

Associações de limpeza entre o labrídeo facultativo
Centrolabrus exoletus (Linnaeus, 1758) e os seus peixes cliente

Nádia Sofia Francisco Morado

Dissertação de mestrado em Ecologia
orientada por Prof. Doutor Paulo Gama Mota e pela Doutora Marta Soares,
apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, da Universidade de Coimbra.

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Muitos foram os intervenientes que contribuíram para a concretização deste trabalho, ao longo destes dois anos.

Tenho de começar por agradecer ao Prof. Dr. Paulo Gama Mota, que, para além de me ter aceite como sua orientanda, introduziu-me ao grupo de ecologia comportamental do CIBIO-InBIO. Aqui tive a oportunidade de conhecer a Dr.^a Marta Soares, a quem também estou grata por me dar a conhecer este mundo incrível que são os peixes limpadores. Para mais, sempre foi uma pessoa que me motivou com o seu entusiasmo pela ciência e me incutiu o desejo de descobrir mais além do que é já conhecido.

Um grande e especial obrigado ao Francisco Mesquita. Muito mais do que um buddy de mergulho, foi uma pessoa que sempre se mostrou disponível para me acompanhar e ajudar nos mergulhos, a pessoa que mais engenhocas arranjou para capturarmos peixes, a pessoa que me motivou nos dias frios em que não apetecia molhar nem sequer os pés mas que me presentava sempre com um chá quentinho para aquecer a alma e uma fatia de bolo para consolar a fadiga. Confesso que sem ele, todo o trabalho experimental teria o dobro da dificuldade.

Quero agradecer, também, à capitania do porto de Portimão que me autorizou a capturar espécies de peixe em mergulho de escafandro autónomo.

Agradeço à escola secundária Poeta António Aleixo, de Portimão, pela cedência de material laboratorial para proceder à análise dos ectoparasitas recolhidos dos peixes cliente. E, também, à Universidade do Algarve, que pôs ao meu dispor o LEOA, bem como, material laboratorial que me permitiu realizar as análises aos conteúdos estomacais dos limpadores.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais, que sempre me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e sempre me apoiaram e motivaram nesta longa caminhada. Quero agradecer, também, à minha irmã, Raquel Morado, por amavelmente ter desenhado a imagem da capa da dissertação.

Aos meus amigos, àqueles que me acompanharam desde o início até ao fim, um obrigado. Em especial, à minha Barrocas que me acolheu na sua “família” de Coimbra, à Caty que mesmo estando longe está sempre perto do coração e à Dina, que me ajudou a construir o mapa dos locais de estudo e me deu uma força extra de motivação.

Não quero acabar sem agradecer ao meu confidente, aquele que me ouviu, não só, nas horas de desespero, mas, também, nas horas de alegria, aquele que me deu na cabeça e puxou por mim para que nunca desistisse... aquele que me faz feliz, o meu nano, Marco Andrade.

Índice

Resumo	7
Abstract	8
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	10
1. Introdução	11
1.1 Conceito de mutualismo	12
1.1.1 Mutualismo de limpeza	12
1.1.2 Evolução dos mutualismos de limpeza	14
1.1.3. Impacto ecológico das interações de limpeza	15
1.1.4 Peixes limpadores – Algumas generalizações	17
1.2 Espécie de estudo	18
1.3 Caracterização da área de estudo	18
1.4 Enquadramento e Objetivos do Estudo	20
2. Materiais e Métodos	21
2.1 Área de estudo	22
2.2 Observações comportamentais do limpador facultativo <i>C. exoletus</i>	23
2.3 Níveis de emergência parasitária	24
2.4 Carga ectoparasitária das espécies de peixes cliente	25
2.5 Análise dos conteúdos estomacais	26
2.6 Análise Estatística	26
3. Resultados	29
3.1 Descrição comportamental do limpador	30

3.2 Níveis de emergência parasitária	33
3.3 Carga ectoparasitária das espécies de peixes cliente	35
3.4 Composição da dieta do limpador	37
4. Discussão	40
4.1 Descrição comportamental do limpador	41
4.2 Níveis de emergência de gnatídeos	43
4.3 Carga ectoparasitária das espécies de peixes cliente	44
4.4 Composição da dieta do limpador	45
5. Conclusões	47
6. Referências Bibliográficas	49

Resumo

Mutualismos de limpeza no meio marinho têm sido vistos como um exemplo clássico de cooperação mutualística. Este fenômeno ocorre mundialmente. No entanto, estudos de interações de limpeza em regiões temperadas são escassos, em comparação com os estudos já realizados nos trópicos. Pouco se conhece sobre a ecologia e etologia dos limpadores do Atlântico Nordeste, em especial na costa portuguesa. O labrídeo *Centrolabrus exoletus* é um limpador facultativo presente nestas águas. Assim, os principais objetivos deste estudo centraram-se em analisar os comportamentos da espécie durante as interações de limpeza e determinar a relevância destas interações na dieta global destes limpadores, confirmando a sua dependência, ou não, em elementos parasíticos. Para tal, 1) foram feitas observações focais à espécie *C. exoletus*, 2) foi calculada a emergência parasitária da área de estudo, 3) foram identificados os parasitas recolhidos da pele de peixes cliente e, por fim, 4) foram analisados, também, os itens alimentares encontrados nos conteúdos estomacais dos peixes limpadores.

Os resultados deste estudo mostram que o papel ecológico desta espécie é de grande importância no ecossistema, particularmente, da costa algarvia, pois constatou-se que a parasitação da comunidade piscícola é real e que, ao contrário da maior parte dos labrídeos, esta espécie tem uma preferência pela ingestão de parasitas da família Gnathiidae, ao invés, de muco e escama. No final foi, também, possível, contribuir com informação para o controlo biológico de infestações parasitárias, em pisciculturas de salmão da Europa do Norte, como alternativa à utilização de pesticidas e vacinação.

Palavras-Chave: Mutualismos de limpeza, peixes limpadores, *Centrolabrus exoletus*, observações comportamentais, emergência parasitária, ectoparasitas, gnatídeos, conteúdos estomacais.

Abstract

Cleaning mutualisms in the marine environment have been seen as a classic example of mutualistic cooperation. This phenomenon occurs worldwide. However, studies of cleaning interactions in temperate regions are scarce, compared with the previous studies in the tropics. Little is known about the ecology and ethology of the North-East Atlantic cleaners, especially on the Portuguese coast. The cleaner wrasse *Centrolabrus exoletus* is a facultative cleaner present in these waters. Thus, the main objectives of this study focused on analyzing the behaviour of the species during cleaning interactions and determine the relevance of these interactions in the overall diet of these cleaners, confirming its dependence, or not, in parasitic elements. To this end, it was made 1) focal observations to *C. exoletus*, 2) parasite emergence was calculated for the study area, 3) parasites from the clients fish skin were identified and, finally, 3) food items found in the stomach contents of the cleaners were analyzed.

The results of this study shows the great importance of the ecological role of this species in the ecosystem, particularly in the Algarve coast, for that was found that the parasitization of the fish community is real and also, unlike most wrasses, this species has a preference for the intake of Gnathiidae parasites, instead of mucus or scales. In the end, it was also possible to contribute with information for the biological control of parasitic infestations in salmon fish farms in northern Europe as an alternative to pesticide use and vaccination.

Keys words: Cleaning mutualisms, cleaners, *Centrolabrus exoletus*, behavioural observations, parasitic emergence, ectoparasites, gnathiids, stomach content.

Índice de Figuras

Figura 1 – Mapa das áreas de estudo.

Figura 2 – Número de interações com jolt (a) e sem jolt (b) em função do tempo de interação.

Figura 3 – Número médio (\pm EP) de isópodes Gnathiidae encontrados nas armadilhas de emergência parasitária nos três diferentes momentos de amostragem: 30-Julho-2015, 30-Setembro-2015 e 02-Dezembro-2015.

Figura 4 – Frequência de isópodes Gnathiidae encontrados na superfície corporal dos peixes cliente. O diagrama em caixa inclui o 1º e 3º quartil (percentil 25 e percentil 75, respectivamente). A linha central representa a mediana.

Figura 5 – Número médio (\pm EP) de isópodes Gnathiidae e tempo médio de interação (s) em função das espécies cliente. As barras em cinzento correspondem ao número de gnatídeos e os pontos a vermelho correspondem ao tempo de interação.

Figura 6 – Representação média (\pm EP) da (a) abundância dos itens alimentares e b) frequência de ocorrência na composição da dieta dos limpadores *C. exoletus* (n = 20).

Figura 7 – Representação gráfica da análise das coordenadas principais, com indicação das distribuições dos itens alimentares pelas duas dimensões resultantes da PCoA.

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Descrição dos comportamentos observados.

Tabela 2 – Número total (N) e respectiva percentagem (%) de interações de limpeza de cada espécie cliente com o limpador *Centrolabrus exoletus*.

Tabela 3 – Número total (N) e percentagem (%) correspondente às posições de solicitação para cada espécie cliente.

Tabela 4 – Número de interações resultantes em jolt, frequência de jolts, frequência de jolts por minuto, número total de castigos e percentagem de castigos, por espécie cliente.

Tabela 5 – Média (\pm DP) de gnatídeos presentes nas armadilhas de emergência, nos conteúdos estomacais dos limpadores, na superfície da pele dos clientes e o número médio (\pm DP) de interações por observação, em função dos meses de estudo. Os valores marcados com asterisco (*) simbolizam apenas uma ocorrência.

1. Introdução

1.1 O conceito de Mutualismo

Os seres vivos mantêm entre si vários tipos de interações sócio-ecológicas. Na maior parte das interações como a predação, o parasitismo ou o comensalismo, apenas uma das partes envolvidas é beneficiada (Brown *et al.*, 2012). No entanto, interações mutualísticas podem ser brevemente definidas como relações reciprocamente benéficas entre espécies diferentes (Herre *et al.*, 1999). Casos de mutualismo podem originar-se quando cada uma das partes investe reciprocamente na outra. O investimento é um processo que beneficia o recetor, mas implica custos para o emissor. Os benefícios terão de prevalecer sobre os custos do investimento para que possa ser considerada uma interação mutualística (Connor, 1995). Um bom exemplo deste tipo de interações de cooperação entre espécies diferentes é o caso entre a lagarta *Jalmenus evagoras* e as formigas pertencentes ao género *Iridomyrmex* spp. Estas lagartas, na fase de pupa, secretam substâncias ricas em aminoácidos, produzidas por glândulas especializadas, que servem de alimento às formigas. Por sua vez, estas oferecem proteção agressiva contra ameaças exteriores, como vespas parasitoides, aranhas ou outros insetos pertencentes à família Reduviidae (Kitching, 1999).

1.1.1 Mutualismo de limpeza

Mutualismos de limpeza são relações interespecíficas que tanto ocorrem em meio marinho como em meio terrestre. Em 1918, William Longley observou peixes da espécie *Gobiosoma oceanops* limpando outros grandes peixes, nas águas tropicais das Caraíbas. Longley viria a ser um dos primeiros a descrever uma interação de limpeza, em meio marinho. Os participantes nestas interações marinhas podem incluir várias espécies de peixes e crustáceos de pequeno porte, conhecidos como limpadores. Estes removem parasitas, tecidos infetados, ou feridos, da superfície do corpo, cavidade bucal e brânquias de outros indivíduos, conhecidos como clientes (Losey, 1987).

Nos ambientes de recifes tropicais, várias espécies de limpadores mantêm estações de limpeza - pequenos territórios confinados, localizados em rochas ou em colónias de coral, onde ocorrem as interações de limpeza (Potts, 1968). Quando um cliente visita uma estação de limpeza, este adota uma postura que sinaliza a vontade de iniciar a interação (Côté *et al.*, 1998). Esta postura de solicitação, normalmente, com

inclinação do corpo com cabeça para cima ou para baixo e com as barbatanas eretas chamam a atenção do limpador, porém, varia entre espécies (Côté *et al.*, 1998). Este, por sua vez, inicia um comportamento de inspeção que inclui nadar junto do cliente, orientando-se para ele, contactando-o com a boca (Feder, 1966). Não apenas os clientes, mas também os limpadores, podem iniciar as interações de limpeza (Potts, 1968). Por fim, através de movimentos rápidos que sacodem o limpador (conhecidos como jolts), o cliente pode indicar que quer finalizar a interação, acabando por se afastar (Côté & Soares, 2011). Também o limpador pode escolher acabar a limpeza, simplesmente por se afastar em direção a outro cliente (Potts, 1973a).

As posturas invulgares de solicitação dos clientes, as barbatanas eretas e até mesmo mudanças na coloração, bem como os padrões de natação, tanto de clientes como de limpadores, são sinais fundamentais à comunicação entre os indivíduos e favorecem a iniciação, manutenção e finalização das interações (Losey & Margules, 1974). Na teoria, a ocorrência de fenômenos de predação, no contexto destas relações interespecíficas, têm baixa probabilidade, no entanto, na prática, para assegurar um bom desenvolvimento e reduzir ainda mais o risco de predação, os limpadores fornecem estimulação tátil aos seus clientes predadores, através do toque pelas barbatanas pélvicas e/ou caudais (Grutter, 2004). Este estímulo diminui os níveis de *stress* do cliente e permitem que a duração da interação seja maior (Soares *et al.*, 2011).

