

***Determinação da dose ideal de alimento para a peixes
Garra rufa (Heckel, 1843) em ictioterapia***

Ana Filipa Marques da Silva Ruas

Setembro de 2019

***Determinação da dose ideal de alimento para peixes
Garra rufa (Heckel, 1843) em ictioterapia***

Ana Filipa Marques da Silva Ruas

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Sílvia Gonçalves e coorientação da
Doutora Susana Ferreira

Setembro de 2019

***Determinação da dose ideal de alimento para peixes
Garra rufa (Heckel, 1843) em ictioterapia***

Ana Filipa Marques da Silva Ruas

Direitos de autor © Ana Filipa Ruas

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Instituto Politécnico de Leiria

2019

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm direito, perpetuamente e sem fronteiras geográficas, a arquivar e publicar este trabalho, através de cópias impressas em papel, ou em forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou ainda por ser inventado, e para disseminá-lo através de repositórios científicos e permitir a cópia e distribuição para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e ao editor.

Setembro de 2019

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram para a concretização deste trabalho, desde colegas que me substituíram nas minhas ausências, até aos voluntários que fizeram parte integral deste trabalho.

Quero agradecer às minhas coordenadoras, Professora Doutora Sílvia Gonçalves e Professora Doutora Susana Ferreira, por toda a ajuda, apoio, disponibilidade, paciência e compreensão. Sem as professoras, nada disto teria sido possível. Muitas vezes, achei que não ia conseguir terminar este trabalho, mas graças ao apoio das duas, aqui estamos. Para além do vasto conhecimento de ambas, quero salientar o lado humano de cada uma, que sempre prevaleceu nas alturas que mais precisei. Muito obrigado de coração!

Para a Marly, David, Dona Paula e Sr. António que me ajudaram e foram meus amigos. Muito obrigado por tudo!

Para o Ricardo e Marcela que são amigos para a vida! Agradeço tudo o que fizeram por mim. Espero um dia poder retribuir. Obrigado!

A ti minha Fofoca (Inês Ferreira), és a minha irmã de outra vida! Obrigado por toda a ajuda, ao longo de toda a minha tese de mestrado, preocupação e amor incondicional. Se não fosses tu, nem sei.... Que a nossa amizade dure a vida toda. 7 anos já lá vão, agora só falta o resto.

Denis, o que posso dizer? Obrigado por sempre me apoiares em tudo. Sei que posso contar contigo sempre! És especial loirinho...sabes bem.

A toda a minha família que colaborou para a pessoa que sou hoje. Sem vocês nada disto seria possível.

Aos meus avós que são os meus segundos pais. Muito obrigado, Sali e Luís, por me darem força e por serem um grande exemplo de seres humanos. Graças a vocês sou uma pessoa melhor. Amo-vos muito!

À minha tia Cláudia, Thomas e Toby que sabem sempre o que dizer para que os problemas não pareçam tão grandes. A vossa leveza faz-me tão bem. Obrigado! Tia sempre andei atrás de ti para todo o lado. Obrigado por nunca me fazeres sentir como se eu estivesse a mais. Temos uma ligação muito especial e muitas vezes é a isso que me agarro quando estou triste. Amo-vos muito!

Aos meus irmãos, vocês são a minha vida, os três!

Dani és a minha companheira de vida, crescemos juntas e por isso temos algo muito especial entre nós. Não precisamos de falar todos os dias, mas sabemos bem que se precisarmos estamos lá uma para a outra. Sempre foste o meu exemplo! Sei que me apoias em tudo e por isso... Obrigado. Amo-te muito!

Docas, meu bebé grande! És o meu orgulho! Obrigado por seres a pessoa maravilhosa que és. Sei já estás crescido, mas vais ser sempre o meu menino lindo que já sabe muitas coisas de gente grande. Sei que estamos juntos para o que der e vier. Sabes que podes sempre contar comigo meu Docas. Amo-te muito!

Minha Nónocas, tu sim, ainda és a minha “bebécas”! Quero agradecer-te por perdoares a minha ausência em muitas fases da tua vida. E mesmo assim quando me vês é uma festa imensa. Agradeço por não te esqueceres de mim, mesmo quando não estou aí fisicamente. Sei que ainda não consegues compreender a minha ausência, mas quero que saibas que mesmo longe estás sempre no meu pensamento e que tens em mim sempre um lugar seguro, na minha vida e claro, no meu coração. A mana ama-te muito.

Mãe.... Minha “mommy” és uma inspiração na minha vida, sem ti nada seria possível, obrigado por me ensinares tudo o que sei, e por seres a pessoa mais responsável por quem eu sou hoje e pelos meus valores. És uma guerreira! Contigo aprendi a nunca desistir e muitas vezes ao longo deste trabalho quando a tristeza apertou era em ti que eu me agarrava. Sei que estou crescida, mas o colo de mãe é eterno! Amo-te tanto que nem cabe no meu peito! Espero que te orgulhes de mim, não só agora, mas sempre!

Finalmente Pai... Já cá não estás, nem tão pouco pudeste acompanhar este processo, mas acredito que onde quer que estejas estás a olhar por mim e a torcer aí de cima que tudo corra bem. Obrigado por todas as boas lembranças que me fazem tão feliz em alturas difíceis. Amo-te muito minha estrela!

Abstract

Ichthyotherapy can be defined as a treatment for dermatological diseases (such as psoriasis) through the use of fish, namely *Garra rufa* (Heckel, 1843). To promote the interaction between fish and human being, these animals are frequently deprived of food in order to encourage their innate feeding behaviour of removing epithelial cells from the surface layer of vertebrate's skin. However, this may endanger animal welfare and health. Therefore, this work aimed to define the ideal amount of food for a specific size class of *Garra rufa*, in order to suppress their physiological needs, without losing their interest in foraging dead skin cells throughout an ichthyotherapy treatment.

First the *ad libitum* dose was determined for a size class of $\approx 5.62 \pm 0.05$ cm; 1.30 ± 0.04 g. After obtaining this data, the fish were subjected to an experimental trial to simulate a treatment of ichthyotherapy to try to understand which daily food dose (25%, 50%, 75% or 100% of the daily *ad libitum* dose) should be provided to the fish to maintain their interest in interaction with humans and remove keratinized squamous cells from the epidermis. To achieve this purpose, a hygiene protocol was established for human participants before they came into contact with fish in an ichthyotherapy treatment.

The daily *ad libitum* dose corresponded to $0.27 \text{ Kcal fish}^{-1}$ and 5% of the body mass of fish with $\approx 5.62 \pm 0.05$ cm / 1.30 ± 0.04 g. During the trial, only 3 fish died, since they tried to evade from the life support systems. The fish fed with the lowest doses of feed, interacted more with the human participants in the ichthyotherapy sessions, while those fed with the higher dose presented a more restful behaviour. Diet 1 (25% of the *ad libitum* daily dose) had good results in terms of growth and zootechnical parameters (total length, body mass, absolute and specific growth rates, daily growth rates and body condition), comparable to those in control conditions (in which the fish received the daily dose *ad libitum* and were not subjected to ichthyotherapy sessions). Nevertheless, for long periods of time, this diet is nutritionally impoverished (the epithelial cells of the horny layer of the skin mostly contain keratin), and could have consequences for fish health. Due to the fact that *G. rufa* fish have been shown to be quite resilient to environmental changes (namely in exchanges between life support systems and ichthyotherapy systems) as well as their ability to learn, it is recommended to provide a dose between 0.14 and $0.21 \text{ Kcal fish}^{-1}$, corresponding to 50% and 75% of the daily *ad libitum* dose. Although not the best performing doses in terms of zootechnical parameters, this can be a way of finding a compromise between

the interest of *G. rufa* fish to interact with humans, and to provide health and welfare to these animals in the long-term.

Keywords: doses, *ad libitum*, animal welfare, hygiene protocol;

Resumo

A Ictioterapia é um tratamento de doenças, do foro dermatológico (como a psoríase), onde se utilizam os peixes da espécie *Garra rufa* (Heckel, 1843). Para promover a interação com os seres humanos, aqueles animais são frequentemente sujeitos a privação de alimento, de forma a incentivar o seu comportamento inato de se alimentar através da remoção de células epiteliais da camada superficial da pele dos vertebrados. Este procedimento poderá colocar em causa o bem-estar e a saúde animal. Como tal, o presente trabalho teve por finalidade definir a quantidade ideal de alimento para uma classe específica de tamanho de peixes *Garra rufa*, que suprima as suas necessidades fisiológicas, sem que estes percam o interesse pelo consumo de células epiteliais e interação com seres humanos, ao longo de um tratamento de Ictioterapia.

Primeiramente foi-se determinar a dose *ad libitum* para uma classe de tamanho de $\approx 5,62 \pm 0,05$ cm; $1,30 \pm 0,04$ g. Após a obtenção desta informação, submeteram-se os peixes a um ensaio experimental visando simular um tratamento de ictioterapia, para tentar perceber qual a dose de alimento (25%, 50%, 75 % ou 100% da dose diária *ad libitum*) se deverá fornecer diariamente para que os animais mantenham o interesse pela interação com seres humanos e remover-lhes as células escamosas queratinizadas da epiderme. Para tal, estabeleceu-se um protocolo de higienização para os participantes humanos, antes destes entrarem em contacto com os peixes num tratamento de ictioterapia.

A dose diária *ad libitum* correspondeu a $0,27$ Kcal peixe⁻¹ e 5% da massa corporal de peixes com $\approx 5,62 \pm 0,05$ cm / $1,30 \pm 0,04$ g. Durante o ensaio, apenas morreram 3 peixes, mas só porque tentaram a evasão dos sistemas de suporte de vida. Os peixes alimentados com menores doses de ração foram os que mais interagiram com os participantes nas sessões de ictioterapia, ao passo que os das doses maiores foram os mais reservados. A dieta 1 (25% da dose diária *ad libitum*) obteve bons resultados em termos de crescimento e parâmetros zootécnicos (comprimento total, massa corporal, taxas de crescimento absoluto e específico, índices de crescimento diário e condição corporal), comparáveis aos da situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam a dose diária *ad libitum* e não foram sujeitos a sessões de ictioterapia). No entanto, se a prática for continuada por muito tempo, a dieta é empobrecida em termos nutricionais (as células epiteliais da camada córnea da pele, contém maioritariamente queratina) provavelmente acarretará consequências para a saúde dos peixes. Graças ao facto de os peixes *G. rufa* terem revelado ser organismos bastante resilientes a mudanças ambientais (nomeadamente nas trocas

entre os sistemas de suporte de vida e os sistemas de ictioterapia), bem como à sua capacidade de aprendizagem, recomenda-se fornecer uma dose de alimento entre as 0,14 e 0,21 Kcal peixe⁻¹, correspondentes a 50% e 75% da dose diária *ad libitum*. Apesar de não terem sido as doses com melhor desempenho em termos de parâmetros zootécnicos, será uma forma de encontrar um compromisso entre o interesse dos peixes *G. rufa*, para interagirem com os seres humanos, e providenciar saúde e bem-estar a estes animais, a longo prazo.

Palavras-Chave: dose, *ad libitum*, bem-estar animal, protocolo de higienização.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Aquacultura Ornamental	1
1.2. A importância da alimentação em peixes	2
1.3. Alimentação de espécies ornamentais.....	3
1.4. Biologia do peixe <i>Garra rufa</i> (Heckel, 1843).....	4
1.5. Hábitos alimentares de <i>Garra rufa</i> (Heckel, 1843).....	6
1.6. Ictioterapia	6
1.6.1. Preocupações associadas à Ictioterapia.....	7
1.7. Objetivos	8
2. Materiais e métodos.....	11
2.1. Proveniência dos animais.....	11
2.2. Determinação da dose diária de ração a fornecer a <i>Garra rufa</i> com diferentes tamanhos.....	11
2.2.1. Aclimação.....	11
2.2.2. Desenho experimental	11
2.3. Determinação da dose diária de ração a fornecer a <i>Garra rufa</i> para fins Ictioterapêuticos.....	12
2.3.1. Aclimação.....	12
2.3.2. Desenho Experimental.....	13
2.3.3. Procedimentos para iniciar as sessões de Ictioterapia.....	13
2.3.4. Sessões de Ictioterapia.....	14
2.4. Parâmetros zootécnicos e morfométricos.....	14
2.5. Análise de dados	15
3. Resultados.....	19
3.1. Parâmetros de qualidade da água.....	19
3.2. Determinação da dose diária de ração	19
3.3. Determinação da dose diária de ração a fornecer a <i>Garra rufa</i> (Heckel, 1843) em regimes de ictioterapia	20
3.3.1. Sobrevivência	20
3.3.2. Dimensões corporais e crescimento.....	21
3.3.3. Parâmetros zootécnicos	23
3.3.4. Incursões	25

3.3.5. Inquéritos.....	26
4. Discussão	31
5. Conclusão.....	39
6. Referências bibliográficas.....	41

Índice de figuras

Fig. 1 Fisionomia de um peixe da espécie *Garra rufa*. (copyright: Brian W. Coad, Canadian Museum of Natural History; Coad 2010).

Fig. 2 Determinação da dose *ad libitum* ao longo de 3 dias, para peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), através da quantificação de aquários em que sobrava alimento no dia seguinte. As doses de ração fornecidas, corresponderam desde 2 a 7% da massa corporal dos peixes. Utilizaram-se três rações distintas: RO (Ração Omnifeed), RS (Ração Sparos Aquatica Discus) e RB (Ração Dr. Bassleer Biofish Food).

Fig. 3 Sobrevivência de peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), submetidos a sessões de ictioterapia, com diferentes doses de alimento (dose 1 = 25%, dose 2 = 50%; dose 3 = 75% e dose 4 = 100% da dose diária *ad libitum*) e na situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam sempre a totalidade da dose diária *ad libitum* e permaneceram sempre no sistema de suporte de vida).

Fig. 4 Comprimento total e biomassa individual (média \pm erro padrão) de *Garra rufa* (Heckel, 1843), no início (a & b, respetivamente) e no final (c & e, respetivamente) da atividade experimental, bem como o seu incremento (d & f, respetivamente), Os tratamentos referem-se a peixes submetidos a sessões de ictioterapia com diferentes doses de alimento (dose 1 = 25%, dose 2= 50%; dose 3 = 75% e dose 4 = 100% da dose diária *ad libitum*) e à situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam sempre a totalidade da dose diária *ad libitum* e permaneceram sempre no sistema de suporte de vida). Os asteriscos (*) , indicam os tratamentos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Fig. 5 Variação das taxas de crescimento absoluto (AGR; a) e específico (SGR; b), bem como para os índices de crescimento diário (DGI; c) e de condição corporal (d; K) de peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), submetidos a sessões de ictioterapia com diferentes doses de alimento (dose 1 = 25%, dose 2= 50%; dose 3 = 75% e dose 4 = 100% da dose diária *ad libitum*) e à situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam sempre a totalidade da dose diária *ad libitum* e permaneceram sempre no sistema de suporte de vida). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Os asteriscos (*), indicam os tratamentos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Fig. 6 Número de incursões, por peixe *Garra rufa* (Heckel, 1843), às mãos das pessoas voluntárias, durante os 30 minutos de cada sessão diária de ictioterapia, tendo em conta as diferentes doses de rações que lhes foram administradas, durante as três semanas do ensaio experimental.

