

**Avaliação dos métodos de indução de desova e
desenvolvimento larvar do ouriço-do-mar comum,
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)**



Ricardo N. C. Luís

**Avaliação dos métodos de indução de desova e
desenvolvimento larvar do ouriço-do-mar comum,
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)**

Ricardo N. C. Luís

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Sílvia
Lourenço e da Professora Doutora Ana Pombo

2018

Título: Avaliação dos métodos de indução de desova e desenvolvimento larvar do ouriço-do-mar comum, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Copyright © Ricardo N. C. Luís

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2017

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

Agradecimentos

Finda mais uma etapa do meu percurso académico e eis que surge o momento de expressar, de forma simples mas sincera, a minha gratidão para com aqueles que me incentivaram e motivaram a chegar a este momento.

Em primeiro lugar, agradeço às minhas orientadoras, Doutora Sílvia Lourenço e Professora Doutora Ana Pombo, por terem sido importantes alicerces neste processo formativo e por terem disponibilizado conhecimentos valiosos que permitiram que o presente trabalho tomasse a forma como a qual a apresento.

Ao Doutor Carlos Andrade, na inteira disponibilidade manifestada, nomeadamente, na aceitação da concretização do presente estudo nas instalações do Centro de Maricultura da Calheta. Como também à Doutora Natacha Nogueira pelo aconselhamento dado ao longo deste período. Não esquecendo o Ricardo, a Lurdes e o resto da equipa destas instalações, pela boa disposição e disponibilidade de colaboração nos mais variados trabalhos envolventes.

Ao Doutor Manfred Kaufmann e à Teresa Silva, por terem disponibilizado tão prontamente da minha utilização de recursos da Estação de Biologia Marinha do Funchal, essenciais à concretização deste trabalho.

Por fim, mas nunca menos importante, aos meus pais, por toda a dedicação e mais que isso, paciência, ao longo de uma vida. E a ti, Ester. Aquele grande obrigado pelo companheirismo durante esta etapa, que de tão perto acompanhaste.

Resumo

As gónadas de ouriço-do-mar são um produto muito valorizado e amplamente reconhecido como uma iguaria para consumo humano. Devido à crescente procura deste produto nos países europeus e asiáticos, muitas populações selvagens de *Paracentrotus lividus* estão em sobre pesca com o consequente acentuado declínio dos *stocks*. Ao longo da última década, verificou-se um aumento significativo dos esforços para desenvolver métodos economicamente viáveis para o cultivo de ouriços-do-mar, incluindo a investigação com o intuito de otimizar a reprodução em condições de cativeiro, sendo o desenvolvimento e sobrevivência dos estádios larvares planctónicos um dos obstáculos para o desenvolvimento da produção de ouriços-do-mar em aquacultura.

Para o presente estudo, utilizou-se uma amostra composta por adultos de *P. lividus* (n=80), com tamanho de teste superior a 35 mm, recolhidos nas poças intertidais da praia dos Reis Magos (32°38'44.24"N; 16°49'26.53"W) e das Poças do Governador (32°37'59.00"N; 16°56'36.33"W), situadas na costa sul da ilha da Madeira. O sistema de manutenção dos ouriços-do-mar consistiu em quatro tanques de 200 L, a $22,05 \pm 0,71$ °C e 90 L/h de renovação de água. Cada tanque continha 15 ouriços-do-mar e a alimentação, à base de macroalgas, foi estabelecida a 5% biomassa.dia⁻¹, recolhidas no local da amostragem. O estado de maturação da população foi analisado através da determinação do índice gonadosomático (IG) e através da análise histológica das gónadas de uma subamostra de 20 ouriços-do-mar. Foram avaliados quatro métodos de indução de desova (injeção de KCl 0,5M, agitação, adição de microalgas e adição de gâmetas coespecíficos) através da avaliação da resposta de desova em 30 minutos e a sobrevivência dos ouriços-do-mar após cinco dias. O método mais eficiente para induzir a desova foi utilizado para realizar a fertilização artificial de ovos de ouriço-do-mar. As larvas (echinopluteus) viáveis foram, então, alimentados com duas dietas de microalgas (*Dunaliella tertiolecta* e *Rhodomonas marina*), comparando o crescimento e a sobrevivência das larvas ao assentamento. O desenho experimental dos ensaios larvares consistiu em três tratamentos em triplicado, em incubadoras cilíndricas de 7 L a 21 ± 1 °C. O racionamento de microalgas foi estabelecido nas 4000, 8000 e 16000 células.ml-