No decorrer das interações de limpeza, os limpadores têm acesso a ectoparasitas, mas também, a outros elementos da pele dos clientes. Na dieta dos limpadores podem ser encontrados escamas, muco e pele pertencentes aos seus clientes, adicionalmente aos ectoparasitas (Côté & Soares, 2011). A ingestão destes elementos (comportamento conhecido como batota - Bshary & Grutter 2002) é pouco benéfica para os clientes, já que, por exemplo, o muco protege os animais contra doenças e queimaduras solares (Ebran *et al.*, 1999). Logo, os clientes tendem a reagir negativamente, castigando os limpadores: terminando de imediato a interação ou mesmo punindo-os com perseguição agressiva (Bshary & Grutter, 2005). Para além desta reação, a batota pode ser quantificada em jolts - rápida contração muscular ou abanão do cliente – que sinaliza dor pela remoção de escamas ou muco (Soares *et al.*, 2008a).

As associações de limpeza têm sido bem descritas para limpadores obrigatórios tropicais onde a espécie em foco é, maioritariamente, a *Labroides dimidiatus*, bem como, os góbios limpadores das Caraíbas como, o *Elacatinus* spp. No entanto, poucos têm sido os estudos focados em limpadores facultativos de águas temperadas (Narvaez *et al.*, 2015).

1.1.2 Evolução dos mutualismos de limpeza

As interações de limpeza podem ser tratadas como verdadeiros casos de mutualismo, já que ambas as partes envolvidas se beneficiam: o cliente mantém-se saudável através da remoção de ectoparasitas e tecido morto e, o limpador ganha alimento (Côté, 2000). No entanto, a real natureza destas interações pode flutuar entre um carácter de mutualismo, comensalismo e até mesmo de parasitismo (Johnstone & Bshary, 2002). Estes aspetos envolvem a compreensão da origem e evolução dos comportamentos que terão modelado as interações de limpeza.

Hobson, em 1971, propôs que o acesso à superfície do corpo de um peixe e a consequente remoção de ectoparasitas resultou de uma atividade accidental durante a rotina de alimentação de peixes que picam o substrato ou o plâncton livre na coluna de água. Estes peixes, conhecidos como *pickers*, têm focinhos alongados e bocas pequenas com dentes projetados destinados a selecionar e remover pequenas presas de locais onde, de outra forma, estariam inacessíveis (Hobson, 1968). As suas características anatómicas tornam possível, também, a remoção de ectoparasitas de peixes maiores. Deste modo, peixes que estariam adaptados a alimentarem-se no substrato ou do plâncton serviriam de percursos evolutivos e desenvolveriam respostas simbióticas apropriadas e destinadas a maximizar o valor adaptativo da simbiose.

Alternativamente, Losey, em 1979, sugere que a simbiose de limpeza resultaria de um reforço positivo causado pela estimulação táctil. Acrescenta que, os percursos dos atuais limpadores seriam peixes que, ocasionalmente, se alimentariam de muco e escamas da pele de outros peixes. Estes percursos teriam explorado a tendência nos seus clientes para responderem a estímulos tácteis. Este fato permitiria que os limpadores tivessem acesso garantido à sua fonte de alimento, até à descoberta dos ectoparasitas, recurso de elevado valor calórico (Grutter, 1999) mas menos estável e

fiável que as escamas ou tecidos (Losey, 1972a). No entanto, a remoção deste material não parasítico tem impactos negativos nos clientes havendo que contabilizar custos. Neste caso, a interação tratar-se-ia de uma forma de comensalismo ou mesmo parasitismo. Por outro lado, se a taxa de parasitas na superfície do corpo dos clientes fosse maior e se os limpadores preferissem comer parasitas então, tratar-se-ia de um verdadeiro mutualismo (Losey, 1972b).

Vários estudos suportam a teoria de Losey (1979). Côté & Soares, em 2011, destacam que a alimentação dos limpadores inclui ectoparasitas mas também muco, escamas e tecidos saudáveis. Poulin & Grutter (1996) e Johnstone & Bshary (2002) afirmam que a remoção de material não parasita tem impactos negativos nos clientes. Grutter (2004) e Soares *et al.* (2011) enumeram as vantagens da estimulação táctil, sendo a principal vantagem a redução dos níveis de *stress* dos clientes. Por fim, Cheney & Côté (2005) relacionam a taxa de ectoparasitas dos clientes com o tipo de interação que ocorre.

Atualmente sabe-se que, a maioria dos limpadores têm preferência por ectoparasitas, ao invés de muco (Soares *et al.*, 2008a). Com exceção do género *Labroides* e, em especial, a espécie *L. dimidiatus*, que preferem muco a parasitas (Grutter & Bshary 2003), as restantes espécies só removem muco quando as quantidades de ectoparasitas diminuem (Soares *et al.*, 2008b).

1.1.3 Impacto ecológico das interações de limpeza

As, cerca de, 70000 espécies de parasitas, que vivem na superfície da pele dos hospedeiros, estão distribuídas em cinco filos e podem infestar tanto vertebrados como invertebrados terrestres, aquáticos ou marinhos (Poulin, 2007). Entre os ectoparasitas artrópodes, cerca de 14000 espécies, alimentam-se quase exclusivamente de sangue de vertebrados (Graca-Souza *et al.*, 2006). De entre os ectoparasitas que infestam peixes marinhos, os mais bem estudados são, provavelmente, os isópodes da família Gnathiidae (Coile & Sikkell, 2013). Os gnatídeos alimentam-se de sangue, linfa ou muco dos seus peixes hospedeiros (Smith & Davies, 2004). Estes isópodes são parasíticos apenas nas suas três fases larvares, já que em adultos não se alimentam (Smit & Davies, 2004; Tanaka, 2007). O seu ciclo de vida, especialmente particular, inclui emergir do substrato e usar armaduras bocais perfuradoras, para penetrar a pele e brânquias dos

seus hospedeiros, permitindo que se alimentem do sangue e tecido. No final, retornam ao substrato para digerir o alimento e sofrerem a muda da próxima fase do seu ciclo de vida (Tanaka & Aoki, 1998; Smit & Davies 2004). Apesar da sua larga distribuição, os gnatídeos são reportados, maioritariamente, nas águas amenas temperadas e tropicais, sendo que são um dos mais comuns ectoparasitas de peixes de recife (Grutter, 1994; Grutter & Poulin, 1998) e, portanto, um dos principais recursos alimentares dos limpadores (Côté, 2000; Grutter, 2002).

Para além dos gnatídeos, os crustáceos pertencentes à família Caligidae são parasitas, igualmente importantes, em infestações parasitárias de alguns peixes. No Atlântico Norte, a espécie *Lepeophtheirus salmonis* está frequentemente presente em aquaculturas de salmonídeos (Johnson *et al.*, 2010) enquanto que, o género *Caligus* spp. são bem documentados por serem parasitas generalistas e encontrados em mais de 80 espécies de peixe no mundo. (Kabata, 2003). A fase do ciclo de vida infetante deste parasita inicia-se na terceira fase larvar do seu ciclo de vida, até ao estado adulto, sendo que estes andam livremente na superfície da água até ao encontro de um hospedeiro (Costello, 2006).

Randall, em 1962, comprovou, através da análise de conteúdos estomacais, que os peixes limpadores removiam, de facto, ectoparasitas. As infestações parasitárias apresentam custos significativos nos hospedeiros podendo afetar negativamente: 1) a sua fisiologia onde, por exemplo, foram encontradas diferenças na expressão de serotonina e dopamina em peixes infetados (Shaw *et al.*, 2009); 2) o comportamento onde, por exemplo, a orientação migratória pode ser influenciada (Garnick & Margolis, 1990); e 3) a morfologia onde, por exemplo, a visão dos hospedeiros pode ser comprometida (Seppälä *et al.*, 2004), pelo que estas interações mostram-se importantes no controlo da saúde das populações (Grutter, 1999). Para além deste impacto nos hospedeiros, as associações de limpeza podem afetar a estrutura das comunidades. A diversidade, abundância e distribuição dos peixes em recifes de coral são, segundo Slobodkin & Fishelson (1974), determinadas pela presença de limpadores e suas estações de limpeza. Estudos mais recentes apoiam esta teoria (Grutter *et al.*, 2003; Waldie *et al.*, 2011).

1.1.4 Peixes Limpadores – Algumas generalizações

De acordo com Van Tassel *et al.* (1994) e Côté (2000) estão documentadas cerca de 112 espécies de peixes limpadores num total de 29 famílias, sendo as principais as famílias Labridae e Gobiidae.

As interações de limpeza entre peixes são um fenómeno de ocorrência global, particularmente conhecido nos trópicos de meio marinho. Aqui, os exemplos de limpeza entre peixes tropicais são frequentes. As espécies mais relevantes são do género *Labroides* (Randall *et al.*, 1990) no Indo-Pacífico e *Elacatinus*, no Atlântico tropical. Também, na costa Californiana e nas águas temperadas da Nova Zelândia estão descritas algumas espécies que fazem limpeza (Ayling & Grace, 1971; Hobson, 1971). No Atlântico Europeu, o labrídeo *Centrolabrus exoletus* está envolvido em comportamentos de limpeza nas águas da costa da Península Ibérica (Galeote & Otero, 1998; Henriques & Almada, 1997), bem como, também, as espécies *Thalassoma pavo* e *Coris julis*, observadas em interações de limpeza no arquipélago dos Açores (Narvaez *et al.*, 2015)

Os peixes limpadores podem ser caracterizados como limpadores obrigatórios, se durante todo o seu ciclo de vida, desde da fase juvenil até à fase adulta, forem dependentes das interações de limpeza, ou limpadores facultativos, se dependerem destas interações apenas numa fase da vida (Limbaugh, 1961), normalmente, na fase juvenil. Limpadores facultativos utilizam, também, outros recursos alimentares, nomeadamente, com origem no plâncton ou no bentos (Henriques & Almada, 1997). Por outro lado, os limpadores obrigatórios mostram uma maior dependência nos itens parasitários (Côté, 2000). Com exceção da espécie *Symphodus melanocerus*, em ambientes temperados são apenas conhecidos limpadores facultativos, muito provavelmente, devido ao fato destas condições ambientais serem menos propícias ao desenvolvimento de um maior número de parasitas, o que influenciará a dependência por elementos parasíticos (Ayling & Grace, 1971). O estudo da dieta dos limpadores pode ajudar a determinar e a perceber as relações entre os limpadores e os seus peixes cliente através dos itens, parasíticos ou não, consumidos (Losey 1974).

1.2 Espécie de Estudo

Centrolabrus exoletus (Linnaeus, 1758) é um labrídeo europeu que varia entre os 12 a 13cm de comprimento podendo alcançar um máximo de 18cm. Esta espécie habita águas costeiras de substrato rochoso. A sua distribuição geográfica estende-se pelo nordeste Atlântico, desde da Noruega até Portugal, ocorrendo, também, no sul de Espanha (Quignard & Pras, 1986; Henriques & Almada, 1997; Galeote & Otero, 1998). A primeira interação de limpeza observada com esta espécie foi registada por Potts, em 1973b, nas águas do sul da Inglaterra. Este labrídeo é um limpador facultativo pois a alimentação de material proveniente da superfície do corpo de outros peixes não é o recurso dominante na sua rotina alimentar, em todo o seu ciclo de vida (Henriques & Almada, 1997). A dieta varia, predominantemente, entre organismos bentónicos, desde copépodes a larvas de isópodes, até fragmentos de algas. Existem também relatos da presença de escamas e muco encontrados nos seus conteúdos estomacais (Galeote & Otero, 1998). Os limpadores *C. exoletus* não parecem estabelecer estações de limpeza. Em vez disso, procuram, sozinhos ou em grupos de três a oito indivíduos, peixes que queiram ser limpos (Galeote & Otero, 1998). As interações de limpeza envolvendo esta espécie são eventos regulares durante todo o ano, embora haja uma ligeira sazonalidade com pico nos meses de verão (Galeote & Otero, 1998), podendo esta estar associada a flutuações na emergência parasitária.

1.3 Caracterização da área de estudo

O Algarve no Panorama Geral

O Algarve constitui a região mais a sul de Portugal continental sendo delimitada por três barreiras naturais: a norte um sistema montanhoso, a oeste e a sul o mar e a leste o Guadiana a desenhar a fronteira com a Espanha. Coincidindo perfeitamente com o distrito de Faro, este território tem uma área de pouco mais de 540.000ha (Gaspar & Pinto, 2012).

A serra algarvia serve de barreira às influências setentrionais bem como reforça as características do clima mediterrânico: invernos que tendem a ser amenos e húmidos

e verões longos, quentes e secos. No entanto, a variabilidade climática pode oscilar em função da influência atlântica e da altitude. A província do Algarve está dividida em dois sectores: O barlavento (sector ocidental do Algarve) e o sotavento (sector oriental do Algarve). O barlavento caracteriza-se por um ambiente mais ameno, influenciado pela ação reguladora do atlântico. Por sua vez, o sotavento é mais árido e quente (Ribeiro *et al.*, 1987).

Os cerca de 160km que percorrem a costa sul, entre São Vicente e Vila Real de Santo António, são marcados pela diversidade litológica. Aqui são frequentes os leixões, arcos, grutas marinhas e pequenas enseadas que foram sendo intensamente esculpidas pelas águas doces e salgadas (Alveirinho Dias, 1988).