Fig. 7 Frequência relativa das respostas aos inquéritos feitos a todos os participantes que se voluntariaram para a realização das sessões de ictioterapia com *Garra rufa* (Heckel, 1843), relativamente às informações sobre a idade, sexo, profissão, tipo de pele e melhoria da pele das mãos, após 30 minutos de sessão, relativamente a todos os participantes e apenas aos que quiseram repetir a experiência.

Fig. 8 Frequência relativa de: a) indivíduos de um determinado sexo relativamente ao seu tipo de pele; b) o sexo dos participantes e c) a sensação de melhoria do estado da pele, relativamente à frequência das incursões exploratórias dos peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843) às mãos dos participantes, durante as sessões de ictioterapia.

Índice de Tabelas

Tabela I: Variação dos parâmetros de avaliação da qualidade da água (média \pm desvio padrão) no sistema de suporte de vida dos peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), no decorrer do período do ensaio experimental: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, amônia, nitritos, nitratos e fosfatos;

1. Introdução

1.1. Aquacultura Ornamental

O crescente interesse na aquariorfilia tem impulsionado a indústria ornamental, tendo esta sido avaliada em 2007 em cerca de 15 biliões de dólares (Wittington & Chong, 2007). As espécies ornamentais definem-se por terem a capacidade de serem mantidas em ambientes artificiais com o único propósito de entretenimento (Cunha, 2006), apresentando uma série de características singulares que fazem com que se tornem mais apelativas para os apreciadores.

Os peixes ornamentais são considerados como sendo os animais de estimação mais populares a nível mundial. Nos Estados Unidos, uma em cada oito pessoas têm um peixe como animal de estimação, no Canadá 1.2 milhões de pessoas têm um aquário. Dados franceses indicam que cerca de 34 milhões de peixes são mantidos por 2.1 milhões de casas, enquanto que na Alemanha, aproximadamente, 3.7 milhões de casas têm um peixe (Rana, 2002).

Segundo Leal *et al.* (2016), todos os anos, são comercializadas aproximadamente 30 milhões de peixes ornamentais marinhos pertencentes a cerca de 1800 espécies diferentes, mas apenas 72 dessas espécies são produzidas em cativeiro, sendo todas as outras capturadas o meio natural. Porém, trata-se de um número pouco significativo, quando comparado com as espécies de água doce, das quais mais de 90% são produzidas em cativeiro (Green, 2003; Pomeroy *et al.*, 2006).

De acordo com as estimativas existentes, gastam-se anualmente cerca de 350 milhões de dólares em peixes ornamentais e/ou em aquários, estimando-se ainda que os gastos em materiais associados à atividade, nomeadamente em aquários, plantas, acessórios, medicamentos, alimentação etc., sejam superiores (Kumar *et al.*, 2015; Madhu *et al.*, 2016). As vendas de peixes de estimação incluem 65% das receitas geradas pelos animais de companhia, com um preço individual por peixe que varia entre 1 e 20 dólares americanos (Noga, 2010).

A nível global, o setor ornamental encontra-se em crescimento, constituindo uma parcela significativa no comércio internacional das pescas e da aquacultura. Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) demonstram que o valor do comércio internacional na exportação de peixes ornamentais está a aumentar e tem estado a crescer 14% todos os anos, desde 1985. O relatório afirma ainda que as exportações internacionais destes animais apresentam um valor aproximado de 200 milhões de dólares, enquanto o valor total de comércio varia de, aproximadamente, 1 e 3 biliões de dólares (FAO, 2011). Um

relatório semelhante (FAO, 2011) revelou que em 1998 o valor de importação de peixes ornamentais foi avaliado em 257 milhões de dólares. No entanto, quando acumulando outros fatores como salários, vendas em *retail* e materiais associados à manutenção destes animais, a indústria atinge um valor aproximado de 15 bilhões de dólares (FAO, 2011).

A produção de peixes ornamentais é importante, não só devido à sua significância recreacional e ao seu valor económico no mercado internacional, mas também porque é capaz de proporcionar oportunidades no campo da empregabilidade tanto para homens como mulheres em comunidades rurais, costeiras e urbanas, e claro nas oportunidades de criação de capital para as mesmas. Esta atividade é capaz assim de motivar o desenvolvimento em algumas destas comunidades. A maioria dos peixes ornamentais cultivados são de água doce. As espécies marinhas são na sua maioria capturadas na Natureza, no entanto devido à falta de sustentabilidade nesta prática, as oportunidades são cada vez maiores para a aquacultura.

1.2. A importância da alimentação em peixes

Para um peixe a dieta deve ser capaz de fornecer todos os nutrientes e energia essenciais que suprimam todas as necessidades fisiológicas de um animal em crescimento. As diretrizes existentes no que concerne aos requisitos nutricionais para algumas espécies de peixes cultivados sugerem as necessidades mínimas dos mesmos de modo a promover o crescimento e prevenir sinais de malformações nos animais (NRC, 2011).

A digestibilidade de uma determinada dieta é a proporção de nutrientes, que nela contém, que são digeridos e absorvidos pelo peixe. Dados sobre a digestibilidade e energia digestível disponível nos ingredientes alimentares na dieta dos peixes são essenciais para a otimização da formulação de rações, nomeadamente em aquacultura (NRC, 2011).

Sendo o cultivo um procedimento que provoca stress aos animais, a sua saúde é do ponto de vista ético, e de produção, de extrema importância para os produtores. A nutrição adequada tem um papel muito relevante mantendo o crescimento normal e saúde dos organismos aquáticos. Pode ainda minimizar os efeitos de stress, diminuir a suscetibilidade a doenças e fortalecer o sistema imunitário. Desta forma é muito importante considerar uma dieta adequada, que previna situações de *stress* e doenças, ainda que esta possa ser utilizada como um método primário de administração de medicamentos, imuno-estimulantes e de ingredientes funcionais para o peixe (Alhazzaa *et al.* 2013).

Com o aumento contínuo da aquacultura é importante que se foque e acentue o bem-estar dos animais, uma vez que este fator tem um papel determinante na resposta ao *stress*, na saúde e na resistência a doenças, resultando num desenvolvimento sustentável da própria indústria (Ashley, 2007).

As dietas, juntamente com outros fatores, estão diretamente relacionados com o nível de *stress*, tolerância e saúde que o animal poderá apresentar, e por isso, para um crescimento adequado, resistência ao *stress* e a doenças, é fundamental que estes animais sejam alimentados com quantidades de dieta que sejam capazes de prover todas a suas necessidades nutricionais (Trichet, 2010).

1.3. Alimentação de espécies ornamentais

O desenvolvimento industrial da cultura de peixes ornamentais de água doce, tem sido dificultado, devido à falta de alimento vivo sustentável que consiga alimentar todas as fases de produção. Para que se garanta a viabilidade de um produto, este deve ter a qualidade assegurada e o menor custo possível, a fim de se obter um rendimento favorável, já que este depende diretamente da quantidade e qualidade do alimento administrado (Orvay, 1993). Uma alimentação variada, é altamente aconselhável, para suprimir todas as necessidades nutricionais destes animais. Em aquacultura, nomeadamente na área da nutrição, existem muitas dificuldades em perceber quais as necessidades nutricionais das espécies que se encontram em sistemas de produção, este facto dá-se devido à diversidade de regimes alimentares (Catarino, 2015).

Os peixes, no geral, necessitam de entre 25 a 55% de proteína bruta (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). No entanto estas necessidades dependem de fatores como o tamanho dos animais e a fase de vida, sendo que as larvas e juvenis precisam de quantidades proteicas mais elevadas do que os peixes adultos, pois têm um crescimento mais acelerado em períodos de tempo mais curtos (Elangovan & Shim, 1997).

Os lípidos são uma fonte de ácidos gordos e energia, que levam ao bom crescimento e sobrevivência dos peixes, sendo o segundo componente mais importante numa ração. São facilmente digeridos pelos peixes, ocupando assim um lugar preferencial em relação aos hidratos de carbono como fonte de energia (Mohanta & Subramanian, 2011).

Logo após as proteínas, os hidratos de carbono, juntamente com os lípidos, são os principais constituintes de uma dieta de peixes ornamentais (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011; FAO, 2015). Nos peixes omnívoros de água quente como os *Garra rufa*, utilizam-se muito os hidratos de

carbono, sendo este um constituinte fundamental para reduzir o catabolismo e para a síntese de glicose que promove a diminuição de retenção de proteínas e o aumento da libertação de azoto para o ambiente (Catarino, 2015). Este componente também tem a capacidade de servir como precursor de intermediários metabólicos cruciais ao crescimento, aminoácidos indispensáveis e ácidos nucleicos (Mohanta & Subramanian, 2011).

No que diz respeito à dieta dos peixes, os minerais são o componente menos dispendioso e o seu conteúdo é bastante reduzido, uma vez que os peixes são capazes de absorver minerais pelas brânquias ou através do epitélio intestinal, havendo assim pouca informação publicada relativamente a este constituinte (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Os minerais essenciais para a constituição de uma dieta são cálcio, fósforo, cobre, iodo, ferro, magnésio, zinco, selénio e manganês. Relativamente às vitaminas, normalmente utilizam-se suplementos vitamínicos, que variam consoante a espécie, tamanho, fatores ambientais, inter-relações de nutrientes ou até mesmo com o estado de saúde do peixe. As vitaminas utilizadas com mais frequência são a E e a C devido às suas capacidades antioxidantes e por serem capazes de reduzir a resposta do peixe ao *stress* (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). As fibras aparecem em quase todos os ingredientes de uma ração, no entanto são um componente de difícil digestão para os peixes. Desta forma sugere-se que esta quantidade seja reduzida a menos de 10% dos constituintes totais (Halver & Hardy, 2002).

Quando se formula a ração é preciso ter em consideração se esta terá efeitos na qualidade da água, pois se esta não estiver em condições favoráveis para os animais pode levar ao surgimento de doenças e até, eventualmente, à sua morte. A ração pode ser assim um fator determinante para o sucesso de um sistema de recirculação. A água não deve conter qualquer tipo de toxinas e deve apresentar boa oxigenação e temperatura adequada, devendo ser limpa com alguma frequência. A alimentação excessiva também tem de ser levada em consideração pois os restos de alimento vão levar à diminuição da qualidade da água (Lewbart, 1998; Halver & Hardy, 2002; Trbovic' *et al.*, 2013; FAO, 2015).

1.4. Biologia do peixe *Garra rufa* (Heckel, 1843)

Os peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), também conhecidos por Peixe Médico (Özcelik & Akyol 2011), são oriundos do Médio Oriente, e definem-se por serem peixes bentopelágicos de água doce (Özcelik *et al.* 2000; Grassberger & Hoch, 2006). Estes animais são o membro mais pequeno da família

Cyprinidae, e são um dos 73 membros do género *Garra* (Esmaeili *et al.* 2009; Coad, 2010).

Segundo Coad (2010) estes animais apresentam uma cabeça sem escamas, dois pares de barbilhos, um lateral e outro superior à boca. Na boca posicionada na parte inferior possuem um disco adesivo bem desenvolvido, que permite ao peixe alimentar-se e manter-se estável em alturas de corrente forte (figura 1). O seu corpo fusiforme exibe uma estrutura cilíndrica fina e comprida ligeiramente arredondada transversalmente ao longo da linha lateral que se estende até à cauda (Kara & Alp 2005; Coad 2010). A distribuição geográfica natural da espécie *G. rufa* insere-se subtropicalmente, sendo nativa de diversos tipos de habitats ao longo da Europa e da Ásia (Froese & Pauly 2010). Nestes habitats incluem-se rios, bacias, e drenagens costeiras do Este do Mediterrâneo e do Sul do Irão (Coad, 2010). São comumente encontrados em países como a Turquia, Síria, Iraque, Irão, Jordânia e Arábia Saudita (Fishbase, 2014). Normalmente escondem-se por entre a vegetação e as pedras (Coad, 2014). A profundidade máxima observada para esta espécie varia entre os 30 e os 50 cm, o pH entre 7 e 9, o oxigénio dissolvido varia entre 2,9 e 14,8 mg.l⁻¹ e apresentam um intervalo ideal de temperaturas entre os 15 e os 28°C (no entanto, aguentam temperaturas extremas pois existem registos de 5,8 a 37°C) (Yalçin-Özdilek & Ekmekçi, 2006; Okur & Yalçin-Özdilek, 2008; Ozcelik & Akyol 2011). Estes animais já mostraram persistir em ambientes contaminados por metais pesados (Gümgüm *et al.*, 1994).

O peixe *G. rufa* é uma das espécies mais comuns na sua distribuição (Okur & Yalçin-Özdilek 2008) e não se encontra sob qualquer tipo de ameaça (Coad, 2014). Está, no entanto, apontado como sendo localmente vulnerável na Turquia devido a um decréscimo regional significativo resultante da intervenção humana (Fricke *et al.*, 2007).

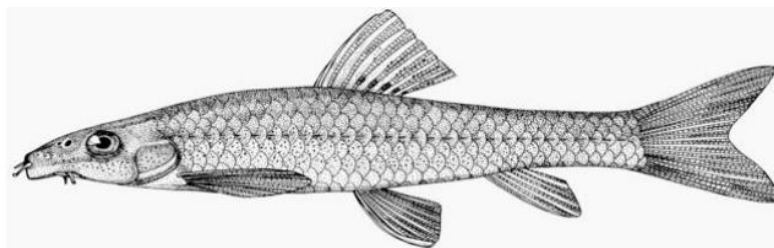


Figura 1: O peixe *Garra rufa* (adaptado Coad 2010).

1.5. Hábitos alimentares de *Garra rufa* (Heckel, 1843)

Tratando-se de uma espécie omnívora, as preferências alimentares de *G. rufa* incluem algas (*Actinastrum sp.*, *Chaetophora sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Coelastrum sp.*, *Anacystis sp.*, *Chroococcus sp.*, *Dactylococcopsis sp.*, *Merismopedia sp.*), fitoplâncton, nomeadamente diatomáceas (*Achnanthes sp.*, *Amphora sp.*, *Cocconeis sp.*), zooplâncton e detritos. Porém, este peixe tem uma particularidade, já que o seu instinto natural faz com que se alimente, de forma complementar, com peles mortas de vertebrados (Sayili *et al.*, 2007; Jarvis, 2011). De acordo com Jarvis (2011), estes animais podem também alimentar-se de cianobactérias, rotíferos e protozoários. 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.

Graças a esta característica tão distinta, estes animais são muito utilizados como medicina alternativa e para tratamentos de pele em institutos de beleza. Deste modo, existe um interesse crescente na sua produção em cultivo, sendo especialmente relevante o conhecimento aprofundado das condições ambientais necessárias para a sua manutenção em aquacultura e a sua reprodução em laboratório, juntamente com a formulação de dietas adequadas, económicas, facilmente acessíveis e que consigam promover um crescimento rápido e saudável para o desenvolvimento destes peixes (Gomes, 2015).

1.6. Ictioterapia

A Ictioterapia é um tratamento de doenças, do foro dermatológico (como a psoríase), onde se utilizam os peixes da espécie *Garra rufa* (Grassberger & Hoch, 2006). Este nome deriva da palavra grega para peixe (“Ichthys”).

A história deste tratamento é muito pouco documentada pela medicina tradicional. No entanto, num museu perto do Rio Kwai (Tailândia), demonstrando as privações da prisão, está exposto um desenho de um prisioneiro que mostra um homem no rio com água até à cintura, com pequenos peixes em volta das suas úlceras nas pernas. Sabe-se também que nas zonas mais rurais da Índia, é comum o uso deste tratamento de forma natural.