1 nos tratamentos T1, T2 e T3, respetivamente, para larvas (equinopluteus) com dois pares de braços. A concentração de microalgas foi duplicada em todos os tratamentos com o desenvolvimento do 3º e 4º par de braços durante o desenvolvimento equinopluteus. O IG foi de $3,89\% \pm 1,97$ e a análise histológica demonstrou que 15% (n = 3) dos indivíduos encontravam-se em estado de desova e 85% (n = 17) encontravam-se numa fase de pós-desova e, portanto, seriam incapazes de libertar gâmetas. O método de indução por agitação causou a maior taxa de mortalidade, isto é, 70% (n = 7) dos indivíduos induzidos quando comparado com os outros três métodos, 10% (n = 1) para a injeção de KCl 0,5M e 0% tanto para o método de adição de espermatozoides, como para a adição de microalgas. Por outro lado, o método de injeção de KCl 0,5M foi o mais rápido e viável, com uma resposta positiva de 30% dos indivíduos induzidos (n=3), nos primeiros 5 minutos. A adição de microalgas induziu a libertação de gâmetas em 10% dos indivíduos (n=1), porém, ao longo de um período de 24h. O método de agitação induziu a desova em 10% dos indivíduos submetidos (n=1) e a adição de gâmetas coespecíficos não produziu resultados positivos. Os resultados preliminares do primeiro ensaio larvar utilizando uma dieta de *R. marina* demonstrou que as larvas echinopluteus atingiram a fase de assentamento em 21 dias com maior taxa de sobrevivência no tratamento de menor concentração de microalgas, ou seja, no tratamento T1. Para o ensaio larvar com a dieta *Dunaliella tertiolecta*, observou-se que as larvas atingiram a fase de assentamento em 15 dias, mas os resultados das taxas de sobrevivência do racionamento de microalga foram inconclusivos.

Palavras-chave: Ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus*, aquacultura, reprodução, desova, fecundação, desenvolvimento larvar.

Abstract

Sea urchin gonads (roe) are a prize product and broadly recognized as a delicacy for human consumption. Due to the increasing demand for this product by Asian and European countries, many *Paracentrotus lividus* populations are overfished resulting in a sharp decline of their wild stocks. During the last decade a significant increase in efforts to develop cost-effective methods to culture sea urchins has been observed including research aiming to optimize the reproduction in captivity conditions, being the development and survival of larval planktonic stages one of the bottlenecks for the echinoculture development.

For this study, *P. lividus* adults ($n = 80$), with test size superior of 35 mm, were collected in the intertidal rock pools of Reis Magos beach ($32^{\circ}38'44.24''\text{N}$; $16^{\circ}49'26.53''\text{W}$) and of Poças do Governador ($32^{\circ}37'59.00''\text{N}$; $16^{\circ}56'36.33''\text{W}$) in the southern coast of Madeira island. The rearing system consisted of four 200 L tanks at 22.05 ± 0.71 °C and a 90 L/h of water renovation. Every tank contained 15 sea urchins and feeding, based on macroalgae collected in the sampling site, was established at 5% biomass.day⁻¹. The maturation stage of the population was analyzed *a priori* by determining the gonadal index (GI) and by histological analysis of the gonads of a subsample of 20 sea urchins. Four different spawn inducing methods (injection of KCl 0.5M, agitation, addition of microalgae and addition of con-specific spermatozoa) were evaluated by assessing the spawning response within 30 min., and survival of the induced sea urchins after five days. The most efficient method to induce spawning was used to perform the artificial fertilization of sea urchin eggs. The viable echinopluteus were then fed with diets of different microalgae (*Dunaliella tertiolecta* and *Rhodomonas marina*) comparing larvae growth and survival, when competence for settlement was achieved. The larval experimental design consisted of three triplicated treatments, in 7 L cylindroconical incubators at 21.00 ± 0.39 °C. The microalgae rationing was established at 4000, 8000 and 16000 cells.ml⁻¹ in treatment T1, T2 and T3, respectively for larvae (echinopluteus) with two pairs of arms. The microalgae concentration was doubled in all treatments with the increment of the 3rd and 4th pair of arms during the development of the echinopluteus. The GI was $3.89\% \pm 1.97$ and the histological analysis demonstrated that 15% of the individuals were in a spawning stage and 85% were in a spent stage, therefore,