O Ecossistema Marinho do Algarve

Os fundos marinhos da costa sul do Algarve variam entre o rochoso, arenoso e vasoso incluindo acidentes geográficos como baías, cabos, ilhas, leixões, sistemas lagunares e estuários. Estas áreas proporcionam habitats adequados ao abrigo, alimentação, reprodução, desova e crescimento de juvenis de diversas espécies marinhas. Ademais, a posição geográfica da costa algarvia favorece a sua biodiversidade devido à confluência das águas mediterrânicas, atlânticas temperadas e atlânticas tropicais. O afloramento costeiro, particularmente mais intenso no Cabo de São Vicente, reúne também organismos marinhos que se beneficiam da elevada produtividade destas águas, sendo portanto, um fenómeno decisivo para a riqueza biológica (Santos e Erzini, 2007).

O tipo de substrato dominante ao longo da costa acompanha os dois grandes sectores que separam o território algarvio. Embora a costa seja dominada por fundos arenosos, o vasto complexo rochoso ao largo de Albufeira marca a separação do barlavento rochoso e do sotavento mais arenoso, destacando-se aqui apenas alguns núcleos rochosos isolados (Gonçalves *et al.*, 2007, 2008, 2010).

A biodiversidade marinha do Algarve encontrada nas zonas rochosas é composta por algas castanhas, algas vermelhas calcárias, anémonas, briozoários, equinodermes, como o ouriço-do-mar e o pepino-do-mar, gastrópodes, esponjas bem como peixes bentónicos, como os cabozes, ou os demersais como a safia. Nas zonas arenosas

predominam peixes planos bem adaptados aos fundos móveis como a solha ou o linguado. É também comum o avistamento de algumas espécies de mamíferos marinhos como o *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba*, a *Orcinus orca* (Saldanha, 1995; Ferreira, 2011). Quanto à avifauna são mais abundantes os *Morus bassanus* e *Calonectris diomedea* (Ministro, 2012).

1.4 Enquadramento e Objetivos do Estudo

Estudos sobre associações de limpeza têm-se concentrado, maioritariamente, em regiões tropicais, pelo que, pouco se conhece sobre estes comportamentos em regiões temperadas. Tal fato verifica-se, muito provavelmente, devido às diferenças nas condições ambientais, que podem dificultar as observações debaixo de água.

O limpador *Centrolabrus exoletus* já mostrou ser capaz de remover eficazmente ectoparasitas, sendo, por isso, uma espécie importante para o controlo de infestações parasitárias (Bjoldal, 1992; Tully *et al.*, 1995).

Muito pouco se sabe acerca do comportamento das espécies limpadoras em água portuguesas. Henriques & Almada, em 1997, descreveram o comportamento mutualístico de limpeza da espécie *C. exoletus* na reserva marinha da Arrábida, bem como, mais recentemente, Narvaez *et al.*, (2015) confirmou a existência de duas espécies de limpadores (*Coris julis* e *Thalassoma pavo*), no arquipélago do Açores. Deste modo, este estudo ajudará a reunir informação sobre a ecologia e etologia de labrídeos do Atlântico-Nordeste, em especial na costa de Portugal continental.

Os principais objetivos centram-se em analisar os comportamentos da espécie durante as interações de limpeza e determinar a relevância destas interações na dieta global destes limpadores, confirmando a sua dependência, ou não, em elementos parasíticos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Área de estudo

A área de estudo compreende a largura de toda a linha de costa imediatamente em frente à falésia rochosa da Torre de Dentro, entre a praia do Mato e a praia da Grilheira, no concelho de Lagoa, Algarve (37°06'N, 8°30'W), até um máximo de 12m de profundidade.

Também, incluído na área de estudo está todo o raio de 3 metros à volta do Leixão da Gaivota (37°06'N, 8°31'W), que se encontra a 200m da praia dos Caneiros em Lagoa, Algarve. Tem uma altura de 23m e um máximo de 50m de largura. Este Leixão é a mais pequena área classificada como Zona IBA (Área Importante para as Aves e Biodiversidade) e como ZPE (Zona de Proteção Especial) de Portugal. Este rochedo marítimo serve de local de descanso, abrigo e reprodução para espécies como gaivotas, corvos-marinhos, pombos-das-rochas, garças-brancas e garças-boleiras (Costa *et al.*, 2003).

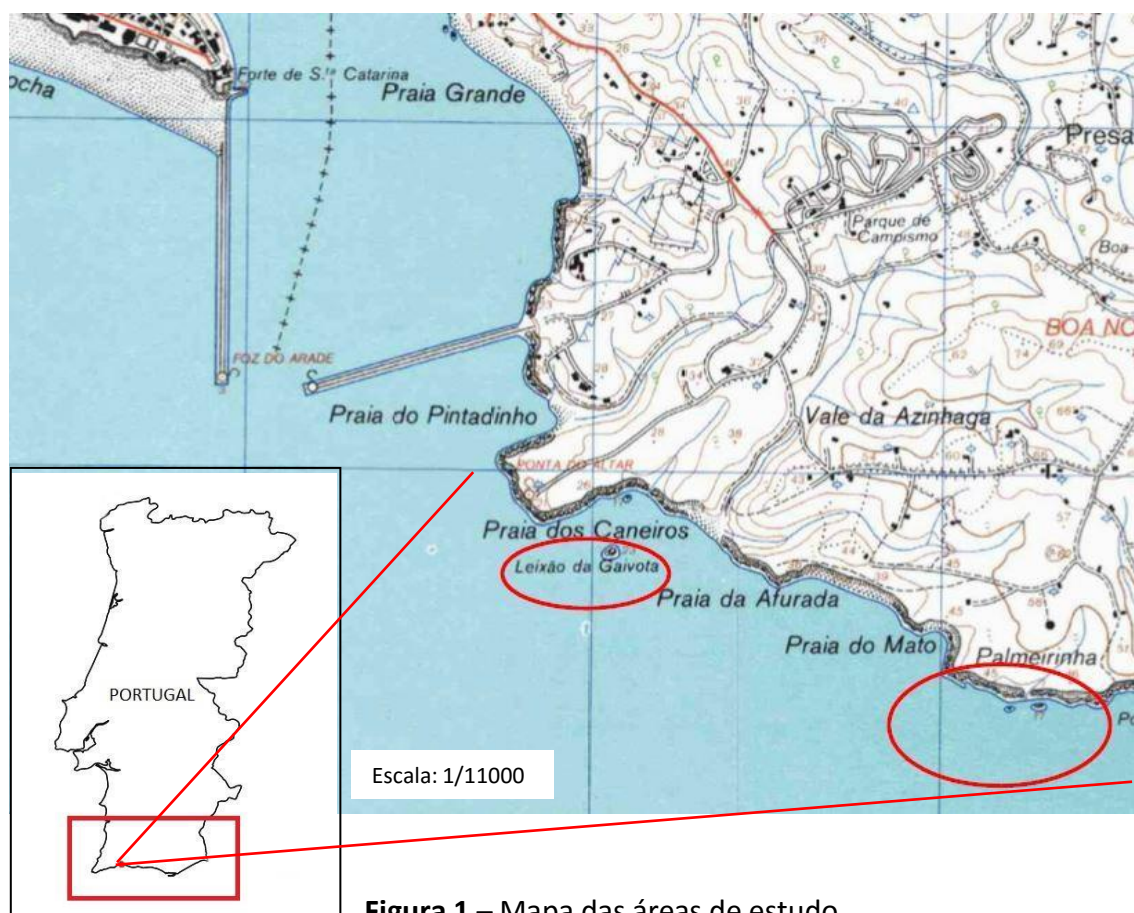


Figura 1 – Mapa das áreas de estudo.

2.2 Observações comportamentais do limpador facultativo *Centrolabrus exoletus*

Os comportamentos mutualísticos de limpeza foram observados focalmente em vinte indivíduos da espécie *Centrolabrus exoletus*, em mergulho com escafandro autónomo, nos dois locais de estudo, em profundidades compreendidas entre os 3m e os 10m. As observações foram feitas durante o período da manhã entre as 09:00h e as 12:00h, perfazendo um total de 450min, e entre os meses de Julho e Dezembro de 2015. Dependendo das condições do mar (corrente, visibilidade e temperatura da água) cada observação teve sempre um mínimo de 20min e um máximo de 30min sendo que a observação só se iniciou após um tempo de habituação ao observador de 2 a 5min, que se mantinha a uma distância de 2m a 5m, e após a primeira limpeza observada (Soares *et al.* 2008). Os comportamentos ocorridos durante as interações mutualísticas do limpador focal foram registados segundo o etograma da Tabela 1, numa ardósia à prova de água. Para além dos comportamentos durante as interações de limpeza, foram também registados a profundidade da observação, as espécies clientes envolvidas nas interações, quem iniciou e quem finalizou a interação (cliente ou limpador), o tempo da observação (em minutos) e o tempo de interação (em segundos), se a interação ocorreu dentro ou fora da estação de limpeza (caso existisse), qual a posição que o cliente adotou durante a interação (cabeça para cima, cabeça para baixo ou horizontal com barbatanas abertas) e o número de toques que o limpador fez à pele do cliente (Narvaez *et al.* 2015).

Tabela 1 – Descrição dos comportamentos observados.

Comportamento	Descrição
Interação de Limpeza	Interação que resulta na remoção de elementos, parasíticos ou não, da pele, boca ou guelras do cliente pelo limpador.
Inspeção	Interação em que o limpador mostra interesse num cliente, nadando orientado para ele à procura de itens alimentares na sua pele.
Batota	Remoção de muco e escamas ao invés de ectoparasitas e tecido morto.
Jolt	Rápida contração muscular ou abanão do cliente, consequente da batota praticada pelo limpador.
Castigo	Perseguição agressiva do cliente ao limpador como consequência da batota praticada pelo limpador.
Rejeição	Interação onde uma das partes (limpador ou cliente) não mostra nenhum interesse na interação de limpeza.

2.3 Níveis de emergência parasitária

Metodologia de campo

Os organismos parasíticos presentes na água foram capturados com armadilhas de emergência a fim de, avaliar os níveis de emergência parasitária. As armadilhas de emergência consistem numa armação de base quadrada feita em tubos de PVC com área de 1m² e uma rede de plâncton de malhagem de 100µm disposta em forma piramidal. À extremidade final da rede foi ligado um funil com uma garrafa de plástico de 1L que, posteriormente, foi enchida com água e ar de modo a atuar como flutuador positivo. Os tubos de PVC foram cheios com areia e lacrados com silicone para que a armadilha se mantivesse junto ao substrato, por ação do seu peso (Sikkel *et al.*, 2004).

As amostras foram recolhidas em três diferentes momentos: 30 de Julho 2015, 30 de Setembro 2015 e 2 de Dezembro 2015. Em cada momento foram colocados 5 replicados aleatoriamente em mergulho de escafandro autónomo, em profundidades que variaram entre os 3 e 5m. Todas as armadilhas foram colocadas entre as 9:00h e as 10:00h. Após 24 horas as garrafas ligadas às armadilhas foram recolhidas depois de

serem brevemente agitadas para que o seu conteúdo ficasse misturado (Chambers & Sikkel, 2002).

Metodologia laboratorial

Depois de recolhidas, as amostras foram filtradas num crivo com malhagem 55µm e preservadas em álcool 70%. Todos os organismos capturados foram observados com uma lupa binocular e separados entre organismos parasíticos e não parasíticos (Chambers & Sikkel, 2002). Os organismos parasíticos foram identificados até à família (Santos & Cavaleiro, 2015) e os organismos não parasíticos foram identificados, sempre que possível, até à classe.

2.4 Carga ectoparasitária das espécies de peixes cliente

Metodologia de campo

No sentido de avaliar a carga de ectoparasitas das espécies cliente, foram capturados dez indivíduos de cinco espécies cliente. As capturas foram feitas em mergulho de escafandro autónomo. O método usado para quantificar ectoparasitas foi similar ao descrito por Soares *et al.* (2007) e baseou-se na condução do “peixe-alvo” até junto de uma rede barreira, colocada estrategicamente entre um corredor de pedras, para que o indivíduo ficasse encurralado. Seguidamente à captura, cada peixe foi colocado individualmente num saco hermético. Esta técnica permitiu a rápida captura dos peixes para que houvesse o mínimo de perdas de ectoparasitas, já que os diferentes métodos de captura podem influenciar o número de parasitas encontrados na superfície do corpo dos hospedeiros (Sikkel *et al.*, 2004; Grutter, 1995, 1999). Devido à logística envolvida na captura dos clientes, não foi possível devolver os indivíduos ao mar. Assim, depois de capturados, os clientes foram trazidos para a superfície e levados para terra. Neste momento, o primeiro passo foi colocar o peixe num recipiente com água doce onde, então, seria escovado suavemente com um pincel. De seguida, a água salgada presente no saco hermético foi filtrada. Após esta filtragem, também a água doce foi filtrada. Finalmente, o peixe foi identificado e medido (comprimento total com aproximação de 0.1cm). O conteúdo das duas filtragens (feitas num crivo de 55µm) foi preservado num frasco em álcool 70%, para futura análise em laboratório.