Oficialmente, este tipo de tratamento foi mencionado pela primeira vez numa revista científica denominada por “The Lancet” em 1989 (Warric *et al.* 1989). No entanto, os detalhes do tratamento foram publicados mais recentemente por Özcelik *et al.* no ano 2000.

Na Turquia a Ictioterapia está muito disseminada, havendo um vasto número de spas que a praticam. Um dos mais importantes spas deste tipo da Turquia é o Spa de tratamento de Kangal, localizado no distrito de Sivas. Há registos de que remota ao

ano de 1333, sendo desde então um ponto de tratamento de artrite e doenças de pele (Uçer *et al.*, 2006). Segundo as lendas locais, após se ter percebido das propriedades de tratamento da pele em pessoas e animais neste local, este passou a ser um centro de tratamento de doenças relacionadas com a pele (Özçelik *et al.*, 2011).

A primeira publicação científica relativa a este Spa surgiu em 1983 (Timur *et al.*, 1983).

Nos últimos anos, muitas notícias e artigos, acerca deste tratamento, têm sido lançados para a comunicação social devido à sua peculiaridade e curiosidade por parte das pessoas. Muitos Spas têm sido inaugurados em todo o Mundo oferecendo maioritariamente tratamento para os pés para a remoção de calosidades (Grassberger, 2006. “Fish Foot Therapy” passou a ser utilizada em spas recreacionais, centros comerciais, lojas e até em salões de chá no Japão, Coreia do Sul, Singapura, e mais tarde começou a espalhar-se ao longo do Sudeste Asiático e em todo o Mundo (Grassberger, 2013). Em 2008 esta tendência começou a aparecer nos Estados Unidos, com inúmeros spas a abrirem em vários estados. Devido à falta de regulação do tratamento propriamente dito, das espécies de peixe utilizadas e da ausência de precauções ao nível da higiene para os clientes, não demorou muito até que os primeiros comentários negativos chegassem à comunicação social. As autoridades competentes começaram a reparar que muitos destes centros não reuniam as condições de higiene necessárias e que este poderia tornar-se um perigo de saúde pública. Consequentemente, muitos destes centros foram fechados com a preocupação da transmissão de doenças, relativa ao uso dos mesmos peixes entre clientes.

Publicações acerca de estudos efetuados em clínicas piloto (Özcelik *et al.* 2000; Grassberger & Hoch, 2006) e muitos outros artigos (fora do foro científico) indicam que a Ictioterapia é um tratamento promissor para a psoríase e que merece mais estudo.

1.6.1. Preocupações associadas à Ictioterapia

A maior preocupação com esta atividade é o risco de infeções. Na ictioterapia, em particular, existem três métodos de transmissão patogénica: dos peixes para as pessoas, da água para as pessoas e de pessoa para pessoa (Grassberger *et al.*, 2013). Com base na opinião geral dos médicos, determinados grupos de pacientes têm maior propensão no risco de infeções, quando submetidos a tratamentos por Ictioterapia. Se o paciente apresentar uma condição subjacente com poucos

mecanismos de defesa ou lesões na pele expostas o risco de infecção aumenta substancialmente (Gressberger *et al.*, 2013).

No entanto os riscos de contrair infecção podem ser minimizados, utilizando peixes saudáveis adquiridos em instalações controladas com elevados padrões impostos na criação e bem-estar dos animais (Verner-Jeffreys *et al.*, 2012).

A higiene neste tipo de tratamentos é também uma preocupação para a redução de transmissão de doenças. Normas de higiene detalhadas para o tratamento de doenças com ictioterapia ainda não foram estabelecidas (HPA, 2011). No entanto, a variedade e abundância de centros de tratamento trouxeram à tona uma série de problemas regulamentares que é essencial discutir sobre os possíveis riscos para a saúde dos pacientes e providenciar exigências mínimas de higiene no uso desta terapia (Gressberger *et al.*, 2013).

1.7. Objetivos

Os centros de que utilizam os peixes *Garra rufa* para tratamentos de ictioterapia apenas precisam que os animais, assim que o paciente entra na área de tratamento, demonstrem interesse pelas células epiteliais queratinizadas humanas. Deste modo, e dado que os trabalhadores destes centros frequentemente desconhecem os hábitos e necessidades alimentares deste peixe no seu meio natural, não existe por parte destes uma preocupação em alimentar os animais de forma correta, uma vez que as células epiteliais de vertebrados representam apenas uma parte da alimentação natural desta espécie. Do ponto de vista do bem-estar animal, é necessário que se perceba qual a quantidade de alimento que se deve administrar a estes animais para que estes desempenhem um bom trabalho nas células epiteliais e que, simultaneamente, consiga responder a todas as suas necessidades fisiológicas. Posto isto, a finalidade deste estudo foi definir a quantidade ideal de alimento para uma classe específica de tamanho de peixes *Garra rufa*, que suprima as suas necessidades fisiológicas, sem que estes percam o interesse pelo consumo de células epiteliais e interação com seres humanos, ao longo de um tratamento de Ictioterapia.

Para tal, estabeleceu-se um protocolo de higienização para os participantes humanos, antes destes entrarem em contacto com os peixes num tratamento de ictioterapia. A higienização é uma das principais preocupações associadas a este tipo de tratamento, pelo que um protocolo poderá evitar a transmissão de doenças, tanto para as pessoas como para os animais.

Primeiramente foi-se determinar a dose *ad libitum* para uma classe de tamanho de $\approx 5,62 \pm 0,05$ cm; $1,30 \pm 0,04$ g. Após a obtenção desta informação, submeteram-se os

peixes a um ensaio experimental visando simular um tratamento de ictioterapia, para tentar perceber qual a dose de alimento (25%, 50%, 75 % ou 100% da dose diária *ad libitum*) se deverá fornecer diariamente para que os animais mantenham o interesse pela interação com seres humanos e remover-lhes as células escamosas queratinizadas da epiderme. Assim sendo, avaliou-se a sobrevivência, o crescimento (comprimento total, massa corporal) dos peixes *G. rufa*, bem como os respectivos parâmetros zootécnicos (taxas de crescimento absoluto e específico, índices de crescimento diário e condição corporal), comparativamente à frequência de incursões exploratórias às mãos dos participantes nas sessões de ictioterapia. Estes participantes foram também inquiridos quanto à sua idade, sexo, ocupação profissional, tipo de pele e melhoria após sessão para tentar encontrar um fator que determine a preferência de *G. rufa* para interagir com seres humanos.

2. Materiais e métodos

2.1. Proveniência dos animais

Os espécimes de *Garra rufa* utilizados no presente estudo, eram oriundos do manancial mantido no biotério de peixes do CETEMARES.

2.2. Determinação da dose diária de ração a fornecer a *Garra rufa* com diferentes tamanhos

2.2.1. Aclimação

Ao longo de toda a atividade experimental os animais foram mantidos em três sistemas de recirculação de água doce. Cada um era composto por 12 aquários de vidro. Cada sistema era composto por uma estante de PVC, que continha três prateleiras, sendo que, cada uma delas tinha capacidade para 4 aquários. Cada uma das prateleiras era iluminada por uma lâmpada LED de 11W. Os aquários apresentavam uma forma retangular e uma capacidade de 18 L. A água era direcionada para uma *sump* de 90 L, com: um filtro biológico, constituído por biobolas; um filtro mecânico, composto por lã de vidro; e um filtro ultravioleta EHEIM reeflexUV 350 de 14 W (EHEIM GmbH & Co KG, Estugarda, Alemanha) a água era bombeada com uma bomba SICCE Syncra Silent 1.5 (700 –1350 L h⁻¹; SICCE S.r.l., Pozzoleone, Itália); 1 bomba de circulação EHEIM Compact+ 5000 (2500 –5000 L h⁻¹; EHEIM GmbH & Co KG, Estugarda, Alemanha). Para manter a temperatura utilizou-se um aquecedor EHEIM JÄGGER de 300 W (EHEIM GmbH & Co KG, Estugarda, Alemanha), regulado para 28°C. O período de aclimação decorreu ao longo de 2 semanas.

2.2.2. Desenho experimental

Para esta atividade experimental foram utilizados um total de 180 peixes, 5 em cada aquário, num total de 36 aquários.

No dia anterior ao início da experiência os peixes foram pesados e medidos com a finalidade de obter uma classe de comprimento (comprimento médio inicial 5,62 ± 0,05 cm; peso médio inicial 1,30 ± 0,04 g). Para isso os animais eram retirados dos aquários, medidos com o auxílio de um ictiómetro e pesados com uma balança analítica Sartorius TE124S (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha), sendo posteriormente devolvidos ao aquário correspondente.

A experiência decorreu ao longo de 9 dias, durante os quais, os peixes eram alimentados 1 vez por dia com 3 rações distintas. Duas rações comerciais Dr. Bassleer Biofish Food Regular M (Münster, Telgte, Germany) com um conteúdo

energético de 4230 Kcal kg⁻¹ e a Aquatica Discus (Sparus Lda, Olhão, Portugal) que contém um conteúdo energético de 3607 Kcal Kg⁻¹. E uma ração formulada especificamente para esta espécie no trabalho de Catarino (2015), que tinha um conteúdo energético de 4354 Kcal kg⁻¹. Ao longo de nove dias as três rações eram administradas, cada uma delas a cada três dias. Ou seja, nos primeiros três dias administrava-se uma, nos seguintes três outra e nos últimos três a última.

Os animais foram mantidos a uma temperatura de 27°C. As mudanças de água, ao longo desta experiência, eram feitas a cada 3 dias e sempre que se mudava a ração. Os parâmetros físico-químicos, ao longo da experiência, foram medidos sempre que se fazia mudanças de água utilizando um fotómetro HANNA HI 83203, que media amónia, nitritos e nitratos. Para medir o oxigénio dissolvido, pH, temperatura, salinidade, etc., utilizou-se uma sonda multiparamétrica (YSI Pro Plus). Todos estes parâmetros eram mantidos dentro de valores controlados e sempre que estes valores saíam dos valores pretendidos procedia-se à sifonagem dos aquários ou, em casos mais graves, a mudanças totais de água.

Como referido anteriormente, cada ração distinta era administrada ao longo de 3 dias. Cada uma das 3 rações administradas foi dividida em 6 doses diferentes, 2%,3%,4%,5%, 6% e 7% do peso corporal dos animais. A dose inicial diária foi baseada através de um resultado de um estudo anterior, para peixes ornamentais e era cerca de 3,2% do peso corporal do animal (Catarino, 2019). No entanto, neste estudo, decidiu-se abranger uma classe de percentagens maior (2 a 7%), para se ter uma melhor perceção dos resultados obtidos para rações distintas. O alimento era dado da forma aleatória pelos aquários e cada uma das doses tinha um total de 6 réplicas, ou seja, a mesma dose era repetida 2 vezes em cada um dos 3 sistemas. Ao final de cada dia, era registado, se teria sobrado ou não alimento e através dessa informação determinou-se a dose diária ideal (dose *ad libitum*) para cada uma das rações.

2.3. Determinação da dose diária de ração a fornecer a *Garra rufa* para fins Ictioterapêuticos

2.3.1. Aclimação

Para avaliar os efeitos da dose de alimento no desempenho de *G. rufa* em ictioterapia, utilizou-se um total de 135 peixes. Sendo que 108 foram submetidos aos tratamentos e os restantes 27 foram utilizados como situação de referência, onde eram alimentados com a dose diária, resultante do ensaio anterior, mas nunca foram submetidos à ictioterapia. Foi utilizado um mesmo sistema descrito anteriormente, no entanto, aqui apenas foram utilizados 2 dos 3.

2.3.2. Desenho Experimental

Antes da ocorrência do ensaio propriamente dito os animais foram pesados e medidos, como descrito na seção 2.2.2. As sessões de ictioterapia ocorreram ao longo de 3 semanas. Os animais eram alimentados 1 vez por dia com a respectiva dose diária de alimento para cada aquário. Após se averiguar a quantidade de alimento diário para a espécie no ensaio anterior, esta foi dividida em 25, 50, 75 e 100% (doses 1, 2, 3 e 4, respectivamente) da dose diária estipulada. Estas doses eram administradas, de forma diária, respectivamente para cada aquário, no entanto, estes estavam dispostos aleatoriamente por isso tinha-se o auxílio de um plano criado para garantir que cada dose era administrada 3 vezes no sistema.

Na situação de referência os animais eram mantidos nas mesmas condições que os outros, mas, no entanto, para além de não serem sujeitos ao tratamento, tinham todos acesso de igual forma à dose completa de ração diária.

Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorizados durante todo o ensaio e mantidos dentro dos limites recomendados para a espécie.

Neste ensaio foram usados apenas 2 sistemas dos descritos anteriormente, em que um deles servia para efeitos de ictioterapia e o outro apenas como situação de referência.

Para as sessões de ictioterapia foi montada uma sala que foi dividida em 3 áreas distintas. A primeira era composta por uma bancada onde se encontravam 3 aquários e 3 cadeiras para os voluntários. Esta área continha ainda 3 tanques onde se reservava água quente (28°C) e devidamente oxigenada para facilitar a mudança de água dos aquários entre sessões.

2.3.3. Procedimentos para iniciar as sessões de Ictioterapia

Foi criada uma área que se destinava à higienização das mãos e unhas dos voluntários antes da sessão e era composta por um lavatório, escovas para unhas, desinfetante, palitos. Estes tinham de seguir um plano de higienização onde seguiam uma série de passos para a melhor desinfecção possível, o protocolo seguiu algumas das recomendações e teve em consideração as questões colocadas no relatório da HPA (2011). Existia ainda uma área que era destinada a fotografar as mãos dos voluntários para que se tivesse uma ideia do estado das mãos antes do tratamento, a fim de avaliar a qualidade do mesmo.

2.3.4. Sessões de Ictioterapia

A cada dia ocorriam, no total, 4 sessões e cada uma delas era composta por 3 tratamentos distintos. Antes de cada sessão (30 minutos) retirava-se os peixes dos respectivos aquários para os recipientes de tratamento para que pudesse existir um tempo de habituação e diminuição do *stress* do transporte. Quando os voluntários chegavam tinham de fazer a higienização das mãos e unhas. Começando por lavar as mãos com o desinfetante, seguidamente escovavam as unhas e por fim retiravam as sujidades existentes no interior das unhas e lavavam novamente as mãos. De seguida era fotografada cada uma das mãos, viradas para cima e para baixo, e finalmente dava-se início ao tratamento.

O tratamento tinha uma duração de 30 minutos e era registado através de observação quantas vezes o peixe mordiscava pessoa. Para ajudar nesta tarefa os voluntários sempre que sentiam um peixe, comunicavam, sendo esta informação imediatamente registada. Acabando o tratamento os voluntários preencheram um inquérito que visava entender se já haviam experienciado um tratamento assim, se tinham gostado, etc. Terminada a sessão os animais eram devolvidos aos aquários respetivos e imediatamente retiravam-se os animais dos 3 aquários seguintes para a sessão subsequente.

2.4. Parâmetros zootécnicos e morfométricos

Terminado o ensaio, após todas as pesagens e medições, calcularam-se os seguintes parâmetros zootécnicos para avaliar o crescimento. Taxa de crescimento específico (SGR), Taxa de crescimento absoluto (AGR), Índice de crescimento diário (DGI) e Índice de condição (K). As fórmulas de cálculo de cada um destes parâmetros são as seguintes:

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

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

Taxa de crescimento específico (SGR) – Permite obter a percentagem de aumento diário de peso ao longo de toda a atividade experimental. Este parâmetro é útil para que seja possível comparar o crescimento em períodos curtos (Engrola *et al.*, 2007).