incapable of gamete release. The induction by agitation revealed to cause a higher percentage of mortality, 70% of the induced individuals, when compared with the other three methods, 10% for injection of KCl 0.5M and 0% for the addition of both spermatozoa and microalgae. In the other hand, the KCl injection demonstrated to be the more expedite and viable method, with a positive response from 30% (n=3) of the induced individuals within the first 5 min. The addition of microalgae proved to induce gamete release in 10% (n=1) of the individuals, but over a period of 24h. The agitation method induced gamete release in 10% (n=1) of the submitted individuals and the addition of con-specific spermatozoa did not produced positive results. The preliminary results of the first larval development experiment using a *R. marina* diet showed that the echinopluteus attain the settlement phase within 21 days with higher survival rate in the treatment of lower microalgae concentration. For the larval development experiment using *D. tertiolecta*, the echinopluteus attain the settlement phase within 15 days, but the results of the survival rate, for the treatments were inconclusive.

Keywords: Sea-urchin, *Paracentrotus lividus*, Echinoculture, echinopluteus, reproduction, spawning, fertilization, larval development

Índice

1. Introdução	16
1.1. Estado da arte	16
1.2. Produção de ouriços-do-mar em aquacultura	18
1.3. Biologia da espécie	19
1.3.1. Distribuição geográfica e caracterização do habitat	20
1.3.2. Anatomia/Morfologia	21
1.3.3. Ciclo de vida do <i>Paracentrotus lividus</i>	23
1.3.3.1. Gametogénese	24
1.3.3.2. Desenvolvimento larvar	25
1.3.4. Alimentação e nutrição	27
1.4. Objetivos do estudo	29
2. Material e métodos	30
2.1. Recolha e manutenção dos espécimes	30
2.2. Caracterização do estado de maturação	32
2.2.1 Histologia	32
2.2.2. Fixação de tecidos	34
2.2.3. Processamento de tecidos	34
2.2.4. Cortes histológicos	35
2.2.5. Coloração ácido periódico - Schiff (PAS)	35
2.3. Experiências de indução de desova	35
2.3.1. Indução por injeção de cloreto de potássio (KCl) 0,5M	37
2.3.2. Indução por agitação	37
2.3.3. Indução por adição de microalgas	38
2.3.4. Indução por adição de gâmetas espermatozoides coespecíficos	38
2.4. Cultivo de microalgas	39
2.5. Ensaio de desenvolvimento larvar	39
2.5.1. Desenvolvimento, crescimento e sobrevivência larvar	41
2.6. Análise estatística	42
3. Resultados	44
3.1. Induções de desova em <i>P. lividus</i>	44
3.1.1. Determinação do estado de maturação da população	44
3.1.2. Induções de desova em <i>P. lividus</i>	46
3.2. Ensaio larvares de <i>P. lividus</i>	48