Este processo foi repetido individualmente para cada peixe cliente capturado.

As capturas de clientes foram feitas sempre entre as 9:00h e as 12:00h e abrangeram os meses de Setembro de 2015 a Março de 2016.

Metodologia laboratorial

Com a ajuda de uma lupa binocular, os organismos parasíticos foram separados do resto dos itens presentes na amostra. Posteriormente, os ectoparasitas foram identificados até à família (Santos & Cavaleiro, 2015). No final, os ectoparasitas voltaram a ser preservados no frasco com álcool 70%.

2.4 Análise dos conteúdos estomacais

Metodologia de campo

Para proceder à análise dos conteúdos estomacais da espécie limpadora foram capturados vinte indivíduos escolhidos de forma aleatória. No entanto, só foram capturados indivíduos que, momentos antes, tinham demonstrado comportamentos de limpeza.

O processo de captura foi idêntico à captura dos peixes clientes, anteriormente descrito, onde uma rede barreira foi colocada, em mergulho de escafandro autónomo, estrategicamente entre um corredor de pedras de modo a encurralar o peixe alvo. Seguidamente à captura, o indivíduo foi colocado num saco hermético, trazido para a superfície e colocado num frasco com álcool 70% para que a sua digestão fosse interrompida (Soares *et al.* 2008).

As capturas de limpadores foram feitas sempre entre as 9:00h e as 12:00h e abrangeram os meses de Setembro de 2015 a Março de 2016.

Metodologia de laboratório

No laboratório, o primeiro passo foi medir (comprimento total com aproximação de 0.1cm) e pesar os indivíduos, com e sem as vísceras (com aproximação 0.001g) (Narvaez *et al.* 2015). De seguida, os tratos digestivos dos limpadores foram removidos e conservados em frascos com álcool 70%. Com a ajuda de uma lupa binocular, procedeu-se à triagem dos itens presentes nos conteúdos estomacais por grandes grupos taxonómicos: gastrópodes, crustáceos, bivalves, anfípodes, copépodes livres,

algas e grãos de areia, bem como parasitas e escamas. Após esta primeira triagem estar concluída foram identificados e contados todos os itens alimentares até ao nível taxonómico mais baixo possível (Soares *et al.* 2008; Narvaez *et al.* 2015; Santos & Cavaleiro, 2015).

2.3 Análise Estatística

Todas as observações comportamentais foram estimadas para uma unidade de tempo de vinte minutos, para que fosse possível comparar todos os dados de igual modo.

O número de jolts dos clientes observados (padronizados por 1min de interação), bem como o número de castigos ao limpador foram contabilizados por espécie cliente. O tempo decorrido em interações com e sem jolt foi avaliado através de uma análise de variância univariada. A homogeneidade das variâncias foi previamente verificada através do teste de Levene. Para a variável dependente foi usado o tempo de interação e para os fatores fixos foram a ocorrência, ou não, de jolt e as espécies cliente que, neste caso, foram apenas consideradas as quatro espécies com mais interações com o limpador.

A fim de averiguar diferenças significativas na abundância de gnatídeos nos três diferentes períodos de amostragem, foi feito um modelo linear generalizado usando um modelo com distribuição de probabilidade Poisson e transformação logarítmica. O número de parasitas foi usado como variável dependente e os três momentos de amostragem como fator.

O tamanho (comprimento total) dos indivíduos de cada espécie cliente capturada e o número de ectoparasitas foi também analisado com um modelo linear generalizado usando um modelo com distribuição de probabilidade Poisson e transformação logarítmica. O número de gnatídeos foi usado como variável dependente, o tamanho dos indivíduos foi usado como covariável e as espécies cliente como fator. Para este teste foram apenas incluídos os dados das espécies clientes capturadas com parasitas da família Gnathiidae.

O teste Man-Whitney U foi aplicado para comparar o número de parasitas e o número de interações (variáveis de teste) entre duas espécies cliente (variável de agrupamento).

Ademais, o número de parasitas presentes nos conteúdos estomacais dos limpadores foi testado com o tamanho dos limpadores com uma regressão linear simples usando o número de gnatídeos como variável dependente e o tamanho dos indivíduos como variável independente. Também o número de escamas foi testado com o tamanho dos limpadores com o coeficiente de correlação de Spearman.

De modo a conhecer qual dos itens alimentares explicam mais a variação na dieta dos limpadores, foi feita uma análise de coordenadas principais (PCoA). Esta análise usa a similaridade entre amostras para criar uma representação no espaço que facilita a visualização das diferenças encontradas. A matriz usada para a escala multidimensional de proximidade (PROXSCAL) foi composta por todos os grupos de itens alimentares encontrados nos conteúdos estomacais dos limpadores. As medições foram baseadas em contagens (medida qui-quadrado) e as proximidades transformadas em intervalo. O gráfico de *stress* mostrou a utilização de apenas duas dimensões.

O grau de significância estatística foi de $p < 0.05$ para todos os testes. Todas as variáveis usadas foram testadas para a normalidade da sua distribuição.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software IBM SPSS Statistic[®] 22.0 para Windows.

3. Resultados

3.1 Descrição comportamental do limpador.

De um modo geral, os limpadores encontravam-se perto de zonas rochosas, como grandes lajes de pedra com cavidades, onde mantinham as interações de limpeza. No entanto, não é possível afirmar com certeza que se tratariam de estações de limpeza pois muitas vezes o limpador não hesitava em abandonar esta zona, nadando livremente. Contudo, foram registadas seis observações a limpadores que mantiveram, claramente, uma estação de limpeza, isto é, onde os limpadores nunca se ausentaram da zona e sendo dos clientes a iniciativa de se aproximarem numa posição de solicitação. Das restantes observações, oito limpadores tiveram interações de limpeza oportunistas, isto é, em natação livre encontraram os seus clientes e as interações de limpeza foram feitas na coluna de água.

No total foram contabilizadas 197 interações, na qual, 176 foram interações de limpeza e 21 inspeções (ver Tabela 1). Quanto às rejeições, por parte dos clientes, a espécie *Coris julis* foi a que rejeitou mais interações de limpeza, com 4 rejeições de um total de 10. A espécie que somou mais rejeições pelo limpador foi a *Symphodus bailloni* com 28 rejeições de um total de 50. Em média (\pm EP) foram observadas 8.80 ± 0.76 interações por unidade de vinte minutos de observação. Os limpadores interagiram com um total de oito espécies cliente incluindo uma espécie piscívora, a *Serranus cabrilla*. A espécie *S. bailloni* foi a que interagiu mais vezes com o limpador com 32.9% do total de interações observadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Número total (N) e respetiva percentagem (%) de interações de limpeza de cada espécie cliente com o limpador *Centrolabrus exoletus*.

Espécie Cliente	N	%
<i>Symphodus bailloni</i>	58	32.9
<i>Symphodus melops</i>	37	21.0
<i>Coris julis</i>	35	19.8
<i>Labrus merula</i>	18	10.2
<i>Ctenolabrus rupestris</i>	18	10.2
<i>Serranus cabrilla</i>	4	2.2
<i>Diplodus vulgaris</i>	4	2.2
<i>Chromis chromis</i>	2	1.1

As interações de limpeza foram, maioritariamente, iniciadas pelos clientes (61.3% das ocorrências), na qual, 62.5% dos indivíduos posaram verticalmente de cabeça para cima. A espécie *S. bailloni* deteve 40.7% do total de interações iniciadas por clientes e a *C. julis* foi a espécie com a qual os limpadores iniciaram mais interações (39.7% do total de interações iniciadas pelos limpadores). Por outro lado, foram os limpadores que finalizaram um maior número de interações (65.9% das ocorrências). É de notar que, no que diz respeito à finalização das interações, os limpadores terminaram um maior número de interações com a espécie *S. bailloni* (39.6% do total de interações finalizadas pelos limpadores), contrariamente aos indivíduos da espécie *C. julis* que terminaram mais interações com o limpador (30.0% do total de interações finalizadas pelos clientes). Outras posições de solicitação foram também registadas, nomeadamente, posição vertical de cabeça para baixo (3.4% do total de interações) e posição horizontal com barbatanas peitorais abertas e barbatanas dorsais, anais e pélvicas estendidas (33.5% do total de interações). Para além destas duas posições, houve uma ocorrência onde o limpador manteve uma interação de limpeza em movimento (correspondente a 1.1% do total de interações) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número total (N) e percentagem (%) correspondente às posições de solicitação para cada espécie cliente.

Espécie Cliente	Posição corporal						Em Movimento	
	Cabeça Baixo		Cabeça Cima		Horizontal		N	%
	N	%	N	%	N	%		
<i>Symphodus bailloni</i>	0	-	55	94.83	3	5.17	0	-
<i>Symphodus melops</i>	1	2.70	33	89.19	3	8.11	0	-
<i>Coris julis</i>	0	-	11	31.43	24	68.57	0	-
<i>Ctenolabrus rupestris</i>	1	5.56	2	11.11	15	83.33	0	-
<i>Labrus merula</i>	4	22.22	8	44.44	5	27.78	1	5.56
<i>Chormis chromis</i>	0	-	1	50.00	1	50.00	0	-
<i>Serranus cabrilla</i>	0	-	0	-	4	100.00	0	-
<i>Diplodus vulgaris</i>	0	-	0	-	4	100.00	0	-

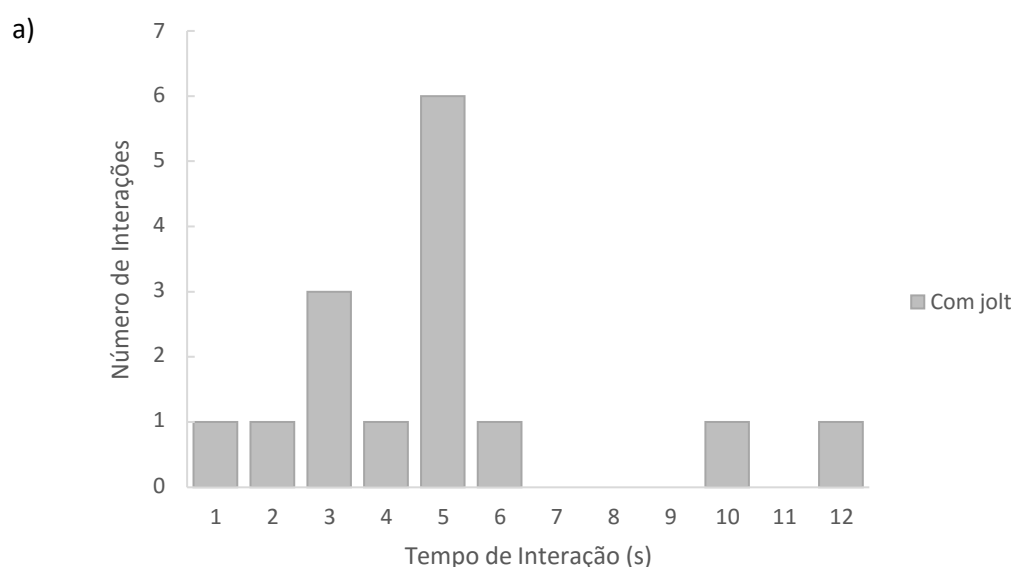
Das 176 interações observadas, 15 resultaram em jolt por parte dos clientes (8.52% do total de interações). A espécie *Symphodus melops* foi o cliente que

apresentou um maior número de jolts por minuto, 3.66 jolts/min. Somente as espécies *S. melops*, *S. bailloni* e *Labrus merula* reagiram à batota dos limpadores pondo fim à interação de limpeza ou perseguindo o limpador em causa como forma de castigo (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de interações resultantes em jolt, frequência de jolts, frequência de jolts por minuto, número total de castigos e percentagem de castigos, por espécie cliente.

Espécie Cliente	N Interações	N Jolt	Jolt/min	N Castigo	Castigo (%)
<i>Ctenolabrus rupestris</i>	1	2	2.03	0	0
<i>Coris julis</i>	1	1	0.51	0	0
<i>Labrus merula</i>	2	2	1.58	1	50
<i>Symphodus bailloni</i>	3	3	0.98	3	100
<i>Symphodus melops</i>	8	10	3.66	4	40

A duração das interações foi significativamente diferente ($F = 2.532$, $p = 0.048$, $gl = 3$) consoante tenha ou não ocorrido jolt, tendo as interações onde ocorreu jolt uma duração maior (Figura 1a), comparativamente, com as interações onde não ocorreu jolt (Figura 1b). Além disto, o tempo de interação revelou uma tendência não significativa para variar entre espécies ($F = 3.981$, $p = 0.059$, $gl = 1$)



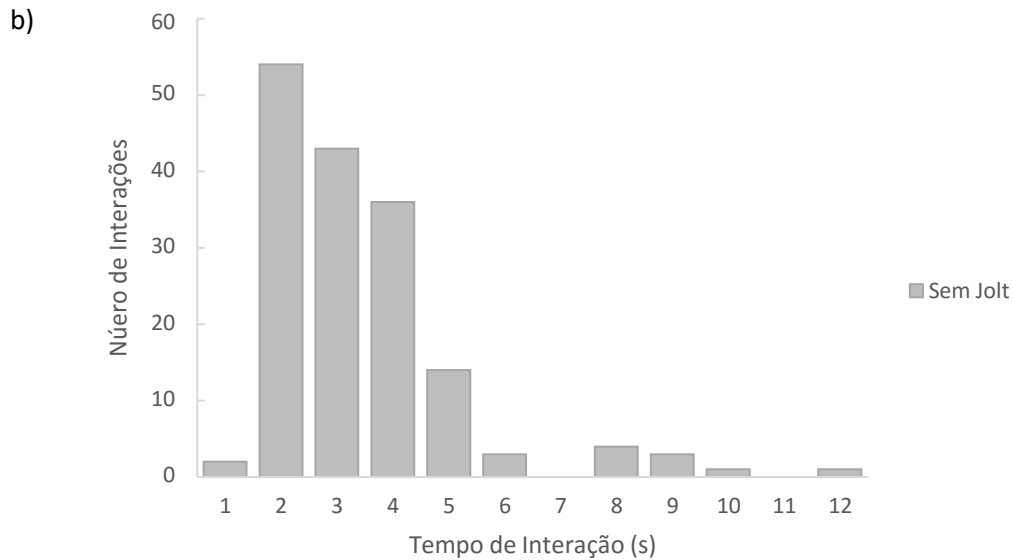


Figura 2 – Número de interações com jolt (a) e sem jolt (b) em função do tempo de interação.

