3th edition, Blackwell Science Ltd.

- Bergh, O, Hansen, G.H., Jelmert, A., Skiftesvik, A.B. e Taxt, R.E., (1991). Bacterial diseases of eggs and yolk sac larvae of halibut: *Hippoglossus hippoglossus* L): Characterization and experimental infection. International council for the exploration of the sea 38.
- Biswas, S.P., Nasar, S.A.K. e Chatterjee, K. (1984). Inter and intraspecific comparisons of some aspects of the reproductive biology of the two carps, *Labeo pangusia* and *Labeo dero*. Archives of Biology (Bruxelles) 95: 11-27.
- Chambel, J., Costa, R., **Gomes, M.**, Mendes S., Baptista, T. e Pedrosa, R. (2014). Hydrogen peroxide, iodine solution and methylene solution highly enhance the hatching rate of freshwater ornamental fish species. Aquaculture international 22: 1743-1751.
- Coad B. W. (1995) Freshwater fishes of Iran. Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae 29: 1-164.
- Collares-Pereira, M.J. e Cowx, I. (2004). The role of catchment scale environmental management in freshwater fish conservation. Fisheries Management and Ecology 11:303–312
- Cunha, I. e Planas, M. (1998). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. Instituto de Investigaciones Marinas (C.S.I.C.), 36208 Vigo, Spain, Aquaculture 177: 171-190.
- Davies, P.R., Hanyu, I., Furukawa, K. e Nomura, M. (1986). Effect of temperature and photoperiod on sexual maturation and spawning of the common carp. II. Induction of spawning by manipulating photoperiod and temperature. Aquaculture 52:137-144.
- De Silva, K.H.G.M. (1991). Population dynamics and production of the rocky stream-dwelling fish *Garra ceylonensis* (Cyprinidae) in Sri Lanka. Journal of Tropical Ecology 7: 289-303.
- Dawes, J. (1998). International experience in ornamental marine species management. Part 1: perspectives. International Journal of Ornamental Fishes 26, February 1999. <http://www.ornamental-fish-int.org/marinespecies1.htm>. Acedido a 4 de Novembro de 2015.
- Directiva 2006/44/EC do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de Setembro de 2006, relativa à qualidade das águas doces que necessitam de ser protegidas ou melhoradas a fim de estarem aptas para a vida dos peixes. Jornal Oficial da União Europeia L264: 20-31.
- Doadrio, I., Perea, S., Garzón-Heydt, P. e González, J.L., (2011) Ictiofauna Continental Española. Bases para su seguimiento. Dirección General Medio Natural y Política Forestal, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.
- Duggan, I. C. (2010). The freshwater aquarium trade as a vector for incidental invertebrate fauna. Biological Invasions 12: 3757-3770.

- Duggan, I. C., Maclsaac, H. J. e Rixon, C. A. M. (2006). Popularity and propagule pressure: determinants of introduction and establishment of aquarium fish. *Biological Invasions* 8: 377-382.
- Duncan, J.R. e Lockwood, J.L. (2001). Extinction in a field of bullets: a search for causes in the decline of the world's freshwater fishes. *Biological Conservation* 102:97-105
- Ergene Gözükar, S.e Çavaş, T. (2004). A karyological analysis of *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Pisces, Cyprinidae) from the Eastern Mediterranean river basin in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and. Animal Sciences impact*. 28: 497-500.
- Esmaeili, H.; Yazdanpanah, M., Monsefi, M. (2005). Reproductive biology of doctor fish, *Garra rufa* (Cyprinidae: Garrinae), in southwest of Iran. *Journal of Fish Biology* 67: 282-282.
- Esmaeili, H. R. e Ebrahimi, M.(2006). Length-weight relationships of some freshwater fishes of Iran. *Journal Application Ichthyology* 22: 328-329.
- Ferreira L. (2014). Identificação e desenvolvimento larvar de peixes tropicais do Indo Pacífico no Oceanário de Lisboa. Tese de mestrado em Ciências do mar e recursos marinhos. Especialidade em Aquacultura e Pescas. Universidade de Porto. 87p
- Fish base (2015) *Garra rufa* (Heckel, 1843). Acedido em 15 de Maio de 2015, em <http://www.fishbase.org/summary/Garra-rufa.html>.
- The benefits of a garra rufa pedicure. FishSpa Solutions 2010. Acedido em Novembro de 2015. <http://www.fishspasolutions.com>.
- Fleming, I.A. e Gross, M.R. (1990). Latitudinal clines: a trade-off between egg number and size in Pacific salmon. *Ecology* 71: 1
- Ictioterapia. Benefícios da Ictioterapia. *Garra Rufa Europe* (2015). Acedido em Novembro 2015. <http://garrarufaexperience.com.pt/ictioterapia.html>
- Grassberger, M. e Hoch, W. (2006). Ichthyotherapy as alternative treatment for patients with psoriasis: A Pilot Study. *Advance Access Publication* 4. 483-488.
- Hoole, D., Bucke, D., Burgess, P. e Wellby I. (2001). Diseases of carps and other cyprinids fishes. 1st edition , Sparks Computer Solutions Ltd Oxford. 172-174 pp.7
- HPA - Health Protection Agency Fish Spa Working Group of the United Kingdom (2011). Guidance on the management of the public health risks from fish pedicures: draft for consultation. http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317131045549. Acedido em Junho 2015.
- Hsin-Yuan Tsai, Mariann Chang, Shih-Chieh Liu, Gembu Abe e Kinya G Ota . Embryonic development of goldfish (*Carassius auratus*): A model for the study of