3.2.1. Taxa de sobrevivência	48
3.2.2. Desenvolvimento larvar	50
3.2.2.1. Ensaio larvar de <i>P. lividus</i> alimentados com <i>R. marina</i>	50
3.2.2.2. Ensaio larvar de <i>P. lividus</i> alimentados com <i>D. tertiolecta</i>	52
3.2.3. Crescimento larvar <i>P. lividus</i>	54
3.2.3.1. Ensaio larvar <i>R. marina</i>	54
3.2.3.2. Ensaio larvar <i>D. tertiolecta</i>	57
4. Discussão	60
4.1. Induções de desova em <i>P. lividus</i>	60
4.2. Ensaios larvares de <i>P. lividus</i>	62
5. Conclusões e considerações finais.....	64
Referências Bibliográficas	66
Anexos	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Registo de capturas anuais em lota de <i>Paracentrotus lividus</i> em Portugal. (DGRM, 2017).....	17
Figura 2: Anatomia externa geral dos ouriços-do-mar, representando os polos oral (A) e aboral (B) dos ouriços-do-mar. (Adaptado de: Dorey, 2013)	22
Figura 3: Anatomia interna dos ouriços-do-mar. Corte no plano radial. A ilustração esquemática destaca o sistema vascular aquífero (SVA) a violeta e as restantes estruturas a azul. (Adaptado de: Pinsino & Matranga, 2015)	23
Figura 4: Representação esquemática das diferentes fases larvares e assentamento de <i>Paracentrotus lividus</i> . A: Fase piramidal; B: Fase 2 pares de braços (4b); C: Fase 3 pares de braços (6b); D: Fase 4 pares de braços (8b); E: Fase 4 pares de braços (8b) avançada; F: Pré-metamorfose; G: Juvenil recém assente. (Fonte: fotografia pessoal, 2018)	27
Figura 5: Localização da poças-de-maré da recolha do grupo amostral de <i>Paracentrotus lividus</i> adultos, destinados às experiências de indução. A: Poças do Governador; B: Reis Magos. (Adaptado de: Alves <i>et al.</i> , 2001)	30
Figura 6: Tanques cilíndricos de 200L de manutenção do grupo amostral de <i>Paracentrotus lividus</i> capturados para as experiências de indução de desova (Fonte: fotografia pessoal, 2017).....	32
Figura 7: Recipientes para o transporte e experiências de indução de <i>Paracentrotus lividus</i> . A: Tabuleiro de transporte com toalha no fundo; B: Taças de vidro de 1L; C: Aquários de 12L. (Fonte: fotografia pessoal, 2017)	36
Figura 8: Incubadoras cilindro-cónicas de 7L utilizadas nos ensaios larvares de <i>Paracentrotus lividus</i> . Tratamento T1: Incubadoras 1, 2 e 3; Tratamento T2: Incubadoras 4, 5 e 6; Tratamento T3: Incubadoras 7,8 e 9. (Fonte: fotografia pessoal, 2017).....	41
Figura 10: Racio sexual (A), estado de maturação (B) e aptidão para indução (C), do grupo amostral de <i>Paracentrotus lividus</i> usados nas experiencias de indução de desova.	44
Figura 11: Secções transversais das gónadas do grupo amostral de <i>Paracentrotus lividus</i> adultos usados para a caracterização do estado de maturação sexual. Análise histológica – A: Macho na fase pré-desova (não apto para desova); B: Fêmea na fase pré-desova (não apto para desova); C: Macho na fase de desova (apto para desova); D: Fêmea na fase de desova (apto para desova); E: Macho na fase pós-desova (não apto para desova); F: Fêmea na fase pós-desova (não apto para desova). (Fonte: fotografia pessoal, 2017) ...	45
Figura 12: Dados biométricos do grupo amostral de <i>Paracentrotus lividus</i> usados na experiência de indução de desova A: Diâmetro corporal médio (Dc);	

B: Peso individual húmido médio (Ph) e C: Altura corporal média (Ac). I1: Injeção como solução de KCl 0,5M; I2: Agitação; I3: Adição de microalga; I4: Adição de gâmetas coespecíficos. 46

Figura 13: Resultados das induções de desova em *Paracentrotus lividus*. A: Taxa de mortalidade; B: Taxa de resposta. I1: Injeção como solução de KCl 0,5M; I2: Agitação; I3: Adição de microalga; I4: Adição de gâmetas coespecíficos. ... 48

Figura 14: Comparação das taxas de sobrevivência entre ensaios com alimentação *Rhodomonas marina* e *Dunaliella tertiolecta*. As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. 50

Figura 15: Percentagem de indivíduos por estágio de desenvolvimento das larvas *Paracentrotus lividus* ao longo do ensaio de alimentação com *Rhodomonas marina*. As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. A: Amostragem aos 10 dias pós fecundação (DPF); B: Amostragem aos 17 dias pós fecundação (DPF). 51

Figura 16: Percentagem de indivíduos por estágio de desenvolvimento das larvas *Paracentrotus lividus* ao longo do ensaio de alimentação com *Dunaliella tertiolecta*. As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. A: Amostragem aos 10 dias pós fecundação (DPF); B: Amostragem aos 15 dias pós fecundação (DPF). 53

Figura 17: Medidas biométricas das larvas de *Paracentrotus lividus* do ensaio de alimentação com *Rhodomonas marina*, aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 17 dias pós fecundação (DPF). As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. 56

Figura 18: Medidas biométricas das larvas de *Paracentrotus lividus* do ensaio de alimentação com *Dunaliella tertiolecta*, aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 17 dias pós fecundação (DPF). As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. 58

Figura 19: Evolução mensal do índice gonadosomático e do nível de maturação da população de ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* da ilha da Madeira. Os estádios de maturação mat.1, mat.2, mat.3, mat.4 representam os estados de maturação das gónadas recuperação, pré-maturação, maduro, e pós-desova respectivamente (dados não publicados). 61

Figura 20: Gónadas de *Paracentrotus lividus* a secar em papel para obtenção de $P_h = \text{constante}$. O tracejado compreende o seccionamento do terço central da gónada para a análise histológica. (Fonte: fotografia pessoal, 2017) 71