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

Índice de crescimento diário (DGI) - Este coeficiente permite uma boa comparação

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

das taxas de crescimento, uma vez que varia pouco caso a massa corporal seja 1 g ou vários quilos, embora o expoente deva ser adaptado para cada caso.

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

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

2.5. Análise de dados

Após a recolha de todos os dados ao longo de todo o estudo, foram analisados os seguintes parâmetros: número de peixes vivos como indicador de sobrevivência, variação do comprimento total e de massa individual para cada tratamento, como indicadores de crescimento. Foram ainda analisados os parâmetros zootécnicos anteriormente referidos para cada dieta. Antes de executar qualquer tipo de análise estatística, as variáveis em estudo foram testadas quanto à normalidade através do teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov.

Os resultados foram apresentados sobre a forma de média \pm erro-padrão. O tratamento estatístico dos dados foi realizado com auxílio do programa *IBM SPSS Statistics 23* (IBM Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos da América). O nível de significância utilizado foi de $\alpha = 0,05$.

ANOVAs de um fator foram aplicadas para comparar o comprimento total e o peso individual de *G. rufa* entre cada dose de alimento fornecido, no início do ensaio experimental. Mas também, para comparar o crescimento dos peixes, em termos de massa individual, taxas de crescimento absoluto (AGR) e específico (SGR), bem

como para o índice de condição corporal (K). Os resultados foram apresentados como ($F_{\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos}} = \text{valor do teste; valor de significância } p$), para cada fator e respectivas interações. Em caso de existirem diferenças estatisticamente significativas, essas análises foram seguidas por testes *post-hoc* de multicomparação, para descobrir que grupos de dados seriam significativamente diferentes dos restantes. Os resultados foram apresentados como (Teste de Bonferroni; valor de significância p). Caso não se cumprissem os pressupostos de distribuição normal de dados ou de homogeneidade de variância dos mesmos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Como tal, optou-se pela utilização deste procedimento para avaliar o crescimento dos peixes em termos de comprimento total, bem como para o índice de crescimento diário (DGI). Os resultados foram apresentados como ($H_{\text{número de graus de liberdade}} = \text{valor do teste, valor de significância } p$) e as multicomparações *post-hoc* foram apresentadas à semelhança das ANOVAs de um fator.

Para analisar variações de comprimento total e peso individual de *G. rufa*, em função da dose e do tempo, foram realizadas análises de variância de medidas repetidas mistas (ANOVA Mista) com um *design* fatorial 5×2 . Teve a variável “dose/maneio” (doses 1 a 4 e a situação de referência) como fator entre-sujeitos e a variável “tempo” (tamanho inicial e tamanho final) como fator intra-sujeitos. Procedeu-se da mesma forma, para analisar o número de incursões por peixes, ao longo do ensaio experimental. Para tal executou-se uma ANOVA Mista com um *design* fatorial 4×3 . Teve a variável “dose/maneio” (doses 1 a 4 e situação de referência) como fator entre-sujeitos e a variável “tempo” (semana 1, semana 2, semana 3 a que os peixes foram sujeitos a sessões de ictioterapia) como fator intra-sujeitos. Os resultados foram apresentados de forma semelhante aos de ANOVA de um fator, assim como os testes *post-hoc* de multicomparação.

Realizou-se um teste de qualidade do ajuste qui-quadrado para comparar a sobrevivência de peixes *G. rufa* do ensaio experimental, alimentados com quatro doses distintas bem como os da situação de referência. Os resultados foram apresentados como ($\chi^2_{\text{número de graus de liberdade}} = \text{valor do teste, valor de significância } p$). Para os inquéritos foram feitos testes de qui-quadrado para todas as perguntas do mesmo. Foram feitos testes de qui-quadrado de ajuste para as perguntas diretas e testes qui-quadrado de independência para avaliar possíveis interações entre fatores. Os resultados foram apresentados como ($\chi^2_{\text{número de graus de liberdade}} = \text{valor do teste, valor de significância } p$).

A apresentação gráfica dos resultados de sobrevivência de *G. rufa* foi executada mediante a utilização do programa *Microsoft Office Professional Plus Excel 2016*

(Microsoft Corporation, Albuquerque, Estados Unidos da América), sob a forma de gráfico de coluna.

3. Resultados

3.1. Parâmetros de qualidade da água

Os valores dos parâmetros da qualidade da água mantiveram-se normais ao longo de toda a atividade experimental (Tabela I).

Tabela I: Variação dos parâmetros de avaliação da qualidade da água (média \pm desvio padrão) no sistema de suporte de vida dos peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), no decorrer do período do ensaio experimental: temperatura, pH, oxigénio dissolvido, amónia, nitritos, nitratos e fosfatos;

Parâmetros	($\bar{x} \pm \sigma$)
Temperatura	28,6 \pm 0,60 °C
O ₂ Dissolvido	6,79 \pm 0,23 mg L ⁻¹
pH	8,10 \pm 0,10
Amónia	0,20 \pm 0,04 mg L ⁻¹
Nitritos	0,04 \pm 0,03 mg L ⁻¹
Nitratos	8,70 \pm 0,03 mg L ⁻¹
Fosfatos	2,65 \pm 1,20 mg L ⁻¹

3.2. Determinação da dose diária de ração

A dose diária *ad libitum* para peixes *G. rufa* com $\approx 5,62 \pm 0,05$ cm / $1,30 \pm 0,04$ g; revelou ser entre 4 a 5% da massa corporal destes animais. Foi possível verificar que raramente sobrava comida no dia seguinte, nas doses inferiores a 5%. Esta tendência comprovou-se no terceiro dia, em que apenas sobrou alimento a partir dos 5% do peso corporal dos peixes, em todas as rações fornecidas. Apenas a ração Omnifeed (RO) registou o total consumo do alimento fornecido, em metade dos aquários em que se usou 5% da massa corporal dos peixes.

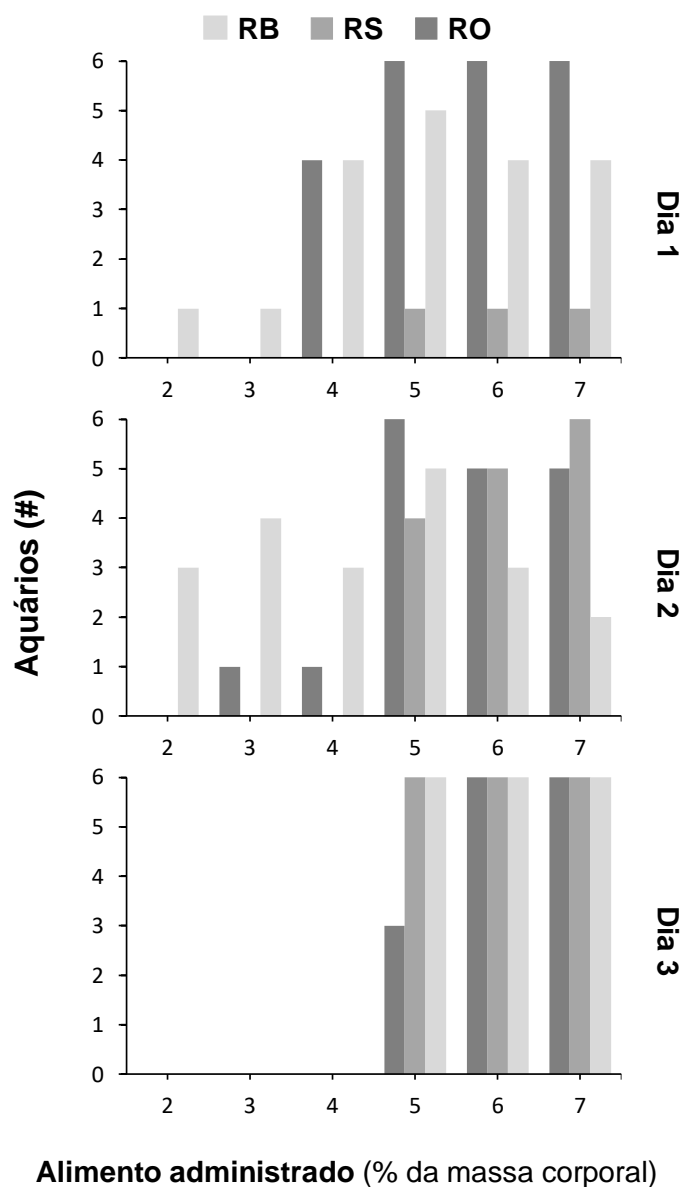


Figura 2: Determinação da dose *ad libitum* ao longo de 3 dias, para peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), através da quantificação de aquários em que sobrava alimento no dia seguinte. As doses de ração fornecidas, corresponderam desde 2 a 7% da massa corporal dos peixes. Utilizaram-se três rações distintas: RO (Ração Omnifeed), RS (Ração Sparos Aquatica Discus) e RB (Ração Dr. Bassleer Biofish Food).

3.3. Determinação da dose diária de ração a fornecer a *Garra rufa* (Heckel, 1843) em regimes de ictioterapia

3.3.1. Sobrevivência

A maioria dos peixes sobreviveu às sessões de Ictioterapia (Fig. 3). Apenas um peixe morreu na dose 1 e outro na dose 3, ao longo de todo o ensaio experimental. Morreu um dos peixes na dose 4, no entanto não foi devido à atividade experimental e sim por acidente. Assim, não houve diferenças estatisticamente significativas na

sobrevivência de *G. rufa* em relação às diferentes doses de alimento que lhes foram fornecidas e ao manejo a que foram sujeitos (teste qui-quadrado: $\chi^2_4 = 0,045$; $p = 1,000 > 0,05$).

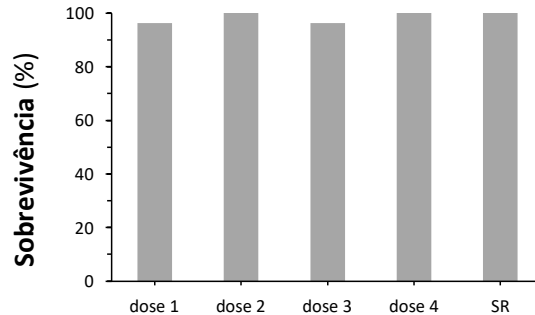


Figura 3: Sobrevivência de peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), submetidos a sessões de ictioterapia, com diferentes doses de alimento (dose 1 = 25%, dose 2 = 50%; dose 3 = 75% e dose 4 = 100% da dose diária *ad libitum*) e na situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam sempre a totalidade da dose diária *ad libitum* e permaneceram sempre no sistema de suporte de vida).

3.3.2. Dimensões corporais e crescimento

No início do ensaio, os peixes *G. rufa* mediam cerca de $5,63 \pm 0,05$ cm de comprimento total (Fig. 4a). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os comprimentos totais de *G. rufa*, os quais iriam ser sujeitos a diferentes tratamentos (ANOVA de um fator: $F_{4,130} = 0,540$; $p = 0,707 > 0,05$). Da mesma forma, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para biomassa individual de *G. rufa* (Fig. 4b; ANOVA de um fator: $F_{4,130} = 1,527$; $p = 0,198 > 0,05$), que correspondia a $1,30 \pm 0,04$ g.

Existiram diferenças estatisticamente significativas relativamente ao comprimento total de *G. rufa*, entre o início e o fim do ensaio [Fig. 4a,c; ANOVA Mista (fator dentre-sujeitos): $F_{4,126} = 24,525$; $p = 0,000 < 0,05$], sem que houvesse interação entre os fatores tempo de ensaio \times dose de alimento/manejo a que os peixes foram sujeitos [ANOVA Mista (fator intra-sujeitos): $F_{3,126} = 1,325$; $p = 0,264 > 0,05$]. Da mesma forma, também não se verificou um efeito notório da dose de alimento/manejo a que foram sujeitos [ANOVA Mista (fator intra-sujeitos): $F_{3,126} = 0,605$; $p = 0,660 > 0,05$]. Efetivamente, todos os peixes cresceram, em termos de comprimento total, ao longo da atividade experimental (Fig. 4d). O aumento do comprimento total dos peixes aumentou progressivamente de $0,04 \pm 0,22$ cm para a dose 1 até $0,16 \pm 0,09$ cm para a situação de referência,

durante o ensaio, sem que houvesse diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (Teste de Kruskal-Wallis: $H_4 = 6,175$; $p = 0,186 > 0,05$).

Relativamente à biomassa individual de *G. rufa*, verificou-se também um efeito principal significativo do tempo do ensaio [Fig. 4b,e; ANOVA Mista (intra-sujeitos): $F_{1,126} = 9,445$; $p = 0,003 < 0,05$], assim como uma interação entre os fatores tempo de ensaio \times dose de alimento fornecida aos peixes [ANOVA Mista (fator intra-sujeitos): $F_{4,126} = 1,325$; $p = 0,264 > 0,05$]. Mesmo assim, não se observou um efeito da dose de alimento sobre a massa individual dos peixes [ANOVA Mista (fator entre-sujeitos): $F_{4,126} = 1,533$; $p = 0,196 > 0,05$]. De facto, observaram-se diferenças estatisticamente significativas no crescimento dos indivíduos, em termos de massa individual (Fig. 4f; ANOVA de um fator: $F_{4,126} = 3,347$; $p = 0,012 < 0,05$), nomeadamente entre as doses 1 e 4 (teste de Bonferroni, $p = 0,041 < 0,05$). Os peixes aos quais foi fornecida a dose 1 (correspondente a 25% da dose diária *ad libitum*) foram os que apresentaram um maior incremento de massa ($0,17 \pm 0,05$ g), semelhante aos peixes da situação de referência (os quais foram alimentados *ad libitum*, sem serem sujeitos a sessões de ictioterapia; $0,14 \pm 0,17$ g). Depois o incremento de peso diminuiu entre as doses 2 a 4, sendo que os peixes sujeitos às doses 3 & 4 perderam massa corporal ($-0,01 \pm 0,26$ g e $-0,03 \pm 0,29$ g respetivamente).