evolutionary change in developmental mechanisms by artificial selection
Development Dynamics. 2013 Nov; 242(1): 1262–1283. Published online 2013
Sep 6. doi: 10.1002/dvdy.24022 -
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232884/>

- Jarvis P.L., (2011). Biological Synopsis of *Garra rufa*. Canadian Manuscript Report . Fisheries and Aquatic Sciences 2946: vi14p
- Jonsson, N. e Jonsson, B. (1999). Trade-off between egg mass and egg number in brown trout. *Journal of Fish Biology* 55: 767-783.
- Kara, C. e Alp, A. (2005). Distribution And Morphometric Characteristics Of *Garra Rufa Heckel*, (1843) In Ceyhan River System [In Turkish with English Abstract] *Turkey Aquatic Life Magazine (National Water Days Special Issue)*, National Water Days Symposium 2005, 28-30 September 2005, Trabzon Karadeniz Technical University, Turkey.
- Kazandjieva, J., Grozdev I., Darlenski R., Tsankov N. (2008). Climatotherapy of psoriasis. *Clinics in dermatology* 26: 477-485.
- Keppler R (2009). What-Why-Ow? Biotope aquarium water. JBL GmbH & Co.KG, Neuhofen/Pfalz (Germany)
- Kjorsvik, E., Mangorjensen, A. e Holmefjord, I. (1990). Egg quality in fishes. *Advances In Marine Biology* 26, 71±113.
- Kjorsvik, E. (1994) Egg quality in wild and broodstock cod *Gadus morhua* L. *Journal of the World Aquaculture Society* 25: 22- 31
- Krupp, F. e Schneider, W. (1989). The fishes of the Jordan River drainage basin and Azraq Oasis. *Fauna of Saudi Arabia*. vol 10, pp347-416
- Landau, M. (1992). *Introduction to Aquaculture*. Wiley, New York, 440 pp.
- Lavens, P. e Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome.
- Majtan J., Cerny J., Ofukana A., Takac P. e Kozanek M. (2012). Mortality of therapeutic fish *Garra rufa* caused by *Aeromonas sobria*. *Asian pacific journal of tropical biomedicine* 2. 85-87.
- Mayr E (1990). A natural system of organisms. *Nature* 348, 491.
- Mills, C.A. (1991). Reproduction and life history. In: *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology and Exploitation* (eds. I.J. Winfield and J.S.Nelson), London, Chapman and Hall, 483-509.
- Moravec, F. e Rahemo, Z. I. F. (1993). Pericardium of *Garra rufa* (Pisces: Cyprinidae) as the site infection of *Cucullanus* Larvae (Nematoda). *Folia Parasitologica* 40: 145-146.
- Mourão, C. (2012). Aquariorfilia como vector de introdução de peixes dulçaquícolas: Características das lojas e das espécies na avaliação do

potencial de invasão. Tese de Mestrado em Pescas e Aquacultura. Universidade de Lisboa (Portugal). 62p