Figura 21: Taxas de sobrevivência larvar de *Paracentrotus lividus* por incubadoras cilindro-cónicas. A: Ensaio de alimentação com *Rhodomonas marina*; B: Ensaio de alimentação com *Dunaliella tertiolecta*. Tratamento T1: Incubadoras 1, 2 e 3; Tratamento T2: Incubadoras 4, 5 e 6; Tratamento T3: Incubadoras 7, 8 e 9. (Fonte: fotografia pessoal, 2017) 73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Estádios de maturação das gónadas em <i>Paracentrotus lividus</i> descritos por Byrne (1990) e os estádios simplificados, utilizados na avaliação histológica do estado de maturação do grupo amostral de ouriços-do-mar adultos.	34
Tabela II: Concentrações de racionamento de microalga (<i>Dunaliella tertiolecta</i> e <i>Rhodomonas marina</i>) por tratamentos (T1; T2 e T3) e por fase larvar: larvas iniciais; 3 pares de braços (6b) e 4 pares de braços (8b).....	40
Tabela III: Médias (\pm desvio padrão) das medidas biométricas das larvas <i>Paracentrotus lividus</i> do ensaio com alimentação <i>Rhodomonas marina</i> , aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 17 dias pós fecundação (DPF As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.	56
Tabela IV: Médias (\pm desvio padrão) das medidas biométricas das larvas <i>Paracentrotus lividus</i> do ensaio com alimentação <i>Dunaliella tertiolecta</i> , aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 15 dias pós fecundação (DPF As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.	59
Tabela V: Espécies de ouriços-do-mar inicialmente produzidas em cativeiro no Japão. (Adaptado de: Unuma et al. n.d.).....	71

1. Introdução

1.1. Estado da arte

Os ouriços-do-mar pertencem ao filo dos Echinodermata, e à classe Echinoidea (Saldanha & Sacarrão, 2003). Nesta classe, conhecem-se por aproximadamente 850 espécies vivas, das quais 17 têm interesse para consumo humano (Pawson, 2007), porque as suas gónadas (femininas e masculinas), também denominadas ovas ou *uni*, são consideradas uma iguaria muito apreciada e de elevado valor comercial, que pode ultrapassar os 100 dólares por quilo (aproximadamente 85€/kg) (McBride, 2005, Stefánsson *et al.*, 2017). O interesse gastronómico resulta das suas qualidades organoléticas, de uma sensação de euforia aquando o seu consumo (Andrew *et al.*, 2003; Sun & Chiang, n.d.; Carboni *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2014) e pelo seu valor nutricional, uma vez que são fontes dos ácidos gordos essenciais de cadeia longa, o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido araquidónico (ARA), particularmente importantes no desenvolvimento do sistema nervoso (Kabeya *et al.*, 2017).

Registos arqueológicos revelam que as gónadas de ouriço-do-mar são consumidas por comunidades costeiras desde, pelo menos, o primeiro milénio antes de cristo (1 a.C.). De facto, escavações arqueológicas, realizadas em várias localizações, confirmam que no Japão e Pacífico Sul quase todos os achados continham fragmentos de uma ou duas espécies de equinodermes (Unuma *et al.*, n.d.; Lawrence, 2001). Este hábito manteve-se ao longo do tempo, tornando-se numa longa tradição gastronómica em muitas culturas, particularmente na Ásia, Chile, Mediterrâneo e Polinésia. O Japão é o principal país consumidor desta iguaria, consumindo cerca de 9000 toneladas anuais o que representa uma média de 70 gramas (g) por pessoa por ano (Andrew *et al.*, 2003; Unuma *et al.*, n.d.; Carboni *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2014). No continente americano, o Chile destaca-se na captura destes organismos, descarregando cerca de 50% das capturas mundiais, das quais apenas 10% se destinam ao consumo interno, seguido pela Califórnia, que regista uma captura

de 5 a 10% a nível mundial, destinada unicamente ao mercado interno (McBride, 2005).

A Europa também apresenta uma longa história de consumo de gónadas de ouriço-do-mar, revelando-se um importante mercado para este produto. Salienta-se aqui, a França como o primeiro consumidor europeu e segundo consumidor mundial, com um consumo aproximado de 1000 toneladas anuais, seguida pela Espanha, Itália e Grécia (Andrew *et al.*, 2002; Boudouresque & Verlaque, 2007; McBride, 2005).