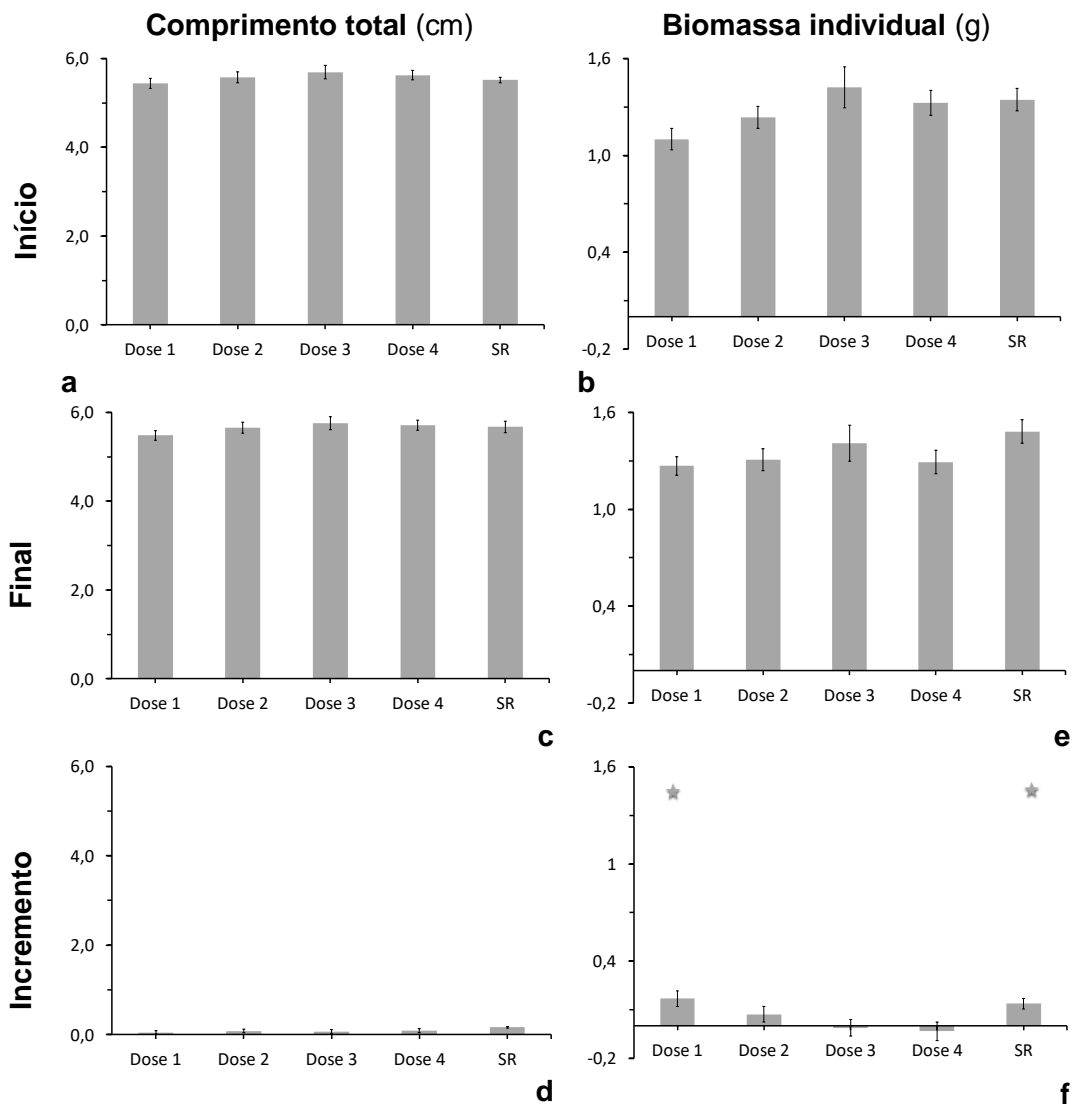


Figura 4: Comprimento total e biomassa individual (média \pm erro padrão) de *Garra rufa* (Heckel, 1843), no início (a & b, respectivamente) e no final (c & e, respectivamente) da atividade experimental, bem como o seu incremento (d & f, respectivamente). Os tratamentos referem-se a peixes submetidos a sessões de ictioterapia com diferentes doses de alimento (dose 1 = 25%, dose 2= 50%; dose 3 = 75% e dose 4 = 100% da dose diária *ad libitum*) e à situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam sempre a totalidade da dose diária *ad libitum* e permaneceram sempre no sistema de suporte de vida). Os asteriscos (*), indicam os tratamentos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

3.3.3. Parâmetros zootécnicos

No que respeita à taxa de crescimento absoluto (AGR; Fig. 5a), esta foi maior em peixes sujeitos a sessões de ictioterapia e alimentados com a dose 1 ($0,007 \pm 0,002$ g dia⁻¹), seguida daqueles que permaneceram no sistema de suporte de vida e alimentados *ad libitum* ($0,005 \pm 0,001$ g dia⁻¹). Os menores valores foram observados

naqueles que foram alimentados com a dose 4 ($-0,001 \pm 0,002 \text{ g dia}^{-1}$), seguidos pelos da dose 3 ($-0,0005 \pm 0,002 \text{ g dia}^{-1}$). Existiram diferenças estatisticamente significativas entre as doses de alimento/maneio de *G. rufa* (ANOVA de um fator:), especificamente as doses 1 e 4 (Fig. 9b; teste *t* de Bonferroni:).

Em relação à taxa de crescimento específico (SGR), esta apresentou um padrão semelhante ao da taxa de crescimento absoluto (AGR). Verificou-se também o maior aumento percentual de massa por dia nos peixes sujeitos a sessões de ictioterapia e alimentados com a dose de ração mais reduzida (dose 1; $0,701 \pm 0,213 \text{ \% dia}^{-1}$), semelhante aos dos da situação de referência ($0,448 \pm 0,113 \text{ \% dia}^{-1}$). Ao passo que os alimentados com a dose 4 foram os que perderam mais massa ($-0,075 \pm 0,213 \text{ \% dia}^{-1}$) (Fig. 9b), tendo sido resultados distintos em termos estatísticos (ANOVA de um fator; teste *t* de Bonferroni)

Relativamente ao índice de crescimento diário (DGI), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as dose de alimento e o maneio de *G.rufa* (Fig. 9c; Teste de Kruskal-Wallis:). Os valores obtidos variaram entre $2,513 \pm 0,325 \text{ g dia}^{-1}$ para os peixes da situação de referência e $3,855 \pm 0,449 \text{ g dia}^{-1}$ da dose 1.

O maior índice de condição corporal (K; Fig. 9d) observou-se para os peixes *G. rufa* da situação de referência ($0,812 \pm 0,0358 \text{ \%}$), seguido pelos da dose 1 ($0,778 \pm 0,025 \text{ \%}$), sendo que o menor ocorreu nos peixes da dose 4 ($0,688 \pm 0,0278 \text{ \%}$). No entanto, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as doses de alimento relativamente a este índice (ANOVA de um fator:).

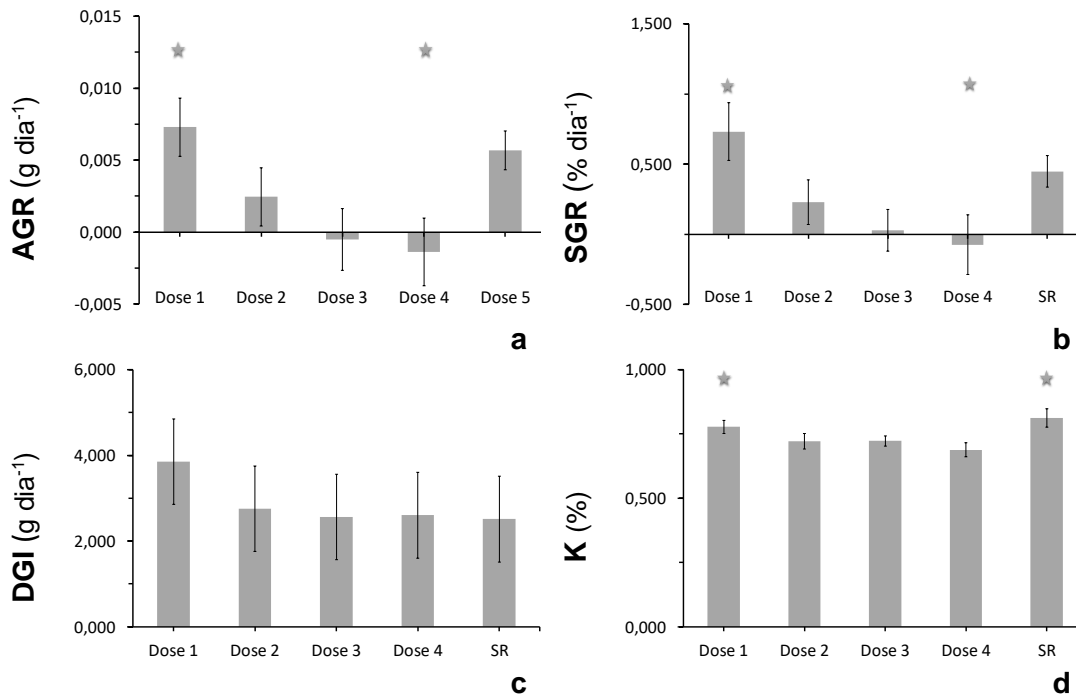


Figura 5: Variação das taxas de crescimento absoluto (AGR; a) e específico (SGR; b), bem como para os índices de crescimento diário (DGI; c) e de condição corporal (d; K) de peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843), submetidos a sessões de ictioterapia com diferentes doses de alimento (dose 1 = 25%, dose 2= 50%; dose 3 = 75% e dose 4 = 100% da dose diária *ad libitum*) e à situação de referência (em que os peixes *G. rufa* receberam sempre a totalidade da dose diária *ad libitum* e permaneceram sempre no sistema de suporte de vida). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão. Os asteriscos (*), indicam os tratamentos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

3.3.4. Incursões

Relativamente à interação entre os peixes e os participantes (Fig. 6), ao longo das três semanas de ictioterapia, houve um efeito principal significativo do tempo no número de incisões médias por peixe, à pele das pessoas voluntárias [ANOVA Mista (fator intra-sujeitos): $F_{2,104} = 52,029$; $p = 0,000 < 0,05$], com interação semana × dose de alimento fornecido [ANOVA Mista (fator intra-sujeitos): $F_{2,104} = 2,301$; $p = 0,040 < 0,05$]. O número de vezes que os peixes investiram, em média, em explorar as mãos dos participantes aumentou de $(8,15 \pm 6,66)$ incisões peixe⁻¹, na primeira semana para $(15,28 \pm 9,51)$ incisões peixe⁻¹ e $(21,85 \pm 11,15)$ peixe⁻¹ na última semana de Ictioterapia. Este padrão verificou-se para todas as doses, exceto na 3. Os peixes que foram alimentados com esta dose, adaptaram-se mais rapidamente, registrando

um número de incursões por peixe entre a segunda e terceira semana do ensaio ($12,70 \pm 8,50$ e $12,00 \pm 9,14$ incursões de peixe⁻¹, respetivamente).

Verificou-se um efeito da dose de alimento sobre a atividade dos peixes [ANOVA Mista (fator entre-sujeitos): $F_{3;100} = 14,721$; $p = 0,000 < 0,05$]. Em termos gerais, o número de incursões de *G. rufa* para explorar a pele dos participantes, diminuiu com o aumento da dose de alimento. Sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas entre o número de incursões dos peixes alimentados com a dose 1 e a dose 2 (Teste de *Bonferroni*; $p = 0,88 > 0,05$). A dose 3 foi a que apresentou o menor número de incursões por peixe, tendo-se distinguido das doses 1 e 2 (Testes de *Bonferroni*; $p = 0,000 < 0,05$ e $p = 0,003 < 0,05$, respetivamente). No entanto, não apresentou diferenças estatisticamente significativas para a dose 4 (Testes de *Bonferroni*; $p = 0,803 > 0,05$), apesar desta última ser estatisticamente diferente da dose 1 (Teste de *Bonferroni*; $p = 0,000 < 0,05$), mas não da dose 2 (Teste de *Bonferroni*; $p = 0,157 > 0,05$). Este padrão repetiu-se em ao longo de todo o ensaio experimental.

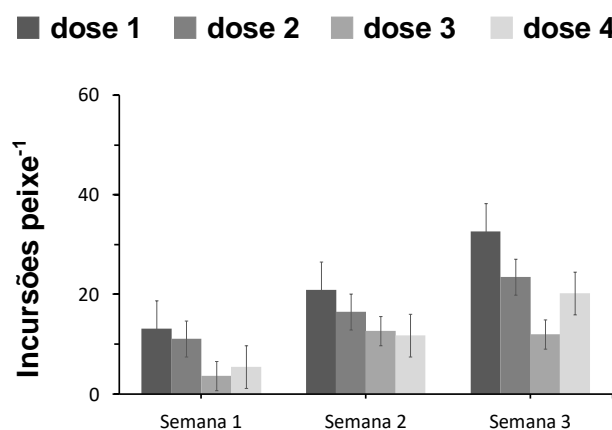


Figura 6: Número de incursões, por peixe *Garra rufa* (Heckel, 1843), às mãos das pessoas voluntárias, durante os 30 minutos de cada sessão diária de ictioterapia, tendo em conta as diferentes doses de rações que lhes foram administradas, durante as três semanas do ensaio experimental.

3.3.5. Inquéritos

Das 134 pessoas que se submeteram às sessões de ictioterapia, cerca de 87,3% dos participantes tinha uma idade inferior a 30 anos, significativamente mais que 6% com uma idade compreendida ente os 30 e 40 anos e 6,7% com idade superior a 40 anos (Fig.7a; Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 175,716$, $p = 0,000 < 0,05$; $N = 134$).

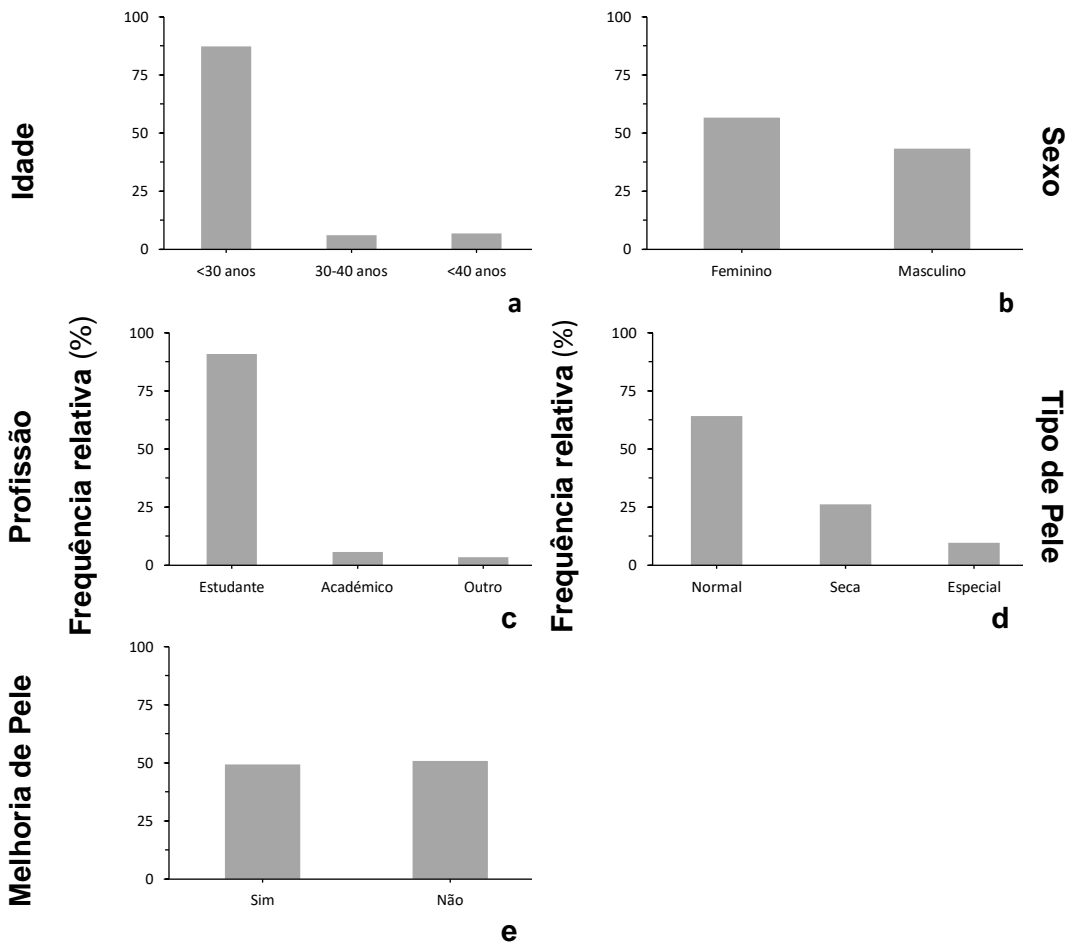
O sexo dos voluntários não apresentou diferenças significativas (Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 2,418$, $p = 0,120 > 0,05$; $N = 134$) sendo que 56,7% eram do sexo feminino, ao passo que 43,3% eram do sexo masculino (Fig. 7b).