3.2 Níveis de emergência parasitária

Todos os organismos parasíticos capturados pelas armadilhas de emergência pertencem à família Gnathiidae. A quantidade de gnatídeos que emergiram por unidade de área foi, em média (\pm DP), 11.53 ± 10.33 larvas/m² durante um período de 24 horas. Em nenhum dos cinco replicados das três amostras houve ausência de organismos parasíticos, isto é, gnatídeos (Figura 3).

A abundância de gnatídeos variou significativamente nos três diferentes momentos de amostragem ($F = 37.3$, $p < 0.0001$, $gl = 1,2$).

No que diz respeito aos organismos não parasíticos predominaram organismos das classes Malacostraca e Maxillopoda. Não obstante, ocorreram também organismos pertencentes à classe Polychaeta e aos filos Chaetognatha e Chordata.

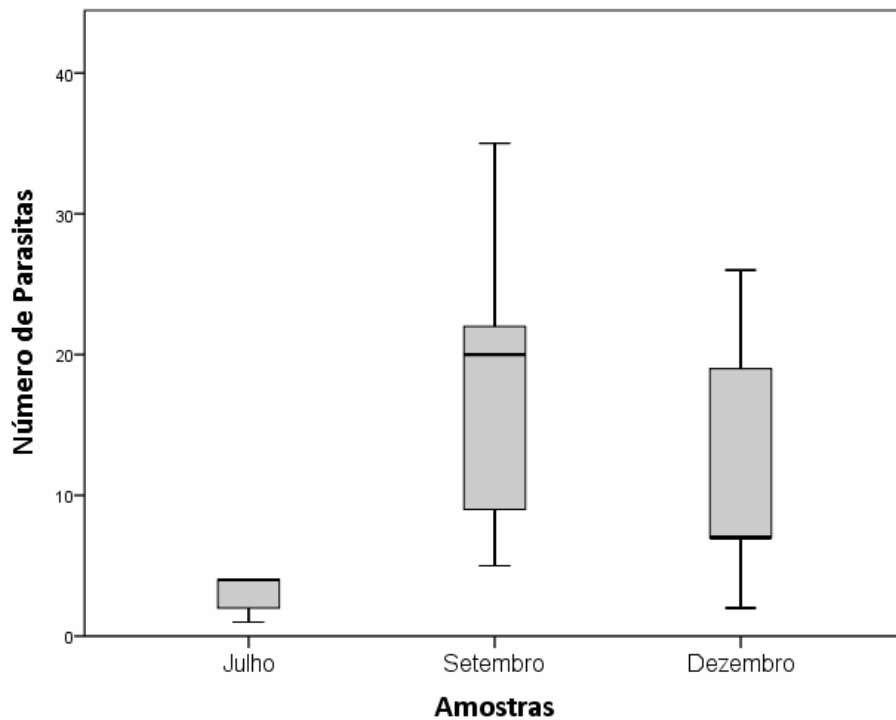


Figura 3 – Número médio (\pm EP) de isópodes Gnathiidae encontrados nas armadilhas de emergência parasitária nos três diferentes momentos de amostragem: 30-Julho-2015, 30-Setembro-2015 e 02-Dezembro-2015. A linha central designa a mediana.

Seria de esperar que, o número de gnatídeos presentes na pele dos peixes cliente, bem como o número de gnatídeos presentes nos conteúdos estomacais dos limpadores, acompanhasse o pico de abundância de gnatídeos presentes na amostra recolhida em Setembro. Tal facto, não se verificou. Seria de esperar, também, que o número de interações fosse maior no mês de Setembro, o qual também não se verificou (Tabela 5).

Tabela 5 – Média (\pm DP) de gnatídeos presentes nas armadilhas de emergência, nos conteúdos estomacais dos limpadores, na superfície da pele dos clientes e o número médio (\pm DP) de interações por observação, em função dos meses de estudo. Os valores marcados com asterisco (*) simbolizam apenas uma ocorrência.

Armadilhas de emergência		Limpadores		Clientes		Interações	
Mês	Gnatídeos	Mês	Gnatídeos	Mês	Gnatídeos	Mês	N
Julho	4.20 \pm 3.49	Julho	-	Julho	-	Julho	7*
Agosto	-	Agosto	-	Agosto	-	Agosto	9.67 \pm 4.04
Setembro	18.20 \pm 11.82	Setembro	16.14 \pm 12.17	Setembro	3.27 \pm 2.94	Setembro	10.00 \pm 3.10
Outubro	-	Outubro	15.00 \pm 10.00	Outubro	3.50 \pm 3.17	Outubro	8.00 \pm 2.83
Novembro	-	Novembro	-	Novembro	-	Novembro	10.88 \pm 3.83
Dezembro	12.20 \pm 9.93	Dezembro	18*	Dezembro	-	Dezembro	-
Fevereiro	-	Fevereiro	35.00 \pm 18.38	Fevereiro	2.00 \pm 3.04	Fevereiro	-
Março	-	Março	23.80 \pm 12.28	Março	3.15 \pm 2.48	Março	-

3.3 Carga ectoparasitária das espécies de peixes cliente

No total, foram capturados indivíduos de cinco espécies cliente, nomeadamente, *S. bailloni*, *S. melops*, *C. julis*, *Ctenolabrus rupestris* e *Diplodus vulgaris*. Todas estas espécies se encontraram parasitadas por gnatídeos. A espécie *D. vulgaris* apresentou, exclusivamente, num dos dez indivíduos capturados, um parasita pertencente à família Caligidae.

O número de ectoparasitas variou entre espécies cliente ($F = 21.01$, $p < 0.0001$, $gl = 3$), bem como também entre o tamanho dos indivíduos de cada espécie ($F = 4.25$, $p = 0.039$, $gl = 1$). A espécie *S. melops* foi a espécie mais parasitada com uma média (\pm EP) de 5.50 ± 0.93 gnatídeos por indivíduo. Por sua vez, a espécie *C. julis* foi a menos parasitada com uma média de 1.70 ± 0.93 gnatídeos por indivíduo (Figura 4). No entanto, avaliando as diferenças entre o número de parasitas e o número de interações das espécies *S. melops*, a mais parasitada, e *S. bailloni*, que interagiu mais com o limpador, não foram encontradas diferenças significativas (Nº de parasitas: $U = 31$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $p = 0.142$; Nº de interações: $U = 148.50$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $p = 0.156$).

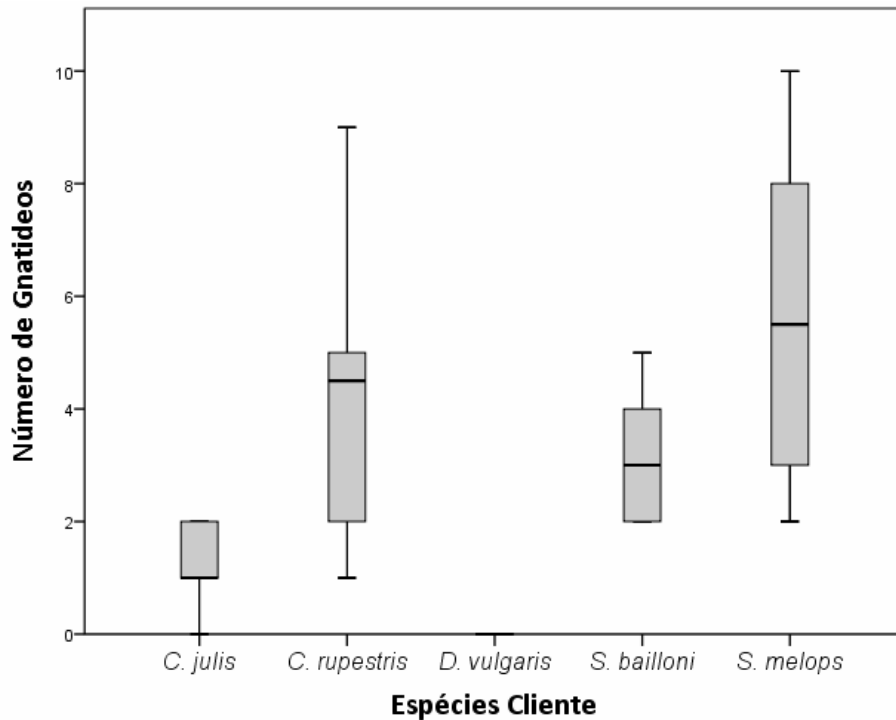


Figura 4 – Frequência de isópodes Gnathiidae encontrados na superfície corporal dos peixes cliente. O diagrama em caixa inclui o 1º e 3º quartil (percentil 25 e percentil 75, respectivamente). A linha central designa a mediana.

Em contrapartida, é com a espécie mais parasitada, *S. melops*, que o limpador interage durante mais tempo com uma média de 4.43s/interação (Figura 5). Para além de passarem mais tempo com o limpador, foram os indivíduos desta espécie que também receberam maior número de toques corporais pelo limpador, com uma média de 2.89 toques/interação.

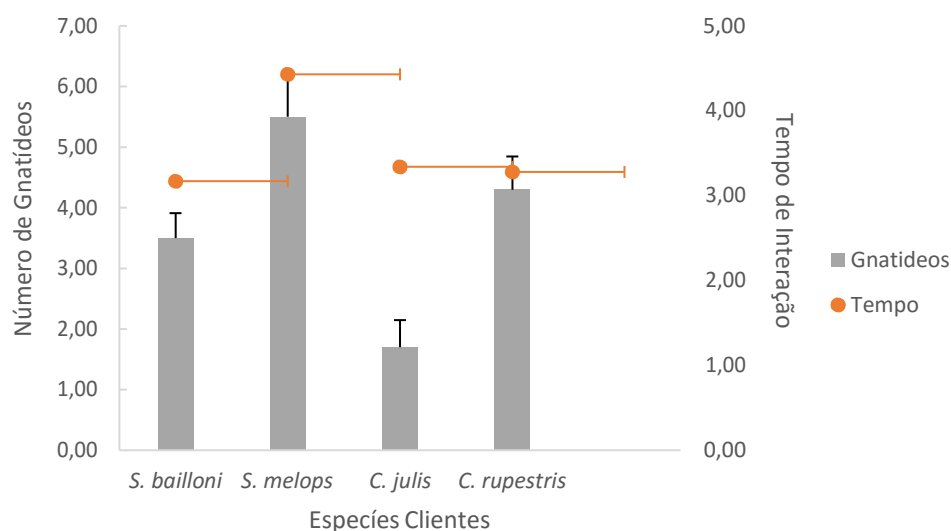


Figura 5 – Número médio (\pm EP) de isópodes Gnathiidae e tempo médio de interação (s) em função das espécies cliente. As barras em cinzento correspondem ao número de gnatídeos e os pontos a vermelho correspondem ao tempo de interação.

3.4 Composição da dieta do limpador

No total, foram analisados vinte conteúdos estomacais de limpadores *C. exoletus*. Vários itens alimentares foram encontrados, nomeadamente, algas, copépodes livres, anfípodes, gastrópodes, crustáceos não parasíticos, bivalves e grãos de areia, bem como parasitas (todos pertencentes à família Gnathiidae) e escamas. O item mais frequente na dieta do limpador foi o das larvas de gnatídeos com uma ocorrência de 100%. Por outro lado, o grupo dos crustáceos não parasíticos foi o item mais abundante (\pm EP) com $44.98\% \pm 1.14$ do total de itens encontrados nos conteúdos estomacais. Não só estes crustáceos, mas também os gnatídeos, foram muito representativos nesta dieta com $37.80\% \pm 0.26$ de abundância. A presença de escamas ocorreu em 60% dos conteúdos estomacais do limpador com uma abundância de $3.92\% \pm 0.05$ do total de itens (Figura 6).

A representação gráfica da análise das coordenadas principais (PCoA) permitiu destacar que os itens alimentares que mais explicam a variação na dieta do limpador são os gnatídeos e os crustáceos não parasíticos (S -Stress = 0.00702) (Figura 7).