Em Portugal, a exploração deste recurso tem um carácter sazonal e à escala familiar, realizando-se por toda a costa portuguesa, com especial foco na costa alentejana. A norte, a apanha tem uma forte componente económica orientada à exportação para os mercados francês e espanhol o que traduz num gradual aumento desta atividade pesqueira (Figura 1) (Castro, 2004; Fernández, 2013; Ramos, 2017; Raposo, 2017).

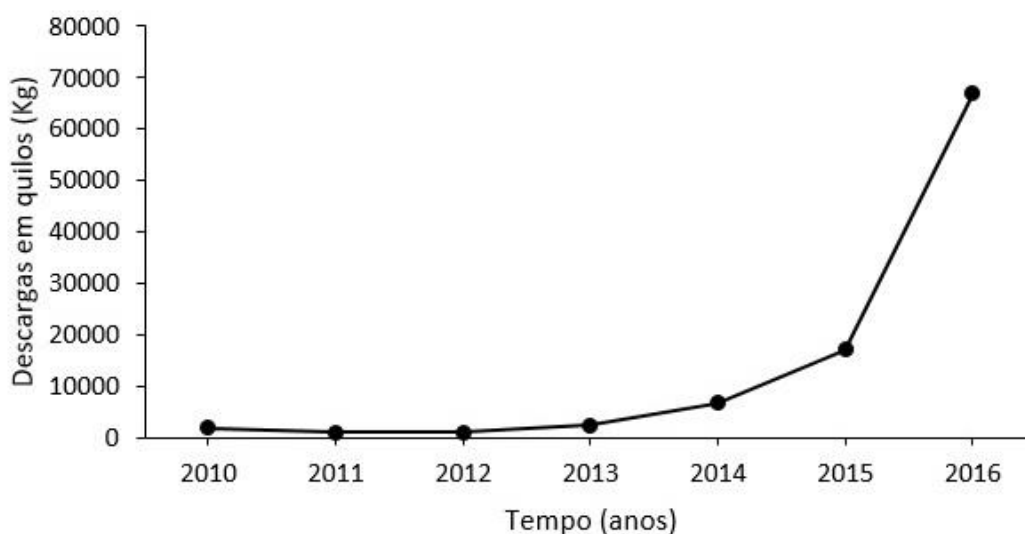


Figura 1: Registo de capturas anuais em lota de *Paracentrotus lividus* em Portugal. (DGRM, 2017)

Nas últimas décadas, a apanha destes animais era praticada por poucas pessoas e de uma maneira artesanal (Guidetti *et al.*, 2004). No entanto, com a crescente procura do mercado japonês a partir dos anos 1960, esta indústria expandiu-se e, para satisfazer o mercado, a atividade pesqueira recorreu à diversificação das espécies capturadas seguindo um padrão de pesca de rápida expansão até a um pico insustentável, o que se traduz num modelo de captura

“boom-and-bust”, das populações costeiras de ouriços-do-mar (McBride, 2005; Purcell *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2014).

Os ouriços-do-mar são, especialmente, vulneráveis à sobre pesca uma vez que formam aglomerados populacionais isolados e de elevada densidade, resultando em populações selvagens com menor capacidade de recuperação após uma exploração intensa (Azad *et al.*, 2010; Brundu *et al.*, 2016; Boudouresque & Verlaque, 2007). Estes fatores conduziram ao colapso dos *stocks* selvagens de equinodermes do Japão, Chile, costa Norte Americana e em muitas áreas costeiras europeias (Azad *et al.*, 2010; Brundu *et al.*, 2017; Guidetti *et al.*, 2004; McBride, 2005; Rahman *et al.*, 2014), em particular nas zonas costeiras atlânticas e mediterrânicas da França e a costa Irlandesa (Lozano *et al.*, 1995).

1.2. Produção de ouriços-do-mar em aquacultura

Atendendo ao declínio das populações selvagens e à crescente procura por produtos alimentares marinhos, a aquacultura é, provavelmente, a melhor alternativa para suportar as necessidades do mercado de consumo de ovas de ouriço-do-mar. Como indústria de produção de bens alimentares, este é o sector em mais rápida expansão do mundo, fornecendo uma alternativa sustentável e significativa à exploração dos organismos aquáticos selvagens (Brundu *et al.*, 2017; Subasinghe *et al.*, 2001). O rápido desenvolvimento em todos os sectores da aquacultura traz novos desafios, principalmente, na diversificação de espécies, bem como nas técnicas de maternidade e desenvolvimento larvar (Brundu *et al.*, 2017; Subasinghe *et al.*, 2001). É de salientar que a aquacultura é um setor económico cujas potencialidades devem ser valorizadas, tanto em termos económicos como sociais, podendo dar um contributo positivo para a criação ou manutenção de postos de trabalho a nível local ou regional, quer na operação direta, quer na cadeia de valor, contribuindo para o aproveitamento dos recursos endógenos (DGRM, 2014).