A maioria dos voluntários era estudante (90,8%), seguindo-se 5,7% de acadêmicos e 3,4% tinham outra ocupação (Fig. 7c; Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 258,759$, $p = 0,000 < 0,05$; $N = 134$).

Relativamente ao tipo de pele, a maioria dos voluntários apresentaram pele normal, (64,2%). A pele seca expressou-se em cerca de 26,1% e finalmente 9,7% apresentou um tipo de pele especial (Fig.7d; Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 62,791$, $p = 0,000 < 0,05$; $N = 134$). Logo após a sessão, não houve uma clara decisão quanto à melhoria da condição da pele das mãos (Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 0,030$, $p = 0,863 > 0,05$; $N = 134$), em que 49,3% sentiu que a pele melhorou e 50,7% não sentiu qualquer diferença (Fig. 7e).

Das 40 pessoas que participaram uma segunda vez, a maioria tinha uma idade inferior a 30 anos (82,5%) e os restantes 17,5% tinha entre 30 e 40 anos (Fig. 7f; Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 16,900$, $p = 0,000 < 0,05$; $N = 40$). Destas, 65% eram do sexo feminino (65%) e apenas 35% eram do sexo masculino (Fig. 7g; Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 3,600$, $p = 0,058 > 0,05$; $N = 40$). Quando questionados se sentiram melhorias da primeira sessão para a segunda, cerca de 50% dos voluntários disse que “sim” e os restantes 50% negou (Fig. 7h; Teste Chi Quadrado de Ajuste: $\chi^2_1 = 0,000$, $p = 1,000 > 0,05$; $N = 40$).

Sessões de Ictioterapia, em geral



Repetição das Sessões de Ictioterapia

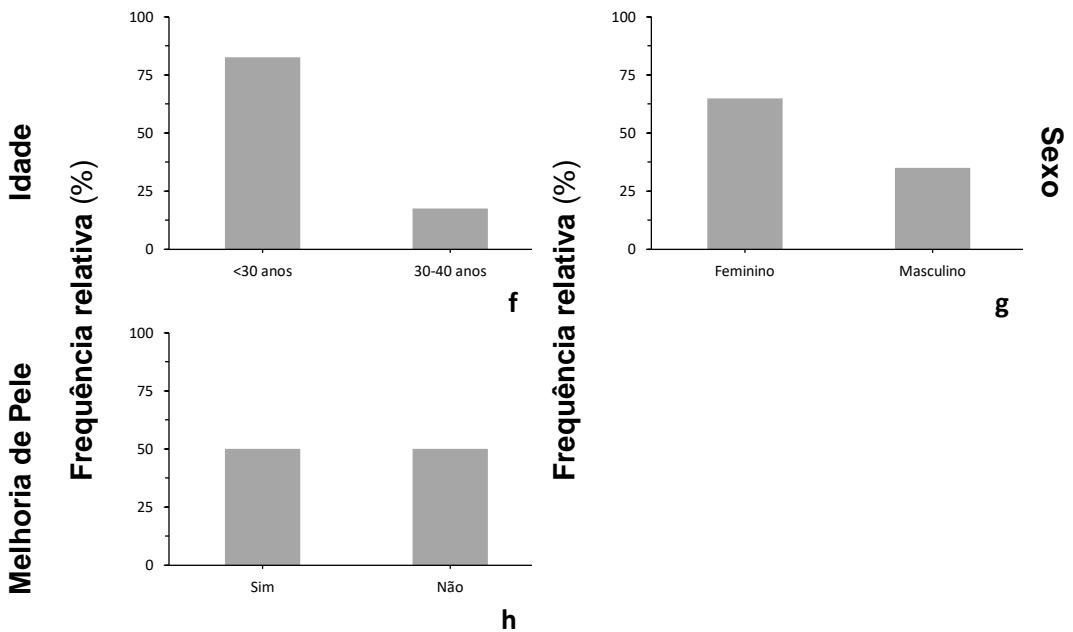


Figura 7: Frequência relativa das respostas aos inquéritos feitos a todos os participantes que se voluntariaram para a realização das sessões de ictioterapia com *Garra rufa* (Heckel, 1843), relativamente às informações sobre a idade, sexo, profissão, tipo de pele e melhoria da pele das mãos, após 30 minutos de sessão, relativamente a todos os participantes e apenas aos que quiseram repetir a experiência.

Verificou-se uma independência do tipo de pele relativamente ao sexo dos participantes (Fig. 7a; Teste Chi Quadrado de Independência: $\chi^2_2 = 5,209$, $p = 0,074 > 0,05$; $N = 174$). Ainda assim, as pessoas do sexo feminino apresentaram com maior frequência uma pele do tipo normal ou seca (40% e 14%, respetivamente). No entanto, o mesmo não se verificou quanto à pele com características especiais (calejada, psoríase, escamosa), que apresentou uma maior frequência nos indivíduos do sexo masculino (7,5%).

Notou-se que o número de incursões dos peixes às mãos dos voluntários foi superior no sexo feminino. No entanto, não se verificou uma dependência entre o sexo dos participantes e a afluência dos peixes para interagir com as mãos dos voluntários (Fig. 8b; Teste Chi Quadrado de Independência: $\chi^2_2 = 0,079$, $p = 0,961 > 0,05$; $N = 174$).

Não existiu uma relação entre a melhoria ou não dos participantes, após o tratamento e o número de incursões dos peixes ao longo do tratamento (Fig. 8c; Teste Chi Quadrado de Independência: $\chi^2_2 = 4,670$, $p = 0,097 > 0,05$; $N = 174$), nomeadamente quando este número era compreendido entre 100-200 incursões e inferior a 100 incursões. Mas, quando o número de incursões era superior a 200, aumentou o número de pessoas que sentiram uma melhoria no estado da pele das suas mãos, após a sessão. Apesar de não se ter comprovado a relação entre os voluntários que gostaram ou não do tratamento ictioterapeutico com a uma maior ou menor atividade dos peixes (Teste Chi Quadrado de Independência: $\chi^2_2 = 1,350$, $p = 0,509 > 0,05$; $N = 171$), verificou-se que todos os voluntários que decidiram repetir a sessão gostaram da interação com os peixes *G. rufa*.

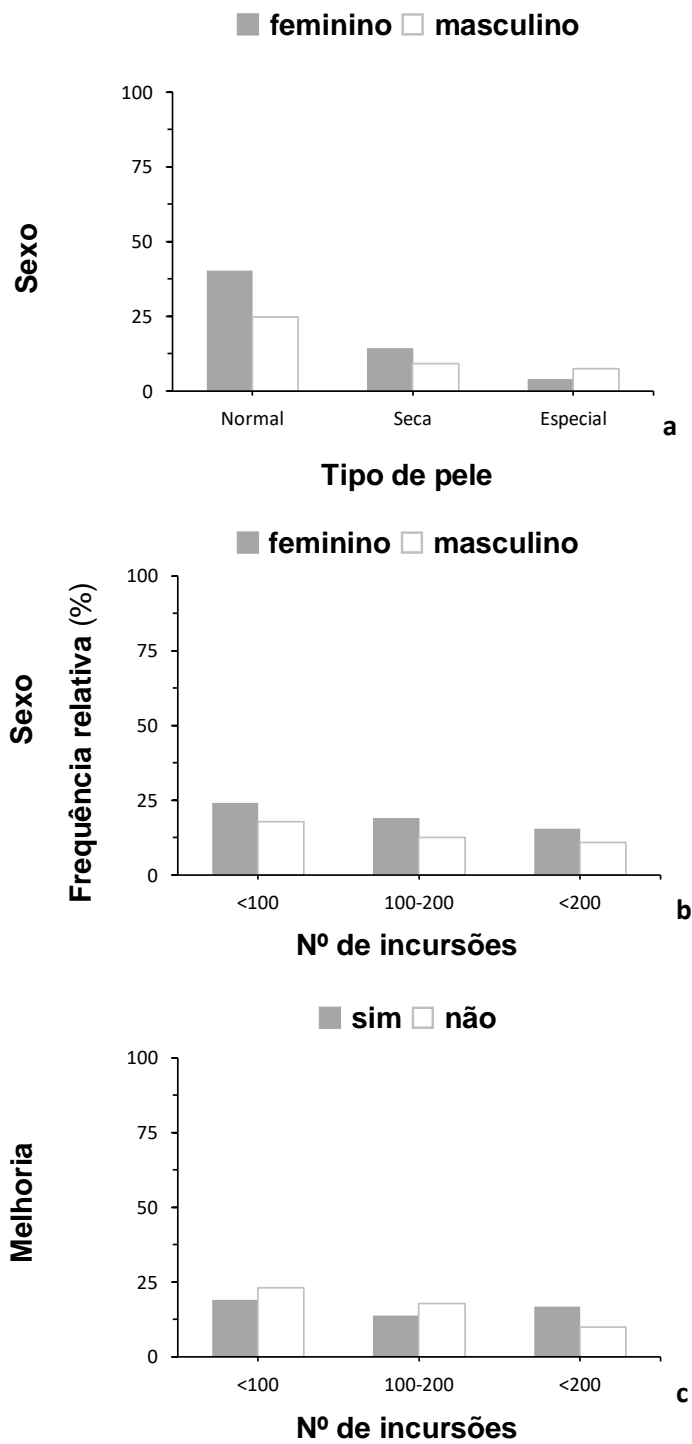


Figura 8: Frequência relativa de: a) indivíduos de um determinado sexo relativamente ao seu tipo de pele; b) o sexo dos participantes e c) a sensação de melhoria do estado da pele, relativamente à frequência das incursões exploratórias dos peixes *Garra rufa* (Heckel, 1843) às mãos dos participantes, durante as sessões de ictioterapia.

4. Discussão

De acordo com a Tabela 1, os parâmetros físico-químicos da água mantiveram-se com valores adequados ao bem-estar dos animais, ao longo de toda a atividade experimental. O sucesso de uma produção economicamente rentável, bem como o bom desenvolvimento dos organismos em aquacultura, dependem da existência uma série de condições que contribuam para a boa qualidade do meio onde os animais se encontram. Quando não se reúnem tais condições, pode prejudicar o crescimento, reprodução, saúde e sobrevivência dos organismos, comprometendo o sucesso de produção ou das investigações técnico-científicas relacionadas com a mesma. Como tal, é necessário ter em mente que a qualidade da água é extremamente importante para o sucesso de qualquer aquacultura. Portanto, uma avaliação cuidada dos recursos hídricos é crucial para a sobrevivência dos organismos em cativeiro (Tundisi & Tundisi, 2008).

Características como relação proteína/energia, condições do meio, regime alimentar, assim como as características fisiológicas do animal, como idade, tamanho e reprodução, compõe as necessidades proteicas dos peixes numa dieta (Orvay, 1993; Lucas, 2005, Mohanta & Subramanian, 2011). Deste modo, além de ser necessário manter as condições do meio estáveis, será necessário fixar também um regime de alimentação, definindo a dose e a frequência ideal para a espécie em estudo.

Está documentado que os peixes ornamentais necessitam diariamente de 1% a 2,5% do seu peso corporal (Pannevis & Earle, 1994). No entanto, tal não se verificou na espécie *Garra rufa*, pois estes peixes demonstraram necessitar de cerca de 5% da sua massa corporal por dia, uma quantidade de alimento muito superior à documentada. Efetivamente, sobrou ração a partir dos 4% de massa corporal do alimento administrado no primeiro e segundo dias, mas apenas para as rações Dr. Bassleer Biofish Food Regular M e Omnifeed. A ração Sparos Aquatica Discus foi inteiramente consumida na proporção de 4%, uma vez que apresenta um menor conteúdo energético. No entanto, só no terceiro dia é que foi clara a sobra de alimento a partir da dose 5%, para quase todas as rações. Ou seja, a partir da dose 5% de massa corporal, os animais ficavam com certeza saciados. No caso da ração Omnifeed, metade dos aquários apresentava ainda resíduos de alimento no dia seguinte. Contudo, tal poderá ter sido devido à maior granulometria e forma irregular dos *pellets*, resultante do processo artesanal de produção da ração. Apesar da imediata aceitação da ração pelos peixes *G. rufa*, estes tinham de desgastar os *pellets* com os espinhos queratinosos que possuem na boca, ate aqueles terem um tamanho adequado para serem ingeridos. Por vezes, observou-se ser um processo

moroso, que poderia levar à desistência da ingestão de alguns dos *pellets* maiores. O valor de 5% da massa corporal poderá ser um valor elevado, explicado pelo facto de estes animais serem peixes muito enérgicos, com um consequente metabolismo muito acelerado. Em consequência, gastam a grande quantidade de energia em curtos espaços de tempo. De acordo com essa informação, recomenda-se que a dose *ad libitum* para otimizar o crescimento de *G. rufa* seja administrada três vezes por dia (Catarino, 2019). Ao longo de três dias, notou-se uma clara adaptação à quantidade de alimento, bem como ao tipo de ração. A maioria dos peixes são pouco especializados nos seus hábitos alimentares, sendo, considerados “generalistas”, uma condição necessária para ingerir, digerir e absorver os vários tipos de alimento (Nikolsky *et al.*, 1974). Mesmo preferindo especializar-se no consumo de um único tipo de alimento, os peixes são capazes de substituí-lo por outro totalmente diferente, quando o primeiro se torna indisponível. Ainda assim, alguns conseguem ou necessitam mudar os hábitos alimentares ao longo do seu ciclo de vida (Ribeiro *et al.*, 2012). Na Natureza, os peixes têm a capacidade de balancear suas dietas, escolhendo os que melhor suprem suas exigências nutricionais e preferências alimentares, entre diversos tipos de alimento disponíveis. O sucesso da aquacultura está, entre muitos fatores, associado ao conhecimento das características morfofisiológicas, comportamentais e nutricionais das espécies em cultivo, em todas as suas fases de desenvolvimento (Ribeiro *et al.*, 2012).

No final do ensaio experimental, verificou-se que a taxa de sobrevivência de *G. rufa* foi quase de 100%, independentemente das diferentes doses de ração que foram fornecidas. Os únicos três indivíduos que pereceram - um na dose 1 (25% da dose diária de ração *ad libitum*), outro na dose 3 (75% da dose diária de ração *ad libitum*) e um na dose 4 (100% da dose diária de ração *ad libitum*) - resultaram da evasão desses peixes, do seu sistema de suporte de vida, durante a noite.