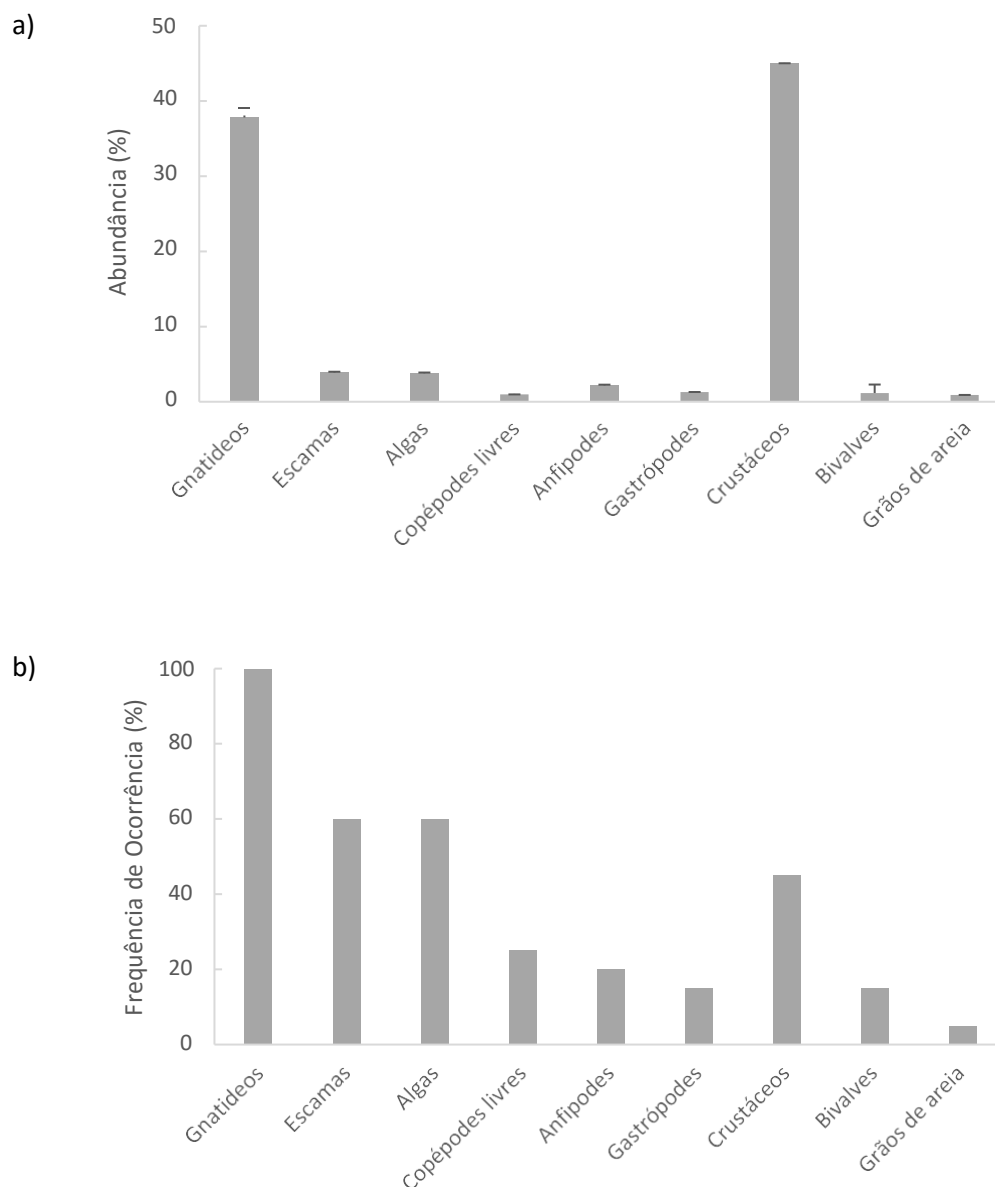


Figura 6 – Representação média (\pm EP) da (a) abundância dos itens alimentares e (b) frequência de ocorrência na composição da dieta dos limpadores *C. exoletus* (n = 20).

Tendo em conta que, limpadores mais pequenos (<7cm) correspondem também a indivíduos mais novos podemos inferir sobre a sua dependência em interações de limpeza. No entanto, a regressão linear simples mostrou que não existe nenhuma relação entre o número de parasitas e o tamanho dos limpadores ($F = 1.138$, $p = 0.300$, $gl = 1$). De igual modo, podemos testar se indivíduos mais velhos fazem mais ou menos batota. A correlação de Spearman não mostrou uma relação significativa entre o número de escamas e o tamanho dos limpadores ($r = 0.346$, $n = 20$, $p = 0.135$).

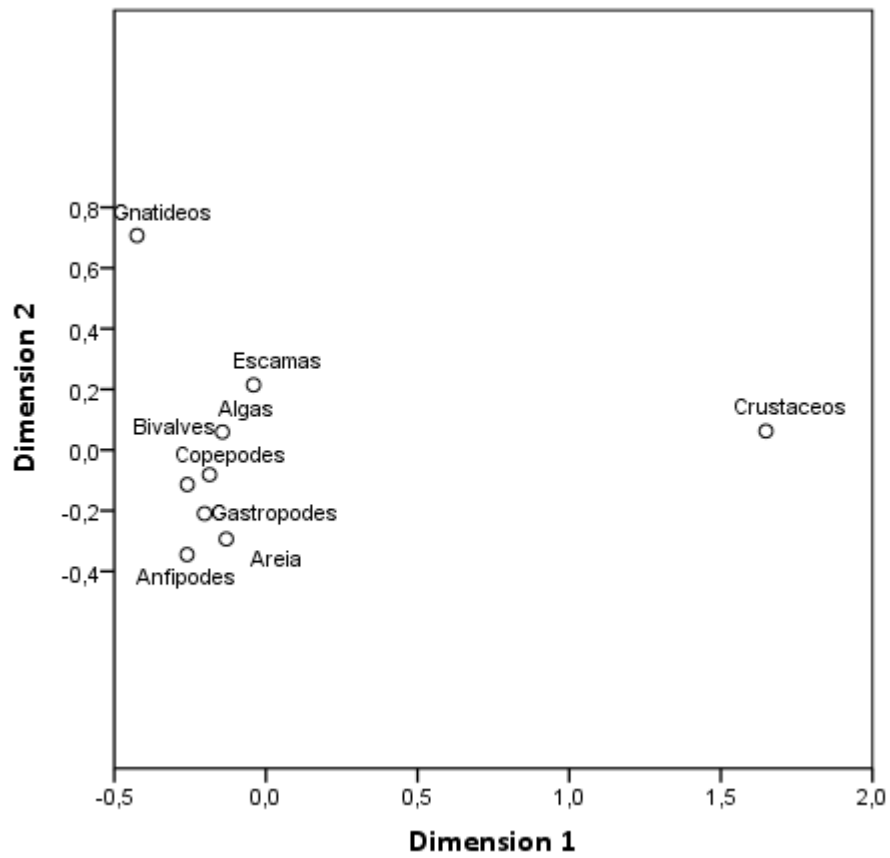


Figura 7 – Representação gráfica da análise das coordenadas principais, com indicação das distribuições dos itens alimentares pelas duas dimensões resultantes da PCoA.

4. Discussão

4.1 Descrição comportamental do limpador

Os vinte limpadores observados da espécie *C. exoletus* mantiveram interações de limpeza em três diferentes contextos, nomeadamente, em estações de limpeza (pequenos territórios confinados, localizados em rochas), em natação livre, onde mantinham limpezas oportunistas na coluna de água e, por fim, em zonas junto ao substrato que se assemelham aos territórios das estações de limpeza mas que, devido ao abandono do limpador dessas mesmas zonas, terá sido difícil a classificação como, sendo na verdade, uma estação de limpeza. Galeote e Otero, em 1998, haviam já descrito que esta espécie de limpador não mantém estações de limpeza bem definidas. Antes, nadam lentamente em pares, ou em grupos de três a oito indivíduos, explorando pequenas zonas no substrato e limpando outros peixes em diferentes áreas. No entanto, a existência, ou não, de lugares fixos para o atendimento de clientes pode estar dependente dos níveis de emergência e contaminação parasitária de cada local, e/ou, quantidade ou disponibilidade de potenciais clientes. Pode também dever-se ao fato de estes limpadores não serem específicos com os clientes com quem interagem, e assim, deste modo, podem abranger mais espécies cliente nas suas limpezas, umas mais pelágicas e outras mais bentónicas.

No presente estudo, houve o cuidado de elaborar um etograma (Tabela 1) descrevendo todos os comportamentos observados. Particularmente, o comportamento de inspeção foi descrito como sendo uma interação em que o limpador mostra interesse num cliente, nadando orientado para ele à procura de itens alimentares na sua pele. Este comportamento foi distinguido devido ao fato de, paralelamente ao que Galeote & Otero (1998) observaram, os limpadores, por vezes, depois de inspecionarem o cliente não “picavam” a sua pele e portanto não ocorria limpeza. Também as rejeições [interação onde uma das partes (limpador ou cliente) não mostra nenhum interesse na interação de limpeza] foram observadas em ambos os estudos. Várias foram as ocasiões onde, tanto o limpador como o cliente se mostraram desinteressados em prosseguir para uma interação de limpeza.

Os limpadores facultativos tendem a concentrar a sua atividade de limpeza em poucas espécies cliente (Darcy *et al.*, 1974; Sazima *et al.*, 1999). O limpador facultativo *C. exoletus* confirmou este fato, tendo-se apenas associado com oito espécies cliente.

No entanto, comparativamente a outros estudos com o mesmo limpador, este apresenta um baixo número de clientes. Galeote e Otero (1998) registaram dezoito espécies cliente, em Tarifa, no sul de Espanha. Henriques e Almada (1997) observaram interações deste limpador com doze espécies cliente. Este último caso, provavelmente, deve-se ao fato deste estudo ter sido conduzido dentro da reserva marinha da Arrábida e, portanto, por se tratar de uma reserva, os limpadores poderão ter tido acesso a uma maior biodiversidade marinha. Deste modo, apesar de se tratar da mesma espécie limpadora, estas diferenças podem estar associadas às diferenças nas estruturas das comunidades dos diferentes habitats. Por exemplo, a espécie cliente que mais interagiu com o limpador foi a *S. bailloni*, com 32.9% das interações, contrastando com os resultados apresentados no estudo de Galeote & Otero (1998) que concluíram que a espécie *Chromis chromis* foi a que interagiu mais com o limpador. É de notar, que a espécie *C. chromis* é a que menos interagiu com o limpador deste estudo, com apenas 1.1% das interações. Estas diferenças comportamentais podem estar relacionadas com a abundância e riqueza de espécies de cada local de estudo.

De um modo geral, a maioria das interações de limpeza são iniciadas pelos clientes, adotando uma posição de solicitação (Côté et al., 1998). De modo semelhante, neste estudo, verificou-se que são, de fato, os clientes a iniciar as associações de limpeza. Galeote & Otero (1998) observaram, de igual modo, a intenção dos clientes em iniciarem as interações. Por outro lado, a finalização da maioria das interações ficou a cabo dos limpadores, simplesmente por estes, abandonarem o cliente. Daqui, podemos concluir que: 1) a eliminação de parasitas e o contacto com o limpador é, por si só, benéfico fazendo com que os clientes se mostrem interessados em ser limpos, 2) se a disponibilidade de ectoparasitas terminar e se, ainda assim, os clientes continuarem dispostos a serem limpos, a batota pelos limpadores mostra-se residual, e por fim, 3) devido ao baixo número de estações de limpeza, os clientes não gastam energia nem tempo a ir de encontro aos limpadores.

A batota (remoção de muco e escamas ao invés de ectoparasitas e tecido morto) praticada pelos limpadores foi quantificada pela ocorrência de jolts (rápida contração muscular ou abanão do cliente) (Soares et al., 2007). Este estudo revelou uma pequena percentagem no número de interações com jolts por parte dos clientes, com apenas

8.52%, do total de interações. Deste modo, estas conclusões vêm corroborar com o que Barbu *et al.*, (2002) haviam já revelado, afirmando que limpadores facultativos, normalmente, fazem menos batota que limpadores obrigatórios. Podemos concluir, ainda, que, contrariamente a outros labrídeos, a espécie *C. exoletus* prefere ectoparasitas e, portanto, as suas interações de limpeza têm pouca probabilidade de ocorrência de batota. Para além dos jolts, foram também contabilizados os castigos que os clientes praticaram contra os limpadores, sendo que esta é a única forma de controlar a batota (Bshary e Grutter, 2002). Ainda assim, poucas foram as espécies e o número de casos onde clientes tenham castigado o limpador, o que parece claramente indicar que a batota é algo residual neste sistema. Neste caso, e tal como sugerido por Narvaez *et al.* (2013), para os limpadores facultativos açorianos, os jolts atribuídos aos clientes de *C. exoletus* podem ser uma resposta associada à própria remoção de ectoparasitas, não estando associado à desonestidade praticada pelos limpadores. É interessante notar que, as interações com jolts duraram mais tempo do que as interações sem jolts, o que parece corroborar exatamente com o sugerido anteriormente: estas interações duram mais apesar dos jolts, porque o fazem em resposta à remoção de parasitas. Portanto, as interações duram enquanto existem parasitas a serem removidos.