- Nelson, J.S., (2006). *Fishes of the World*. John Wiley, Sons, New York.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L. e Carnevali, O. (2006). Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture* 255: 480-487.
- Ozoçelik S. e Akyol M. (2011). Kangal hot spring with fish (Kangal Fishy health spa) & psoriasis treatment. *Press Term Climate* 148. 141-147.
- Patimar R. , Chalanchi M. G. , Chamanara V., Naderi L. (2010). Some life history aspects of *Garra rufa* (Heckel, 1843) in the Kangir River, Western Iran, *Zoology in the Middle East*, 51:57-66.
- Rach, J.J., Valentine, J.J., Schreier, T.M., Gaikowski, M.P. e Crawford, T.G. (2004). Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs. *Aquaculture* 238:135-142.
- Reis M. e Cerqueira V. (2003). Indução de desova de Robalo-peva *Centripomus parallelus*, Poey 1860, com diferentes doses de LHRHa. *Acta Scientiarum animal Sciences* 25: 53-59.
- Ricciardi, A. (2004). Assessing species invasions as a cause of extinction. *Trends in Ecology and Evolution* 19.
- Roff, D. A. (1982): Reproductive strategies in flatfish: a first synthesis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 39: 1686-1698.
- Rowland S.J. (2013). Hatchery production for conservation and stock enhancement: the case of Australian freshwater fish. *Advances in Aquaculture hatchery Technology*: 557-595.
- Santos, D. (2012). Disrupção endócrina em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), análises de expressão génica e do desenvolvimento embrionário. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as ciências da saúde. Universidade de Trás-os- Montes e Alto Douro.
- Sayili, M., Akca H., Duman, T. e Esengun, K. (2007). Psoriasis treatment via doctor fishes as part of health tourism: A case study of Kangal Fish Spring, Turkey. *Tourism management* 28. 325-329.
- Scott, P.W. (1996). *The complete aquarium*, London, Dorling Kindersley Limited.
- Sirri, R., Zaccaroni, A., Biase, A., Modenti, O., Stancampiano, L., Sarli, G. e Mandrioli, L. (2013). Effects of two water disinfectants (chloramine T and peracetic acid) on the epidermis and gills of *Garra rufa* used in human ichthyotherapy. *Polish Journal of veterinary sciences* 16: 453-461.

- Smith, B.B. e Walker, K.F. (2004). Spawning dynamics of common carp in the river Murray, South Australia, shown by macroscopic and histological staging of gonads. *Journal of Fish Biology* 64: 336-354.
- Sousa-Santos, C; Robalo, JI; Francisco, SM; Carrapato, C; Cardoso, AC. e Doadrio, I (2014). Metapopulations in temporary streams - the role of drought-flood cycles in promoting high genetic diversity in a critically endangered freshwater fish and its consequences for the future. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 80: 281–296
- Sousa-Santos, C.; Gil, F.e Almada, V. (2014) Ex-situ reproduction of Portuguese endangered cyprinids in the context of their conservation. *Ichthyological Research*. 61 (2) 193–198 DOI 10.1007/s10228-013-0383-6
- Sundarabarathy, T.V.; Edirisinghe, U. e Dematawewa, C.M.B. (2005) Breeding and larval rearing of threatened, endemic fish stoniesucker, *Garra ceylonensis* (Bleeker). *Aquaculture Research* 36: 196-201.
- Tesch, F.W. (1968) Age and growth. In: *Methods for Assessment of Fish Production in Freshwater*, IBP Handbook
- Thorpe, J.E., Miles, M.S. e Keay, D.S. (1984). Developmental rate, fecundity and egg size in Atlantic salmon. *Aquaculture* 43: 289-305.
- Tlustý M. (2002). The benefits and risks of Aquaculture production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205: 203-219.
- Vazirzadeh A., Zahedinejad S.e Bahri A. (2014). Spawning induction in doctor fish, *Garra rufa* (Heckel, 1843) by Ovaprim and captive rearing of larvae. *Iran Journal of Ichthyology* 4. 258-265.
- Warga, R. M. e Kimmel, C. B. (1990). Cell movements during epoboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108 (4): 569-580.
- Westerfield, M. (2007) *The Zebrafish Book*, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press. Paperback. (4th Edition available online): http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html acessado a 25 de Novembro de 2014.
- Winfield, I.J. e Nelson, J.S. (1991) *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology and Exploitation*. Chapman and Hall, London.
- Wildgoose W. H. (1996). *BSAVA Manual of ornamental Fish*, 2^o edition, England, British Small Animal Veterinary Association.
- Whittington, R.J. e Chong, R. (2007). Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine* 81: 92-116.
- Woynarovich, E. e Harvath L. (1983) *The artificial propagation of worm- water fishes – A manual of extension*. FAO Fisheries Technical Paper (201). 183 p.

Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel 1843), com vista à sua produção em Aquacultura

- Yalçin-Özdilek, S., e Ekmekçi, F.G. (2006). Preliminary data on the diet of *Garra rufa* (Cyprinidae) in the Asi basin (Orontes), Turkey. *Cybium* 30: 177-186.
- Yanong V.M.D. e Roy P.E. (1996) Reproductive management of freshwater ornamental fish. *Seminars in avian and exotic pet medicine*. Vol 5, Nº 4: 222-235.
- Yazdanpanah, M. (2005). Reproductive biology of *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Cypriniformes, Cyprinidae) in a spring-stream system, Zanjiran, Fars province. Thesis (M.Sc.) Shiraz University, Shiraz, Iran. xiii + 136p.

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

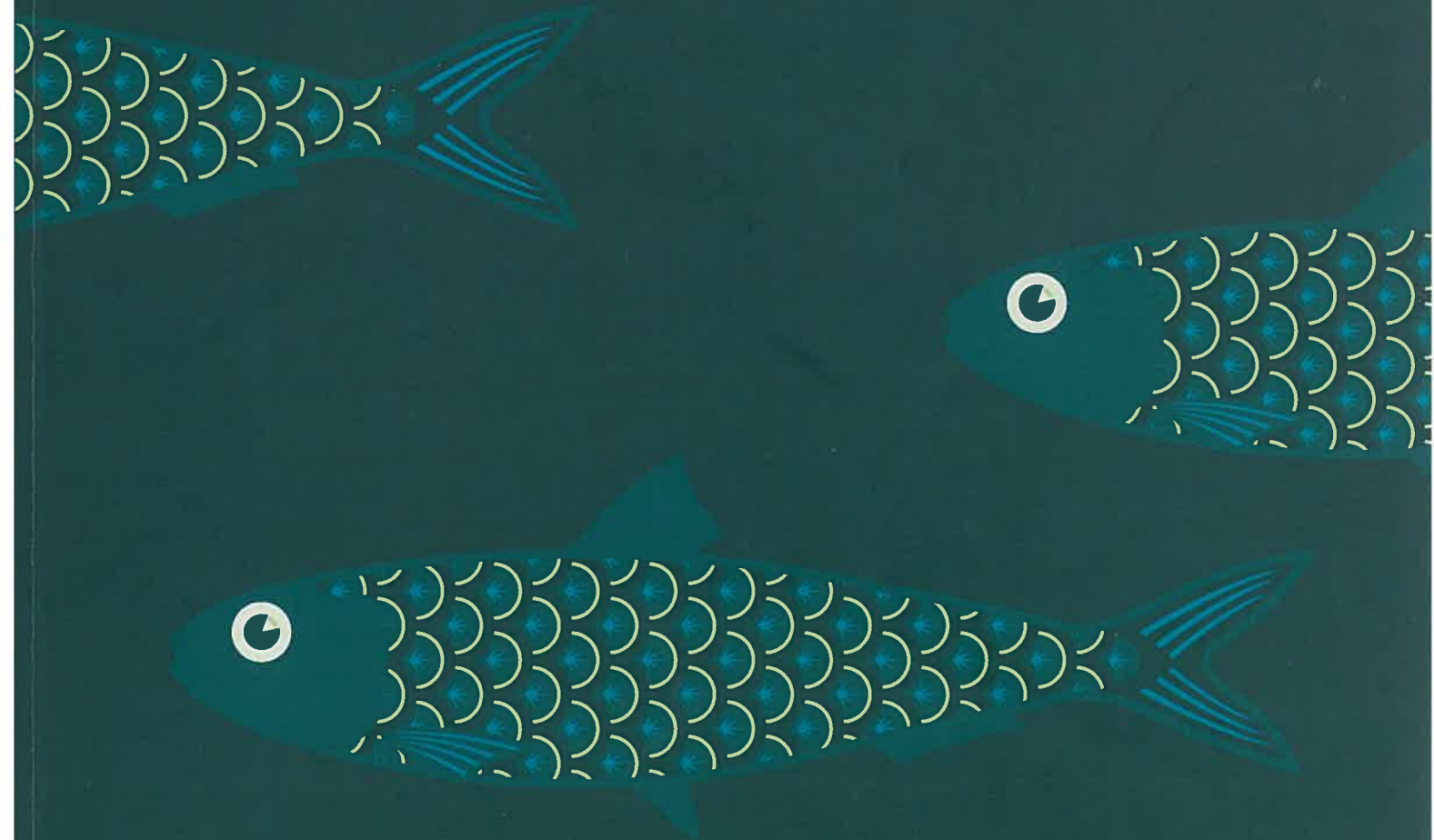


© 2007 - 2015 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved

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 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.