Os peixes *G. rufa* que mais exploraram as células da epiderme dos voluntários, durante as sessões de Ictioterapia, foram alimentados com as menores doses de ração: 25% (dose1) e 50% (dose 2) da dose diária *ad libitum*, respetivamente (Fig. 6). Os peixes da situação de referência apresentaram um maior crescimento a nível de comprimento total e aumentaram a sua biomassa corporal. De entre os animais que foram sujeitos às sessões de ictioterapia, os que foram alimentados com as maiores doses de ração (doses 3 e 4, correspondentes a 75% e 100% da dose diária *ad libitum*), apresentaram um maior crescimento a nível de comprimento total, mas diminuíram de peso. Contrariamente, os que receberam menos ração, cresceram menos em comprimento total e ganharam massa corporal (doses 1 e 2). Uma análise mais atenta dos dados revelou que, apesar de haver diferenças

estatisticamente entre o comprimento total de *G. rufa* no início e no final do ensaio (em que todos os peixes cresceram), não se verificou um crescimento estatisticamente distinto entre as diferentes doses administradas. Relativamente à massa corporal, verificaram-se também diferenças entre o início e o final do período experimental, com efeitos opostos entre as menores e as maiores doses de alimento, sendo que as doses 1 e 4 (respetivamente 25% e 100% do dose diária *ad libitum*) produziram efeitos claramente distintos. A diferença poderá basear-se na qualidade nutricional da dieta dos peixes *G. rufa* durante as sessões de ictioterapia em função do seu comportamento. Na realidade, o comportamento dos peixes durante a alimentação é de extrema complexidade e tem sido estudado extensivamente do ponto de vista ecológico, tanto em peixes de cativeiro como selvagens (Houlihan *et al.*, 2001). Muitas das respostas comportamentais estão diretamente relacionadas com os métodos de alimentação, frequência de alimentação e até de preferência de alimento (Wynne, *et al.*, 2005). De facto, as menores doses de alimento (25% e 50% da dose diária *ad libitum*) fomentaram uma maior procura de alimento complementar, com maior número de incursões à exploração das mãos dos voluntários das sessões de ictioterapia, comparativamente às doses maiores de alimento (75% e 100% da dose diária *ad libitum*), durante todo o período experimental. Desta forma, os peixes *G. rufa* das doses 1 e 2 alimentaram-se de uma maior quantidade de células epiteliais humanas que os peixes das doses 3 e 4. Estes peixes removem apenas as células superficiais da pele, graças à presença de espinhos queratinizados na sua boca, que é adaptada para aderir e fixar a várias superfícies (aparelho adesivo; Teimori *et al.*, 2011). As células da camada córnea da epiderme dos seres humanos são maioritariamente constituídas por uma proteína estrutural fibrosa chamada queratina. Em princípio, esta terá sido uma dieta empobrecida que, a longo prazo, poderá ter repercussões no sistema imunitário, bem-estar e saúde dos animais, comparativamente ao fornecimento de uma ração completa e suplementada. Assim, os peixes *G. rufa* da dose 1 e dose 2 demonstraram-se mais irrequietos, inquisitivos, exploradores e interativos, fomentados pela vontade de encontrar alimento. A maior atividade destes peixes, poderá ter ajudado a desenvolver mais tecido muscular, fomentado também pela possível utilização dos aminoácidos obtidos da digestão das células humanas queratinizadas, repercutindo-se num aumento de massa corporal. Comparativamente, os peixes *G. rufa* alimentados com as doses 3 e 4 (75% e 100% da dose diária *ad libitum*), demonstraram-se menos interativos e mais sossegados. Considerando que estes tinham acesso a mais alimento, adequado às suas necessidades nutricionais, adaptaram-se pior às mudanças de ambiente a que eram sujeitos diariamente para as sessões de ictioterapia. Estes permaneciam quietos por

mais tempo no fundo dos aquários onde os voluntários humanos mergulhavam as mãos, assustando-se com mais frequência relativamente a sons e movimentos ao seu redor, nadando repentinamente numa direção oposta. O maior *stress* sentido por estes animais poderá ter conduzido a um maior consumo de reservas energéticas. Mais ainda, a dieta com menos queratina e o comportamento mais tímido, terão contribuído também para um menor desenvolvido de tecido muscular. Ambos os fatores poderão ter contribuído para a diminuição da massa corporal observada. Esta tendência foi suportada pelos parâmetros zootécnicos SGR (taxa de crescimento específico) e AGR (taxa de crescimento absoluto), com que se salientaram as diferenças estatisticamente significativas entre as doses 1 e 4. A dose 4 correspondem à totalidade da dose diária de alimento *ad libitum*, à semelhança da fornecida na situação de referência. No entanto, a diferença entre estes dois tratamentos experimentais residiu no facto dos peixes da situação de referência não serem removidos do seu sistema de suporte de vida, nem sujeitos a sessões de ictioterapia. Estes animais apresentaram dos melhores valores dos parâmetros zootécnicos, à semelhança dos peixes *G. rufa* sujeitos a sessões diárias de ictioterapia e alimentados com 25% da dose diária de alimento *ad libitum* (dose 1). É importante ter em conta as necessidades alimentares de cada espécie. Por isso, é relativamente óbvio que se deverá optar por administrar uma ração comercial de boa qualidade (Wildgoose, 2012). Uma ração equilibrada nutricionalmente deve conter proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerais e fibras. Um dos fatores importantes a ter em conta, será a relação entre a quantidade de proteína e a quantidade de lípidos numa dieta. Há autores que defendem que, uma dieta saudável é constituída por um elevado teor de proteína de elevada qualidade e baixo teor em gorduras (Barrento *et al.*, 2009). Contudo, se a ração for constituída por uma boa percentagem de proteína (até 55%) e, se a quantidade de lípidos numa ração variar entre 8 a 16%, tal potencia e melhora o desempenho do crescimento em algumas espécies, como é o caso do peixe-espada *Xiphophorus hellerii* Heckel, 1848 (Velasco-Santamaría & Corredor-Santamaría, 2011). Este parece ser o caso da ração Dr. Bassleer Biofish Food Regular M, usada neste estudo, que é composta por 52-55% de proteína e 17-20% de lípidos, e que promove um rápido crescimento saudável de *G. rufa* (Catarino, 2015; Catarino *et al.*, 2015; Gomes 2015; Gomes *et al.*, 2015).

Geralmente, quando os peixes *G. rufa* são mudados para um novo sistema de suporte de vida, ou novo local, reagem com alguma timidez. Estes deixam de nadar ativamente na coluna de água e de interagir com os seus cuidadores, procurando ocultar-se no fundo dos tanques e aquários, onde permanecem imóveis. Os

movimentos dos opérculos tornam-se mais rápidos e mudam frequentemente a posição dos olhos (que são salientes e posicionados mais no topo da cabeça), para perscrutar o que os rodeia (autor, observação pessoal). Tal estranheza pode ser explicada pelo facto de os animais estarem numa situação que lhes confere *stress*, o que leva a uma redução de crescimento que pode ser observada durante períodos de *stress* (Ashley 2007; Aluru & Vijayan 2009), em que os peixes ingerem menos alimento. Condições de *stress* provocam também uma redução na eficiência de conversão alimentar, o que leva a um decréscimo nas taxas de crescimento, mesmo quando os níveis de ingestão alimentar se mantêm (Barton *et al.*, 1987; Gregory & Wood 1999; Paspatis *et al.*, 2003; d'Orbcastel *et al.*, 2010).

O manio de peixes é um processo que geralmente exige impor um elemento estranho intrusivo na água, para encurralar animais e depois capturá-los. Se não for executado corretamente, é um fator indutivo de *stress*, que põe em causa o bem-estar animal (Barton & Iwama, 1991). Tal como mudanças abruptas na temperatura e qualidade da água, mesmo quando os valores estão dentro do intervalo de tolerância das espécies; e definitivamente quando estão fora do mesmo (Wedemeyer, 1997). Quando os peixes são movidos para um outro sistema, as características da água do recipiente recetor devem ser semelhantes às do recipiente de origem. Por esse motivo, o transporte de peixes é uma operação que tem que ser efetuada com o máximo de cuidado, para tentar causar o mínimo *stress* possível (Piper *et al.*, 1982). De um modo concordante, grande parte da pesquisa sobre os efeitos de *stress* em peixes é relacionada com as suas dificuldades de transporte. (Barton, 2002; Silva *et al.*, 2015). Os peixes exibem uma ampla variação nas respostas fisiológicas ao *stress*, e a história genética parece explicar grande parte da variação inter-específica (Barton, 2002). Para as sessões de ictioterapia, os peixes *G. rufa* foram retirados do seu aquário original todos os dias, para um aquário de tratamento. Os fatores como: o transporte entre aquários, o manio, as mudanças de água a que foram sujeitos, a interação com seres humanos; proporcionaram mudanças no seu metabolismo, causando-lhes *stress*. Tais procedimentos foram imprescindíveis para assegurar condições de salubridade para os peixes e de higiene para os participantes humanos que se voluntariaram para este ensaio experimental. O protocolo de higienização desenvolvido e implementado ao longo deste ensaio experimental teve um papel crucial, uma vez que, nenhum dos peixes adoeceu, nem nenhum dos participantes relatou qualquer reação adversa ao contacto com os animais. Na maioria das vezes, não existe qualquer precaução para prevenir a transmissão de doenças bilateralmente entre Homem-peixe ou Peixe-água-Homem. Se não existir nenhum tipo de precauções, poder-se-á desenvolver situações críticas

de perigo para a saúde pública (Gauthier, 2009; Schets *et al.*, 2006; Sayili *et al.*, 2006). Apesar de não existir, até agora, nenhuma evidência científica da propagação de infecções para as pessoas, através do contacto com *G. rufa*, a principal preocupação reside no facto de os peixes usados não serem "instrumentos", que possam ser desinfetados ou esterilizados. A falta de protocolos regulamentares e legislação, que assegurem a saúde pública, tem conduzido à proibição de instalações onde se pratique ictioterapia, como em alguns países (Reino Unido), ou parte deles (vários estados nos Estados Unidos da América, províncias do Canadá e da Alemanha) (HPA, 2011; Schets *et al.*, 2015).

Os indivíduos *G. rufa* apresentaram uma clara evolução no seu comportamento, ao longo das três semanas de ictioterapia. Inicialmente, os peixes demonstraram relutância em aproximar-se das mãos das pessoas voluntárias neste estudo. Permaneciam em grupo, imóveis, no fundo dos aquários de tratamento ictioterapêutico. Este comportamento foi o oposto do que lhes é característico. Normalmente, são peixes com elevada atividade natatória, atentos ao que os rodeia, curiosos quanto aos elementos que sejam novidade do seu habitat de cultivo, e são ávidos por comida, exibindo comportamentos intensos de frenesim alimentar (autor, observação pessoal). Ao longo do ensaio, os peixes começaram a ganhar confiança e demonstraram uma maior interação com os seres humanos. Tal refletiu-se no aumento progressivo das incursões destes peixes, às mãos dos voluntários ao longo das três semanas de ensaio. No entanto, demonstravam assustar-se com ruídos audíveis, refugiando-se rapidamente no fundo do aquário, entre os dedos dos voluntários, curiosamente sem se importarem com o movimento destes. Com base nestas observações, poder-se-á inferir que estes peixes são passíveis de adquirir comportamentos resultantes de um processo de aprendizagem. McGregor *et al.*, (2001) demonstraram a capacidade de aprendizagem e reconhecimento individual no peixe-beta combatente *Betta splendens* (Regan, 1910), através de lutas entre os machos da mesma espécie (Chandroo *et al.*, 2004). Topál & Csányi (1999) estudaram os peixes-paraíso *Macropodus opercularis* (Linnaeus, 1758) e demonstraram que o seu comportamento exploratório poderia ser extinto, ou substituído pelo comportamento de evitação, dependendo da aquisição de memórias anteriores do seu ambiente. A aprendizagem demonstrada era indicativa de uma capacidade real de construção mental, que poderia direcionar seus comportamentos, de forma flexível e adaptativa (Chandroo *et al.*, 2004).

De forma a garantir a viabilidade de tratamentos ictioterapêuticos - independentemente do seu propósito (recreativo, estético ou de saúde), há necessidade de se assumir um compromisso entre a saúde dos peixes *G. rufa* e o

interesse inapto destes animais para interagirem com os seres humanos. Privar os peixes de alimento, de forma a promover o comportamento de “mordiscar” seres humanos, e assim remover-lhe as camadas superficiais da pele, é um comportamento eticamente reprovável – pelo que nem foi uma hipótese a considerar no presente estudo (Diretiva 98/58/CE; Tratado de Lisboa, 2007; Algiers *et al.*, 2009; Diretiva 2010/63/UE; Decreto-Lei nº 113/2013; Eurogroup for Animals, 2016). Do ponto de vista do bem estar animal, pode dizer-se que este método pode ser questionável, uma vez que é considerado por muitos como uma exploração dos animais. No entanto, uma vez que a ictioterapia é uma realidade e mostra resultados concretos para doenças como a psoríase, que provoca extremo desconforto (Sayili *et al.*, 2007), cabe aos defensores dos direitos dos animais promover um comportamento que se adegue à dignidade do próprio animal. Por isso, este estudo tem importância providenciar a indústria associada a Spas de Turismo Termal e de Medicina Alternativa de como melhor cuidar destes animais nas suas instalações. Os resultados obtidos providenciam informação quanto à qualidade e quantidade de alimento que se deve fornecer a *G. rufa*, para que estes tenham um bom desempenho nas sessões de ictioterapia, sem comprometer a sua saúde e bem-estar. As boas práticas de manejo de *G. rufa* fomentam a rentabilidade deste sector económico, uma vez que reduz a mortalidade dos animais e evita a necessidade de aquisição de substitutos. Por outro lado, será necessário alertar a público opinião pública para as precauções de higiene, que devem ser aplicadas em ictioterapia, uma vez que além do bem-estar animal, também estão em causa, questões de saúde pública.

Quanto aos inquiridos, a maioria dos participantes era estudante e com idade inferior a 30 anos, pois a atividade foi realizada no âmbito académico, o que seria expectável, visto que existem muitos mais alunos do que docentes e outros funcionários. Embora tivesse ocorrido um equilíbrio entre o sexo das pessoas que participaram neste estudo, tendo experimentado uma sessão de ictioterapia pela primeira vez, a maioria dos participantes que experimentaram uma segunda vez era do sexo feminino. Geralmente, as mulheres tendem a ter um cuidado e uma atenção superior à estética. Em geral, são as pessoas que demonstram maior interesse e até curiosidade neste tipo de tratamento (Ozcelik & Akyol, 2011). A maioria das pessoas afirmaram ter um tipo de pele normal, o que poderá explicar o facto da maioria dos inquiridos ter expressado que gostou da experiência do contacto com os peixes, mas que não sentiu melhorias na condição de pele. Ainda assim, também será necessário ressaltar que este tratamento deve ser continuado para se obterem resultados visíveis (Grassberger, 2006). Percebeu-se que o sexo influenciou a preferência dos

animais pela pele feminina, talvez por ser uma pele menos espessa e facilite a ingestão de células epiteliais com menos queratina. Ou simplesmente, por preferência de um determinado tipo de pele. Ainda assim, o tipo de pele normal predominou entre os participantes do sexo feminino. Os tipos de pele especiais (seca, psoríase, calejada e outras condições) foram mais frequentes entre os homens. Não se verificou uma relação entre o sexo dos participantes e o seu tipo de pele, apesar de à partida se esperar que os homens apresentassem pele mais espessa e seca que as mulheres. Este resultado foi concordante com os resultados de Mogensen *et al.*, (2008), em que estes autores não encontraram relação significativa na espessura da epiderme entre homens e mulheres.