4.2 Níveis de emergência de gnatídeos

Tal como esperado, todos os organismos parasíticos capturados nas armadilhas de emergência parasitária pertencem à família Gnathiidae. As larvas de gnatídeos são os mais abundantes crustáceos parasitas nos peixes de recife (Smit & Davies, 1999; Davies & Smit, 2001) e são o item alimentar primário de limpadores do Indo-Pacífico (Grutter, 1996) e Caraíbas (Arnal & Côté, 2000; Whiteman & Côté, 2002), bem como, das águas açorianas (Narvaez *et al.*, 2015). As armadilhas usadas nesta experiência foram desenhadas à semelhança das usadas por Sikkel *et al.*, em 2004. Um dos objetivos do estudo de Sikkel *et al.* (2004) foi avaliar a emergência de larvas de gnatídeos a partir do *bentos*. Portanto, a malhagem usada nas redes de planctôn do presente estudo teve a mesma medida para assegurarem a captura destes organismos.

Grutter *et al.* (2000) associaram as variações na emergência parasitária às fases lunares. O mesmo estudo confirma que a abundância de gnatídeos é maior durante a lua cheia. Verificando as respetivas fases da lua nos três momentos de amostragem,

pode-se constatar que a primeira amostra, referente ao mês de Julho, foi recolhida um dia antes da lua cheia. A amostra seguinte, referente ao mês de Setembro, foi recolhida dois dias depois da lua cheia. E, por fim, a terceira amostra, referente ao mês de Dezembro, foi recolhida sete dias após a lua cheia. Deste modo, podemos concluir que, o mês de Setembro, que foi o mês onde se registou o pico de abundância de gnatídeos, coincidiu com o fato da lua cheia já ter ocorrido e a respetiva recolha de amostra ter sido feita poucos dias depois. Este pico coincidiu, também, com um dos meses com mais interações, sugerindo que os clientes estivessem, também, mais parasitados. No entanto, esta comparação mensal pode não revelar a verdadeira natureza do aumento do número de interações, isto porque, as amostragens foram feitas com datas de recolha diferentes. Portanto, o elevado número de interações justificado pelo elevado número de gnatídeos, pode ter sido provocado por outros processos, nomeadamente, a ocorrência de um bloom fitoplânctónico.

4.3 Carga ectoparasitária das espécies de peixes cliente

As espécies cliente capturadas nesta área de estudo estavam, maioritariamente, infestadas por gnatídeos com exceção de uma única espécie, a *D. vulgaris*. Nos dez indivíduos capturados, apenas um estava parasitado por um copépode parasita, da família Caligidae. Estes resultados vão de encontro ao estudo de Arnal & Morand, em 2001, que averiguaram que a espécie mais parasitada por calígídeos foi, igualmente, a *D. vulgaris*. Como já visto, os calígídeos concentram-se à superfície da água (Costello, 2006). Sendo a espécie *D. vulgaris* mais pelágica que o resto dos clientes, esta pode estar mais sujeita a infestações por calígídeos do que por gnatídeos, que são parasitas que emergem do *bentos*.

O número de ectoparasitas, bem como, o tamanho dos hospedeiros variou significativamente entre espécies. Normalmente, peixes com maiores dimensões apresentam mais ectoparasitas devido a uma maior superfície corporal, propícia a infestações (Grutter, 1994; Poulin 2000). Seria de esperar que a espécie mais parasitada, *S. melops*, fosse a que mais interações somasse. No entanto, comparando o número de ectoparasitas e o número de interações entre a espécie mais parasitada, *S. melops*, e a que mais interagiu com o limpador, *S. bailloni*, não foram encontradas diferenças significativas, sugerindo assim que as interações de limpeza possam estar mais

dependentes da abundância relativa e disponibilidade das espécies cliente no local de estudo. No entanto, foi a espécie mais parasitada (*S. melops*) que recebeu mais toques por parte dos limpadores, portanto, a assiduidade não parece depender do número de parasitas, já o número de toques e a duração da interação dependem.

Sendo esta uma espécie bastante parasitada, quanto maior o número de parasitas encontrados na pele do cliente maior será o número de toques e maior será o tempo de interação para os remover por completo.

4.4 Composição da dieta do limpador

No geral, a dieta dos limpadores *C. exoletus*, analisada através dos seus conteúdos estomacais, não diferiu muito do já conhecido e reportado por Galeote & Otero (1998). Esta é composta, essencialmente, por organismos bentónicos, nomeadamente, algas, copépodes livres, anfípodes, gastrópodes, crustáceos não parasíticos, bivalves, grãos de areia e, também, larvas de gnatídeos e escamas. O fato de apenas terem sido encontrados parasitas da família Gnathiidae revela uma preferência do limpador por este ectoparasita. A frequência de ocorrência de tal item (100%) e a sua relativa abundância comprova que estes limpadores demonstram uma maior dependência nestes parasitas. Não só os gnatídeos, mas também os crustáceos não parasíticos, revelaram ser o item mais abundante nesta dieta ($44.98\% \pm 1.14$). Estes resultados são suportados pela representação gráfica dos itens alimentares, feita através da análise das coordenadas principais (Figura 7). Esta análise permitiu concluir que os itens mais relevantes na dieta dos limpadores são os gnatídeos, bem como, os crustáceos não parasíticos. A existência de um destes dois itens, num determinado conteúdo estomacal, sobrepõe-se sobre a inexistência do outro, e vice-versa.

A presença de escamas em 60% dos conteúdos estomacais analisados revela que os *C. exoletus* não removem unicamente parasitas da pele dos clientes, o que sugere, a existência de comportamentos desonestos por parte do limpador (Bshary & Grutter, 2002). O mesmo foi reportado para os limpadores facultativos açorianos. No entanto, considerando a falta de resposta comportamental negativa condizente com a presença de escamas, isto pode ocorrer em resultado da pouca especialização deste limpador. Isto é, a ingestão de escamas pode ser um “bi-product” da remoção parasitária, já que

possivelmente eles aparentam preferir ingerir parasitas, primordialmente. A ingestão das escamas pode também ocorrer quando os hospedeiros deixam de ter parasitas disponíveis, sendo que, nesse caso, continuando a ter acesso aos hospedeiros, os limpadores começariam a ingerir itens não preferenciais. Este facto ocorre em limpadores menos especializados e que preferem parasitas. Os jolts seriam, então, um sinal de que os clientes já estariam limpos (Soares *et al.*, 2008). No entanto, são os *C. exoletus* que normalmente terminam as interações.

As classes de tamanho, definidas por Galeote & Otero (1998), para os limpadores foram divididas em duas classes: juvenis, com um comprimento total menor que 7cm, e adultos, com um comprimento total maior que 7cm. Ao testar a dependência em itens parasíticos ou escamas em função do tamanho dos limpadores, não se verificou nenhuma relação significativa. Galeote & Otero (1998) também chegaram à mesma conclusão afirmando que os hábitos alimentares entre as duas classes de tamanho foram relativamente similares. Por fim, pode-se sugerir que nesta espécie, a dieta dos adultos não difere significativamente dos mais jovens, podendo os limpadores adultos, associarem-se, também, a limpezas com clientes.

4. Conclusões

Este estudo apresenta resultados que confirmam a observação pioneira de Potts, em 1973, confirmando que a espécie *Centrolabrus exoletus* é, de facto, um peixe limpador de águas temperadas.

De um modo geral, a informação reunida neste estudo apresentou novos dados comportamentais para esta espécie. A existência de estações de limpeza, bem como o fato de os clientes atenderem a estas mesmas estações de limpeza podem por em causa a verdadeira ecologia deste limpador, visto este estar classificado como limpador facultativo (os quais não mantêm estações de limpeza).

Os itens parasitários mostraram ser uma fração muito importante na dieta deste limpador, sendo que a frequência de ocorrência de gnatídeos, nos conteúdos estomacais examinados, foi de 100%. Deste modo, é possível concluir que os *C. exoletus* têm uma dependência em ectoparasitas. Além deste item alimentar e, à semelhança do descrito por Henriques & Almada (1997) e Galeote & Otero (1998), estão, também incluídos, vários organismos bentónicos, nesta dieta. O papel ecológico desta espécie mostra-se então de grande importância no ecossistema, particularmente, da costa algarvia pois constatou-se que a parasitação da comunidade piscícola é real.

A dependência que esta espécie revelou por ectoparasitas põe em perspectiva a teoria da evolução das interações de limpeza sugerida por Losey, em 1979. Losey afirmou que estas interações evoluíram por meio de peixes que se alimentavam ocasionalmente de escamas e muco de outros peixes e que, devido ao reforço positivo provocado pela estimulação tátil, descobriram uma nova fonte de alimento, os ectoparasitas. No entanto, os dados reunidos pelas análises dos conteúdos estomacais dos limpadores *C. exoletus*, sugerem que a evolução tenha sido na direção oposta, sendo que os ectoparasitas seriam o recurso alimentar preferencial e tendo a ingestão de escamas, muco ou tecido saudável dos clientes evoluído oportunisticamente.

Seria de interesse futuro avaliar a taxa de emergência parasitária anual, de modo a compreender melhor as variações sazonais dos parasitas, bem como avaliar o impacto nas populações de espécies de peixes residentes, nomeadamente nos seus níveis de *stress* e de como isso se relaciona com as flutuações parasitárias sazonais.

De modo a complementar este estudo, seria importante e de especial interesse,

identificar a espécie de gnatídeos capturados na pele dos clientes, bem como, identificar quais os hospedeiros que parasitaram anteriormente, através de análises ao ADN. Por fim, seria uma mais valia identificar, também, as escamas encontradas nos conteúdos estomacais dos limpadores, para confirmar quais as espécies de cliente em que os limpadores, de fato, atuam.

No final será também possível, contribuir com informação para o controlo biológico de infestações parasitárias, em pisciculturas de salmão da Europa do Norte, como alternativa à utilização de pesticidas e vacinação (Bjordal, 1990). Estas pisciculturas alojam elevadas densidades de indivíduos, o que favorece a disseminação de infestações provocadas por copépodes parasitas, com especial relevância para a espécie *Lepeophtheirus salmonis*, afetando não só a saúde das pisciculturas, mas também causando um impacto no *stock* de salmonídeos selvagens das baías e estuários adjacentes (Costello, 2006; Jackson, 2012).

6. Referências Bibliográficas

- Afonso, M. R. & McMurtrie, M. (1991). Plantas do Algarve. *Serviço Nacional de Parques Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa*.
- Alveirinho Dias, J. M. (1988). Aspectos geológicos do litoral algarvio. *Geonovas*, 10(1), 113-128.
- Arnal, C., & Côté, I. M. (2000). Diet of broadstripe cleaning gobies on a Barbadian reef. *Journal of Fish Biology*, 57(4), 1075-1082.
- Arnal, C., & Morand, S. (2001). Importance of ectoparasites and mucus in cleaning interactions in the Mediterranean cleaner wrasse *Symphodus melanocercus*. *Marine Biology*, 138(4), 777-784.
- Ayling, A. M., & Grace, R. V. (1971). Cleaning symbiosis among New Zealand fishes. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 5(2), 205-218.
- Barbu, L., Guinand, C., Bergmüller, R., Alvarez, N., & Bshary, R. (2011). Cleaning wrasse species vary with respect to dependency on the mutualism and behavioural adaptations in interactions. *Animal behaviour*, 82(5), 1067-1074.
- Bjordal, A. (1990). Sea lice infestation on farmed salmon: possible use of cleaner-fish as an alternative method for de-lousing. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1761, 85Á89.
- Bjordal, A. (1992). Cleaning symbiosis as an alternative to chemical control of sea lice infestation of Atlantic salmon. In: J.E. Thorpe and F.A. Huntingford (Eds), *The Importance of Feeding Behaviour for the Efficient Culture of Salmonid Fishes. World Aquaculture. Workshops, No. 4, World Aquaculture Society, pp. 53-60*.
- Brown, B. L., Creed, R. P., Skelton, J., Rollins, M. A., & Farrell, K. J. (2012). The fine line between mutualism and parasitism: complex effects in a cleaning symbiosis demonstrated by multiple field experiments. *Oecologia*, 170(1), 199-207.
- Bshary, R., & Grutter, A. S. (2002). Asymmetric cheating opportunities and partner control in a cleaner fish mutualism. *Animal Behaviour*, 63(3), 547-555.
- Bshary, R., & Grutter, A. S. (2005). Punishment and partner switching cause cooperative behaviour in a cleaning mutualism. *Biology Letters*, 1(4), 396-399.
- Chambers, S. D., & Sikkil, P. C. (2002). Diel emergence patterns of ecologically important, fish-parasitic, gnathiid isopod larvae on Caribbean coral reefs. *Caribbean Journal of Science*, 38(1/2), 37-43.