A produção de ouriços-do-mar em cativeiro iniciou-se na década de 60, no Japão, com a espécie *Pseudocentrotus depressus* e, seguidamente, mais quatro espécies edíveis (Anexo 1). Este passo na produção de ouriços-do-mar em aquacultura iniciou-se ao abrigo de programas de melhoramento dos

recursos pesqueiros, que contribuíram para o desenvolvimento de metodologias de produção em massa de ovos fertilizados e cultivo de juvenis (Azad *et al.*, 2010; Brundu *et al.*, 2016; Brundu *et al.*, 2017).

Inicialmente, os juvenis ou semente de equinodermes eram recolhidos em meio selvagem, através da utilização de tubos de policloreto de vinil (PVC), mas este provou ser um método pouco fiável, apresentando flutuações de colheitas anuais que podiam variar entre 100 mil e 4 milhões de sementes colhidas (Unuma *et al.*, n.d.). Em 1984, o Japão atingiu uma produção anual de 90 milhões de juvenis devido ao aperfeiçoamento metodológico e tecnológico e ao crescente número de maternidades destinadas à produção de sementes de equinodermes, atingindo as 42 instalações em 2009, 29 das quais localizadas em Hokkaido (Unuma *et al.*, n.d.). Atualmente, os restantes países envolvidos na produção de ouriços-do-mar em aquacultura estão a repetir o padrão de investigação inicial observado no Japão, pois o fornecimento consistente de um produto de qualidade é essencial para o mercado das gónadas de ouriço-do-mar (Fabbrocini & D'Adamo, 2010; McBride, 2005).

Neste panorama, o sucesso da aquacultura de ouriços-do-mar está diretamente associado à otimização da sobrevivência de todas as fases do ciclo de vida destes organismos, visando uma produção totalmente independente das populações naturais (Azad *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007). Não obstante esta atividade ter início nos anos 60 no Japão, os restantes países continuam a apresentar um compromisso muito precoce e a investigação tem-se focado, principalmente, no desenvolvimento de rações para o crescimento de animais adultos na tentativa de obter uma produção gonadal acelerada, desviando assim a atenção do aperfeiçoamento de protocolos de produção das fases larvares e juvenis (Azad *et al.*, 2010; Brundu *et al.*, 2016; McBride, 2005; Liu *et al.*, 2007).

1.3. Biologia da espécie

Os ouriços-do-mar comuns *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) é, tal como as outras espécies de ouriços-do-mar, organismos invertebrados bentónicos, não segmentados. O corpo, esférico, apresenta simetria penta radiada em torno do eixo radial (eixo oral-aboral), é deprimido e revestido por espinhos grandes e fortes. A coloração no *P. lividus* é variável, abrangendo o

verde, violeta, violeta escuro, acastanhado, entre outras. É de notar que os exemplares *P. lividus* de cor violeta escuro podem distinguir-se da espécie coocorrente *Arbacia lixula*, pela cor e pelas dimensões mais reduzidas do perístoma (McBride, 2005; Saldanha & Sacarrão, 2003).

1.3.1. Distribuição geográfica e caracterização do habitat

A espécie *P. lividus* distribui-se por todo o mar Mediterrâneo e Atlântico Nordeste, desde a Escócia até ao sul de Marrocos, incluindo os arquipélagos dos Açores, Madeira e Canárias. A sua ocorrência é mais comum nas regiões em que a temperatura do mar varia entre os 10 °C e 15 °C no inverno e dos 18 °C aos 25 °C no verão, tal como no mediterrâneo ocidental, Portugal e no Golfo da Biscaia (Boudouresque & Verlaque, 2007). Esta ocorrência, na ilha da Madeira, não se traduz em elevadas densidades populacionais. De facto, esta espécie encontra-se em poucos locais da costa sul da ilha e em baixas densidades populacionais (Alves *et al.*, 2001).