5. Conclusão

De acordo com o exposto, recomenda-se que seja fornecida uma ração comercial de boa qualidade aos peixes, em regime de ictioterapia, para satisfazer os seus requisitos nutricionais. Apesar da dieta 1 ter apresentado bons parâmetros zootécnicos, se a prática for continuada por muito tempo, a dieta é empobrecida em termos nutricionais acarretará consequências para a saúde dos peixes, deixando-os debilitados e sujeitos a doenças provocadas por agentes patogénicos ou mudanças ambientais. Graças ao facto de os peixes *G. rufa* terem revelado ser organismos bastante resilientes a mudanças ambientais (nomeadamente nas trocas entre os sistemas de suporte de vida e os sistemas de ictioterapia), bem como à sua capacidade de aprendizagem, recomenda-se fornecer uma dose de alimento entre as 0,14 e 0,21 Kcal peixe⁻¹, correspondentes a 50% - dose 3 e 75% da dose diária *ad libitum* (a qual vale 0,27 Kcal peixe⁻¹ e 5% da massa corporal de peixes com $\approx 5,62 \pm 0,05$ cm / $1,30 \pm 0,04$ g). Apesar de não terem sido as doses com melhor desempenho em termos de parâmetros zootécnicos, será uma forma de encontrar um compromisso entre o interesse dos peixes *G. rufa*, para interagirem com os seres humanos, e providenciar saúde e bem-estar a estes animais, a longo prazo.

Então, pode-se concluir que existe, sim, a possibilidade de manter estes animais para fins ictioterapêuticos de forma digna, sem comprometer o seu bem-estar e sobrevivência, evitando a constante aquisição dos mesmos.

É muito importante que estudos como estes sejam feitos para podermos melhorar os métodos aplicados na produção e manutenção de espécies em cativeiro.

6. Referências bibliográficas

Alhazzaa, R., Bridle A., Mori T., Barden A., Nichols P. (2013). *Echium* oil is better than rapeseed oil in improving the response of barramundi to a disease challenge. *Food Chem* 141:1424-1432.

Aluru, N., Vijayan M. (2009). Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen Comp Endocrinol* 164:142–150.

Ashley, P.J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl Anim Behav Sci* 104:199–235.

Barrento, S., Marques, A., Teixeira, B. Anacleto, P., Vaz-Pires, P., Nunes, M. L. (2009). Effect of season on the chemical composition and nutritional quality of the edible crab *Cancer pagurus*. *J Agric Food Chem* 57, 10814–10824.

Barton, B.A., Iwama, I.W. (1991). Physiological changes in fish from *stress* in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *A. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.

Barton, B.A., Schreck, C.B., Barton, L.D., (1987) Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow-trout. *Dis Aquat Org* 2:173–185.

Barton, B.A., 2002. *Stress* in fish: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42, 517–525.

Catarino, M. 2015. Formulação de uma dieta adequada à produção de *Garra rufa* (Heckel, 1843) e avaliação da sua performance zootécnica. Dissertação de Mestrado em Aquacultura. Instituto Politécnico de Leiria. Peniche.

Catarino, M.M.R.S., Gomes, M.R.S., Ferreira, S.M.F., Gonçalves, S.C. (2019). Optimization of feeding quantity and frequency to rear the cyprinid fish *Garra rufa* (Heckel, 1843). *Aquaculture Research* 50, 876–881.

Chandroo, K., Duncan, I., Moccia, R. (2004). Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and *stress*. *Anim. Behav. Sci.* 86(3-4), 225-250.

Coad, B.W. (2010). Canadian Museum of Natural History. [Website] (<http://www.briancoad.com>) accessed February 2017.

Coad, B. (2014). Freshwater fishes of Iran. (www.briancoad.com) accessed February 2017.

Cunha, A. (2006). Anesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *J Fish Biol* 69: 1512-1512.

d'Orbcastel, E.R., Lemarie, G., Breuil G, Petochi, T., Marino, G., Triplet, S., Dutto, G., Fivelstad, S., Coeurdacier, J.L. (2010). Effects of rearing density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) biological performance blood parameters and disease resistance in a flow through system. *Aquat Liv Res* 23:109–117.

Elangovan, A., Shim, K. F. (1997). Growth response of juvenile *Barbodes altus* fed isocaloric diets with variable protein levels. *Aquacult* 158, 321-329.

Engrola, S., Conceição, L. E. C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M. T. (2007). Improving weaning strategies for *Senegalese sole*: effects of body weight and digestive capacity. *Aquac Res* 38, 696-707.

Esmaeili, H. R., Ebrahimi, M., Ansari, T. H., Teimory, A., and Gholamhosseini, G. (2009). Karyotype analysis of Persian stone lapper, *Garra persica* (Berg, 1913) (Actinopterygii: Cyprinidae) from Iran. *Curr. Sci.* 96: 959-962.

FAO (2011) (forthcoming). World Census of Agriculture: analysis and international comparison of the results (1996-2005). FAO Statistical Development Series No. 13. (Columns 3 and 4). Rome.

FAO (2015). The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Rome.

Fricke, R., Bilecenoglu, M., Sari, H.M. (2007). Annotated checklist of fishes and lamprey species (*Gnathostomata* and *Petomyzontomorpha*) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. *Stuttgarter Geitrag zur Naturkunde, Series A* 706, 1–169.

Froese, R., Pauly, D. (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org/home.htm>. accessed in June 2017.

Froese, R., Pauly, D. (2011). FishBase. World Wide Web Electronic publication. (<http://www.fishbase.org/home.htm>). Accessed in July 2018.

Froese, R., Pauly, D. (2011). FishBase. World Wide Web Electronic publication.

Gauthier, D.T., Rhodes, M.W.(2009). Mycobacteriosis in fishes: a review. *Vet J* 180:33-47.

Gerking, S.D.(1994) Feeding ecology of fish. New York: Academic Press; p. 416.

Gomes, M.R.S. (2015).“Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de *Garra rufa* (Heckel,1843), com vista à sua produção em Aquacultura. Tese de Mestrado em Aquacultura do Instituto Politécnico de Leiria.

Gomes, M.R.S., Catarino, M.M.R.S., Gonçalves, S.C., Ferreira, S.M.F., (2015). Insights on the reproduction & embryonic development of *Garra rufa* (Cyprinidae). XV European Congress of Ichthyology, Porto (Portugal), 7 a 11 Setembro de 2015.

Grassberger, M., Hoch, W. (2006). Ichthyotherapy as Alternative Treatment for Patients with Psoriasis: A Pilot Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4), 483–488.

Green, E., (2003). International trade in marine aquarium species: using the global marine aquarium database. In: Cato, J., Brown, C. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, pp. 31–47.

Gregory, T.R. (1999) The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol Biochem Zool* 72:286–295.

Gümgüm, B., Ünlü, E., Tez, Z., Gülsün, Z. (1994). Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris river in Turkey. *Chemosphere*, 29(1), 111–116.

Halver, J. E., Hardy, R. W. (2002). *Fish Nutrition*. Academic Press.

HPA - Health Protection Agency Fish SPA Working Group of the United Kingdom (2011).

Houlihan, D., Boujard, T. (2001). Jobling M. Food intake in fish. Oxford (UK): Blackwell Science Ltd; p. 418.

Jarvis, P. L. (2011). Biological Synopsis of *Garra rufa*. Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2946.

Kara, C., Alp, A. (2005). Distribution and Morphometric Characteristics Of *Garra Rufa* Heckel, (1843) In Ceyhan River System [In Turkish with English Abstract] Turk J Fish Aquat Sc (National Water Days Special Issue), National Water Days Symposium. 28-30 Trabzon Karadeniz Technical University, Turkey.

Kumar, T.V.L., Rao, K.K., Barbosa, H., Jothi, E.P. (2015). Studies on spatial pattern of NDVI over India and its relationship with rainfall, air temperature, soil moisture adequacy and ENSO. Geophys J Roy Astron Soc 30:1–18.

Leal, M., Vaz, M., Puga, J., Rocha, R., Brown, C., Rosa, R., Calado, R., (2016). Marine ornamental fish imports in the European Union: an economic perspective. Fish Fish 17: 459– 468.

Lewbart, G. A. (1998). Clinical Nutrition of Ornamental Fish. Seminars in Avian and Exotic Pet Med, Vol 7, No 3, pp 154-158.

Lovell, R. T. (2000). Nutrition of ornamental fish. En: Bonagura J (Ed.), Kirk's Current Veterinary Therapy XIII-Small Animal Practice. W.B. Saunders, Philadelphia, USA.

Lucas, J.S.P.C. (2005). Aquaculture – Farming aquatic animals and plants. Blackwell Publishing, Victoria.

Madhu, K., Madhu, R., Rethesh, T., (2016). Spawning, embryonic development and larval culture of redhead dottyback *Pseudochromis dilectus* (Lubbock, 1976) under captivity. Aquacult 459: 73–83.

McGregor, P.K., Peak, T.M., Lampe, H.M., (2001). Fighting fish *Betta splendens* extract relative information from apparent interactions: what happens when what you see is not what you get. *Anim. Behav.* 62, 1059–1065.

Mogensen, M., Morsy, H., Thrane, L., Jemec, G. (2008). Morphology and epidermal thickness of normal skin imaged by optical coherence tomography. *Dermatology* 217:14–20.

Mohanta, K. N., Subramanian, S. (2011). Nutrition of common freshwater ornamental fishes. ICAR Research Complex for Goa. Old Goa- 403 402, Goa, India.

National Research Council (NRC). (2011). Nutritional requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington.

Neil, M., Collins, M., Geary, M., Swords, D., Hickey, C., Geoghegan, F. (2013). Isolation of *Streptococcus agalactiae* and an aquatic birnavirus from doctor fish *Garra rufa*. *Ir Vet J.* 216:103–114.

Nikolsky, G.V. (1974). *Ekologiya ryb (Fish Ecology)*, Moscow: Vysshaya Shkola.

Noga, E.J., (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment*. pp: 91.

Ronald, W. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. University of Idaho, Hagerman.

Olivier, K., (2001). *The Ornamental Fish Market*, vol.67. GLOBEFISH Research Programme, Rome, FAO, pp.1–99.

Olivier, K., (2003). World Trade in ornamental species. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, Ames, IA, pp.49–63.

Orvay, F. C. (1993). *Aquicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. *Ciències Experimentals 4: Matemàtiques*. Universitat de Barcelona.

Ozcelik, S., Akyol, M. (2011). Kangal Hot Spring with Fish (Kangal Fishy Health Spa) & Psoriasis Treatment *La Presse thermale et climatique*. 148, 141-147.

Özcelik, S., Polat, H.H., Akyol M., Yalcin, A.N. (2000). Kangal hot spring with fish and psoriasis treatment. *J Dermatol.* 27:386–90.

Paspatis, M., Boujard, T., Maragoudaki, D., Blanchard, G., Kentouri, M. (2003). Do stocking density and feed reward level affect growth and feeding of self-fed juvenile European sea bass? *Aquacult* 216:103–113.

Pannevis, M. C., Earle, K. E. (1994). Maintenance energy requirement of five popular species of ornamental fish. *Nutr J* 124, 2616-2618.

Piper, R.G., McElwain, I.B., Orme, L.E., McCraren, J.P., Fowler, L.G., Leonard, J.R. (Eds.), (1982). *Fish Hatchery Management*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, p. 517.

Pomeroy, S., Parks, E., Balboa, M., (2006). Farming the reef: is aquaculture a solution for reducing fishing pressure on coral reefs? *Marine Policy* 30:111-130.

Prang, G., (2007). An Industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian Freshwater ornamentals to the UK market. *Uakari* 3,7–51. Raskoff, K.A., Sommer, F. A.

Rana, K. (2002). *Marketing Plan for Jamaican Ornamental Fish Industry*. Stirling Aquaculture, University of Stirling.

Ribeiro, P., Melo, D., Costa, L., Teixeira, A., (2012). *Manejo Nutricional e Alimentar de Peixes de Água Doce*. Belo Horizonte. Brasil.

Robert, S., Pomeroy, R., Nei, I. A. (2011). *Small-scale fisheries Management*. London. UK.

Sayili, M., Akca H., Duman, T. e Esengun, K. (2006). Psoriasis treatment via doctor fishes as part of health tourism: A case study of Kangal Fish Spring, Turkey. *Tourism management* 28. 325-329.

Schets, F.M., Husman, A.M., Havelaar, A.H., (2015). Disease outbreaks associated with untreated recreational water use in the Netherlands, 1991 e 2007. *Epidemiology and Infection*. doi: 10.1017/S0950268810002347.

Schets, F.M., Van den Berg, H.H.J.L., Lodder, W.J., (2006) Pathogenic micro-organisms in recreational water related to indicators of faecal pollution. 9 RIVM report 330400001 [Dutch].

Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 62. Cambridge University Press, UK, pp. 35–71.

Silva, R.E., Morais, H.A., Rodrigues, N.V., Reis, T., Correia, J.P. (2015). Optimising sealed transports of small ornamental fish. *J Zoo Aquar Res* 3(4): 141-150.

Teimori, A., Esmaili, H., Ansari, T. (2011). Micro-structure Consideration of the Adhesive Organ in Doctor Fish, *Garra rufa* (Teleostei; Cyprinidae) from the Persian Gulf Basin, *Turk J Fish Aquat Sc* 11: 407-411.

Timur, M., Çolak, A., Marufi, M. (1983) Balıklı Kaplıcadaki Balık Türlerinin Tanımı ve Deri Hastalıkları Tedavisindeki Etkilerinin Araştırılması. *AÜ Vet Fak Derg*; 30: 276-86.

Topál, J., Csányi, V. (1999). Interactive learning in the paradise fish (*Macropodus opercularis*): an ethological interpretation of the second-order conditioning paradigm. *Animal Cognition*, 2(4), 197–206.

Trbovic', D., Markovic, Z., Milojkovic, D., Petronijevic, R., Spiric, D. DjinovicStojanovic, J., Spiric, A. (2013). Influence of diet on proximate composition and fatty acid profile in common carp (*Cyprinus carpio*). *Food Compos. Anal* .31, 75- 81.

Trichet, V.V. (2010). Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41, 356–372.

Tundisi, J. G., Tundisi, T. M. (2008). Recursos hídricos no século, 2, 216-222.

Üçer, M., (2004) Kongre Kitabı. Sarı N,Erdemir AD ed. İstanbul, 2006;240-258.

Velasco-Santamaría, Y., Corredor- Santamaría, W. (2011). Nutritional requirements of freshwater ornamental fish: a review. *J Zoo Aquar Res* 16, 2458-2469.

Verner-Jeffreys, D.W., Baker-Austin C., Pond M.J., Rimmer G.S.E., Kerr R., Stone D., Griffin R., Peter White P., Stinton N., Denham K., Leigh J., Jones N., Longshaw M., Feist S.W. (2012). Zoonotic disease pathogens in fish used for pedicure. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(6): 1006–1008.

Warwick, D., Warwick J., (1989). The doctor fish: A cure for psoriasis? *Lancet.*,335:1093–4.

Wedemeyer, G.A., (1997). Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P.,

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

Wildgoose, W.H. (2012). Review of fish welfare & public health concerns about the use of *Garra rufa* in foot spas. *Fish Vet J* 13, 3–16

Wittington, M.L., Chong, R. (2007). Global trade in ornamental fish from an Australia perspective. The Case for revised Import risk analysis and management strategies. *Prev.Vet. Med.* 81, 92–116.

Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. (2005) Appetite control. *J Endocrinol*; 184: 291–318.

Yalçın-Özdilek, S., Ekmekçi, F.G. (2006). Preliminary data on the diet of *Garra rufa* (Cyprinidae) in the Asi basin (Orontes), Turkey. *Cybium.* 30, 177-186.

Yalçın-Özdilek, S. (2008). Natural and invading fish of Karamenderes. In A. Akdemir, O. Demircan, S. Yılmaz, T. Takaoğlu, C. Akbulak (Ed.), *The Symposium of Ezine City Value* (pp. 129-144). Çanakkale: Çanakkale Onsekiz Mart University.