- Cheney, K. L., & Côté, I. M. (2005). Mutualism or parasitism? The variable outcome of cleaning symbioses. *Biology Letters*, *1*(2), 162-165.
- Coile, A. M., & Sikkel, P. C. (2013). An experimental field test of susceptibility to ectoparasitic gnathiid isopods among Caribbean reef fishes. *Parasitology*, *140*(07), 888-896.
- Connor, R. C. (1995). The benefits of mutualism: a conceptual framework. *Biological Reviews*, *70*(3), 427-457.
- Costa, L., Nunes, M., Geraldés, P. & Costa, H. (2003) Zonas Importantes para as Aves em Portugal. *Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves*.
- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in parasitology*, *22*(10), 475-483.
- Côté, I. M. (2000). Evolution and ecology of cleaning symbioses in the sea. *Oceanography and Marine Biology*, *38*, 311-355.
- Côté, I. M., Arna, I. C. & Reynolds, J.D. (1998). Variation in posing behaviour among fish species visiting cleaning stations. *Journal of Fish Biology*, *53*, 256–266.
- Côté, I. M., & Soares, M. C. (2011). Gobies as cleaners. *The biology of gobies*. Science Publishers, St. Helier, 525.
- Darcy, G. H., Maisel, E., & Ogden, J. C. (1974). Cleaning preferences of the gobies *Gobiosoma evelynae* and *G. prochilos* and the juvenile wrasse *Thalassoma bifasciatum*. *Copeia*, 375-379.
- Davies, A. J., & Smit, N. J. (2001). The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina: Haemogregarinidae) in South African hosts. *Folia Parasitologica*, *48*(3), 169-177.
- Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Saglio, P., Lemaître, C., & Molle, G. (1999). Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *122*(2), 181-189.
- Feder, H. M. (1966). Cleaning symbiosis in the marine environment. *Symbiosis*, *1*(S M), 327-380.
- Ferreira, V. (2011). Guia de campo – Fauna e Flora marinha de Portugal. Ed. *Planeta Vivo, Leça da Palmeira*.
- Galeote, M. D., & Otero, J. G. (1998). Cleaning behaviour of rock cook, *Centrolabrus exoletus* (Labridae), in Tarifa (Gibraltar Strait area). *Cybium*, *22*(1), 57-68.

- Garnick, E., & Margolis, L. (1990). Influence of four species of helminth parasites on orientation of seaward migrating sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(12), 2380-2389.
- Gaspar, P. & Pinto, J. E. (2012). Guia de turismo de natureza do algarve. *Turismo do Algarve, Faro*.
- Gonçalves, J. M. S. *et al.* (2007, 2008, 2010). Cartografia e caracterização das biocenoses marinhas da Reserva Ecológica Nacional Submarina entre a barra nova do Ancão e a Ponta da Piedade. Relatórios Finais. CCR Algarve e ARH Algarve. *Universidade do Algarve, CCMAR, Faro*.
- Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., Braz, G. R., Paes, M. C., Sorgine, M. H., ... & Oliveira, P. L. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(4), 322-335.
- Grutter, A. S. (1994). Spatial and temporal variations of the ectoparasites of seven reef fish species from Lizard Island and Heron Island, Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 115, 21-30.
- Grutter, A. S. (1995). Comparison of methods for sampling ectoparasites from coral reef fishes. *Marine and Freshwater Research*, 46(6), 897-903.
- Grutter, A. (1996). Parasite removal rates by the cleaner wrasse *Labroides dimidiatus*. *Marine Ecology Progress Series*, 130, 61-70.
- Grutter, A. S. (1999). Infestation dynamics of gnathiid isopod juveniles parasitic on the coral-reef fish *Hemigymnus melapterus* (Labridae). *Marine Biology*, 135(3), 545-552.
- Grutter, A. S. (1999). Cleaner fish really do clean. *Nature*, 398(6729), 672-673.
- Grutter, A. S. (2002). Cleaning symbioses from the parasites' perspective. *Parasitology*, 124(07), 65-81.
- Grutter, A. S. (2004). Cleaner fish use tactile dancing behavior as a preconflict management strategy. *Current biology*, 14(12), 1080-1083.
- Grutter, A. S., & Bshary, R. (2003). Cleaner wrasse prefer client mucus: support for partner control mechanisms in cleaning interactions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 2), S242-S244.

- Grutter, A. S., Lester, R. J., & Greenwood, J. (2000). Emergence rates from the benthos of the parasitic juveniles of gnathiid isopods. *Marine Ecology Progress Series*, 207, 123-127.
- Grutter, A. S., Murphy, J. M., & Choat, J. H. (2003). Cleaner fish drives local fish diversity on coral reefs. *Current Biology*, 13(1), 64-67.
- Grutter, A. S., & Poulin, R. (1998). Intraspecific and interspecific relationships between host size and the abundance of parasitic larval gnathiid isopods on coral reef fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 164, 263-271.
- Henriques, M., & Almada, V. C. (1997). Relative importance of cleaning behaviour in *Centrolabrus exoletus* and other wrasse at Arrábida, Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(03), 891-898.
- Herre, E. A., Knowlton, N., Mueller, U. G., & Rehner, S. A. (1999). The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(2), 49-53.
- Hobson, E. S. (1968). *Predatory behavior of some shore fishes in the Gulf of California* (No. 73). US Fish and Wildlife Service.
- Hobson, E. S. (1971). Cleaning symbiosis among California inshore fishes. *Fishery Bulletin*, 69(3), 491-523..
- Jackson, D., O'Donohoe, P., Kane, F., Kelly, S., Mc Dermott, T., Drumm, A., & Nolan, G. (2012). Result of an epidemiological study of sea lice infestation in South Connemara, West of Ireland. *Aquaculture*, 364, 118-123.
- Johnson, S. C., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., Hwang, J. S., Ho, J. S., & Shih, C. T. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.*, 43(2), 229-243.
- Johnstone, R. A., & Bshary, R. (2002). From parasitism to mutualism: partner control in asymmetric interactions. *Ecology Letters*, 5(5), 634-639.
- Kabata, Z. (2003). Copepods parasitic on fishes. Key and notes for the identification of British species. *Synopses of the British fauna (New series)*. Canadá. 274pp.
- Kitching, R. L. (1999). *Biology of Australian butterflies* (Vol. 6). CSIRO PUBLISHING.
- Limbaugh, C. (1961). Cleaning symbiosis. *Scientific American*, 205, 42-49.

- Longley, W. H. (1918). Haunts and habits of tropical fishes. Observations of na explorer, equipped with a diving hood, in the unknown world of coral Labyrinths at the bottom of the sea. *American Museum Journal*, 8, 78-88.
- Losey, G. S. (1987). Cleaning symbiosis. *Symbiosis*, 4, 229–258.
- Losey, G. S. (1972a). Behavioural ecology of the “cleaning fish”. *Australian Natural History*, 17, 232-238.
- Losey Jr, G. S. (1972b). The ecological importance of cleaning symbiosis. *Copeia*, 820-833.
- Losey, G. S. (1979). Fish cleaning symbiosis: proximate causes of host behaviour. *Animal Behaviour*, 27, 669-685.
- Losey, G. S., & Margules, L. (1974). Cleaning symbiosis provides a positive reinforcer for fish. *Science*, 184(4133), 179-180.
- Loureiro, A., Ferrand de Almeida, N., Carretero, M. A., & Paulo, O. S. (2008). *Atlas dos anfíbios e répteis de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, Lisboa, 257.
- Mathias, M. L., Santos-Reis, M., Palmeirim, J., & Ramalhinho, M. G. (1999). *Guia dos mamíferos terrestres de Portugal continental, Açores e Madeira*. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- Ministro, J. (2012). *Guia de observação de aves no Algarve*. Turismo do Algarve, Faro.
- Narvaez, P., Furtado, M., Neto, A. I., Moniz, I., Azevedo, J. M., & Soares, M. C. (2015). Temperate facultative cleaner wrasses selectively remove ectoparasites from their client-fish in the Azores. *Marine Ecology Progress Series*, 540, 217-226.
- Potts, G. W. (1968). The ethology of *Crenilabrus melanocercus*, with notes on cleaning symbiosis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48(02), 279-293.
- Potts, G. W. (1973a). The ethology of *Labroides dimidiatus* (Cuv. & Val.)(Labridae, Pisces) on Aldabra. *Animal Behaviour*, 21(2), 250-291.
- Potts, G. W. (1973b). Cleaning symbiosis among British fish with special reference to *Crenilabrus melops* (Labridae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(01), 1-10.
- Poulin, R., & Grutter, A. S. (1996). Cleaning symbioses: proximate and adaptive explanations. *Bioscience*, 46(7), 512-517.

- Poulin, R. (2000). Variation in the intraspecific relationship between fish length and intensity of parasitic infection: biological and statistical causes. *Journal of Fish Biology* 56:123–137.
- Quignard, J., & Pras, A. (1986). Labridae. Pp: 919-942 in: Whitehead, PJP. M.-L. B/xucnor. J.-C. Hureau, J. Nielson & E. Tortonese (Eds). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*.
- Randall, J. E. (1962). Fish service stations. *Sea Frontiers*, 8(1), 40-47.
- Randall, J. E., Allen, G. R., & Steene, R. C. (1990). *Fishes of the great barrier reef and coral sea*. University of Hawaii Press.
- Ribeiro, O., & Lautensach, H. (1987). *Geografia de Portugal. A posição geográfica e o território*. S. Daveau (Ed.). Joao Sá da Costa.
- Saldanha, L. (1995). Fauna submarina Atlântica-Portugal continental, Açores, Madeira (4ª edição). *Publicações Europa-América, Lisboa*, 364.
- Santos, M. J. & Cavaleiro, F. (2015) Amostragem e Identificação de parasitas de espécies marinhas. *CIIMAR, Porto*.
- Santos, M. N. & Erzini, K. (eds) (2007). Catálogo de espécies de peixes de interesse comercial da costa sul atlântica da Península Ibérica. Projecto Getpesca II, Manual I. Junta de Andalucia.
- Sazima, I., Moura, R. L., & Sazima, C. (1999). Cleaning activity of juvenile angelfish, *Pomacanthus paru*, on the reefs of the Abrolhos Archipelago, western South Atlantic. *Environmental Biology of Fishes*, 56(4), 399-407.
- Seppälä, O., Karvonen, A., & Valtonen, E. T. (2004). Parasite-induced change in host behaviour and susceptibility to predation in an eye fluke–fish interaction. *Animal Behaviour*, 68(2), 257-263.
- Shaw, J. C., Korzan, W. J., Carpenter, R. E., Kuris, A. M., Lafferty, K. D., Summers, C. H., & Øverli, Ø. (2009). Parasite manipulation of brain monoamines in California killifish (*Fundulus parvipinnis*) by the trematode *Euhaplorchis californiensis*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1659), 1137-1146.
- Sikkel, P. C., Cheney, K. L., & Côté, I. M. (2004). In situ evidence for ectoparasites as a proximate cause of cleaning interactions in reef fish. *Animal Behaviour*, 68(2), 241-247.

- Slobodkin, L. B., & Fishelson, L. (1974). The effect of the cleaner-fish *Labroides dimidiatus* on the point diversity of fishes on the reef front at Eilat. *American Naturalist*, 369-376.
- Smit, N. J., & Davies, A. J. (1999). New host records for *Haemogregarina bigemina* from the coast of southern Africa. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 79(05), 933-935.
- Smit, N. J., & Davies, A. J. (2004). The curious life-style of the parasitic stages of gnathiid isopods. *Advances in Parasitology*, 58, 289-391.
- Soares, M. C., Bshary, R., Cardoso, S. C., & Côté, I. M. (2008a). The meaning of jolts by fish clients of cleaning gobies. *Ethology*, 114(3), 209-214.
- Soares, M. C., Bshary, R., Cardoso, S. C., & Côté, I. M. (2008b). Does competition for clients increase service quality in cleaning gobies?. *Ethology*, 114(6), 625-632.
- Soares, M. C., Cardoso, S. C., & Côté, I. M. (2007). Client preferences by Caribbean cleaning gobies: food, safety or something else?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(7), 1015-1022.
- Soares, M. C., Oliveira, R. F., Ros, A. F., Grutter, A. S., & Bshary, R. (2011). Tactile stimulation lowers stress in fish. *Nature Communications*, 2, 534.
- Tanaka, K. (2007). Life history of gnathiid isopods-current knowledge and future directions. *Plankton and Benthos Research*, 2(1), 1-11.
- Tanaka, K., & Aoki, M. (1998). Crustacean infauna of the demosponge *Halichondria okadai* (Kadota) with reference to the life cycle of *Gnathia* sp. (Isopoda: Gnathiidea). *Sponge Science: Multidisciplinary Perspectives*. Springer-Verlag, Tokyo, 259-267.
- Tully, O., Daly, P., Lysaght, S., Deady, S., & Varian, S. J. A. (1995). Use of cleaner-wrasse (*Centrolabrus exoletus* (L.) and *Ctenolabrus rupestris* (L.)) to control infestations of *Caligus elongatus* Nordmann on farmed Atlantic salmon. *Aquaculture*, 142(1), 11-24.
- Van Tassell, J. L., Brito, A., & Bortone, S. A. (1994). Cleaning behavior among marine fishes and invertebrates in the Canary Islands. *Cybium*, 18(2), 117-127.
- Waldie, P. A., Blomberg, S. P., Cheney, K. L., Goldizen, A. W., & Grutter, A. S. (2011). Long-term effects of the cleaner fish *Labroides dimidiatus* on coral reef fish communities. *PLoS one*, 6(6), e21201.

Whiteman, E. A., & Côté, I. M. (2002). Cleaning activity of two Caribbean cleaning gobies: intra-and interspecific comparisons. *Journal of Fish Biology*, 60(6), 1443-1458.