O ouriço-do-mar comum é, tipicamente, intertidal podendo ser encontrado nas zonas de maior hidrodinamismo nos níveis superiores do infralitoral e em cavidades na rocha das poças-de-maré do mediolitoral, podendo estas serem criadas pelos próprios, evitando assim a pressão predatória e a deslocação pelo elevado hidrodinamismo. O limite superior é restringido pela dessecação (Boudouresque & Verlaque, 2007; Saldanha & Sacarrão, 2003).

A movimentação livre, sobre a superfície das rochas revestidas pela biocenose de algas fotófilas, pode ser observada entre os 12 e 13 metros de profundidade (infralitoral), onde já não é afetado pelos movimentos da água, ocorrendo também no circalitoral (Saldanha & Sacarrão, 2003). A sua presença em fundos arenosos e sedimentares é pouco comum e, se presentes, formam aglomerados em rochas isoladas (Boudouresque & Verlaque, 2007).

Os ouriços-do-mar exibem, frequentemente, pequenas migrações circadianas entre os abrigos e zonas de alimentação. As populações atlânticas e mediterrânicas de *P. lividus*, normalmente, exibem esta atividade no período noturno. No entanto, este comportamento pode ser alterado sendo possível a observação de atividade diurna, estando esta inversamente correlacionada com a presença dos principais predadores, por sua vez, noturnos. Esta alteração de

comportamento pode ser associada à possível aprendizagem por parte dos ouriços-do-mar, através da quimiorreção dos fluidos celómicos de indivíduos danificados. Assim, a associação dos níveis de luminosidade com a atividade predatória induz a adoção de padrões de atividade oposta à dos predadores (Boudouresque & Verlaque, 2007).

Relativamente à qualidade da água, esta espécie aparenta ser insensível à poluição orgânica, de facto, tais compostos claramente aumentam o seu desenvolvimento, pois diferentes populações podem ser observadas em baías poluídas e perto de descargas de esgotos urbanos, onde a sua densidade é significativamente maior a poucas centenas de metros destes locais (Boudouresque & Verlaque, 2007). No entanto, ensaios experimentais mostram que os ouriços-do-mar são altamente sensíveis à presença de concentrações de amónia (NH_3^+) observadas na prática da aquariofilia, não excluindo que, pelo menos em poças-de-maré, os derrames de petróleo causam mortalidades de 100% (Boudouresque & Verlaque, 2007).

1.3.2. Anatomia/Morfologia

O corpo *P. lividus* apresenta dois polos distintos, o polo oral e aboral. No primeiro observam-se o perístoma e a boca, ou Lanterna de Aristóteles, composta por cinco dentes. Esta é coberta por uma membrana que permite a protrusão dos dentes e o movimento dos espinhos mais curtos. Por outro lado, o polo aboral compreende a zona anal, onde são libertados os produtos de excreção através do periprocto e os gâmetas pelos gonóporos, localizados nas placas genitais, como também a entrada para o sistema vascular aquífero, a placa madreporica (Figuras 2 e 4) (Harris & Eddy, n.d.; McBride, 2005).

O endosqueleto, de carbonato de cálcio (CaCO_3), é dividido alternadamente em cinco placas ambulacrárias e cinco placas interambulacrárias (simetria penta radiada). Ambas apresentam protuberâncias, designadas por tubérculos (Figuras 2 e 3), servindo como inserção da base dos espinhos. Estes são controlados por músculos e são utilizados para proteção, locomoção e captura de alimento (McBride, 2005; Pinsino & Matranga, 2015; Saldanha & Sacarrão, 2003). Nas placas interambulacrárias localizam-se os pés ambulacrários com formato tubular e, na extremidade, ventosas bem

desenvolvidas para a fixação e locomoção (Figuras 2, 3 e 4). Estes têm a faculdade de detetar a presença de químicos na água, capacidade de absorção de oxigénio (O₂) e sensibilidade ao toque. Estas estruturas também são utilizadas na limpeza corporal e captura de alimento, conjuntamente com os espinhos e pedicelários (Figuras 2 e 3) (McBride, 2005).

O sistema circulatório dos equinodermes é aberto e designa-se por sistema vascular aquífero (SVA) (Figura 4). O SVA é estrutural e fisiologicamente especializado no desempenho das funções típicas do sistema vascular dos vertebrados superiores, assim como no controlo da pressão hidrostática, necessária para a utilização dos pés ambulacrários, a respiração, alimentação, reprodução e excreção (Pinsino & Matranga, 2015). O trato digestivo é longo e em espiral, sendo composto por uma faringe, esófago, estômago, intestino e reto, terminando o último no periprocto (Figuras 3 e 4) (Harris & Eddy, n.d.).

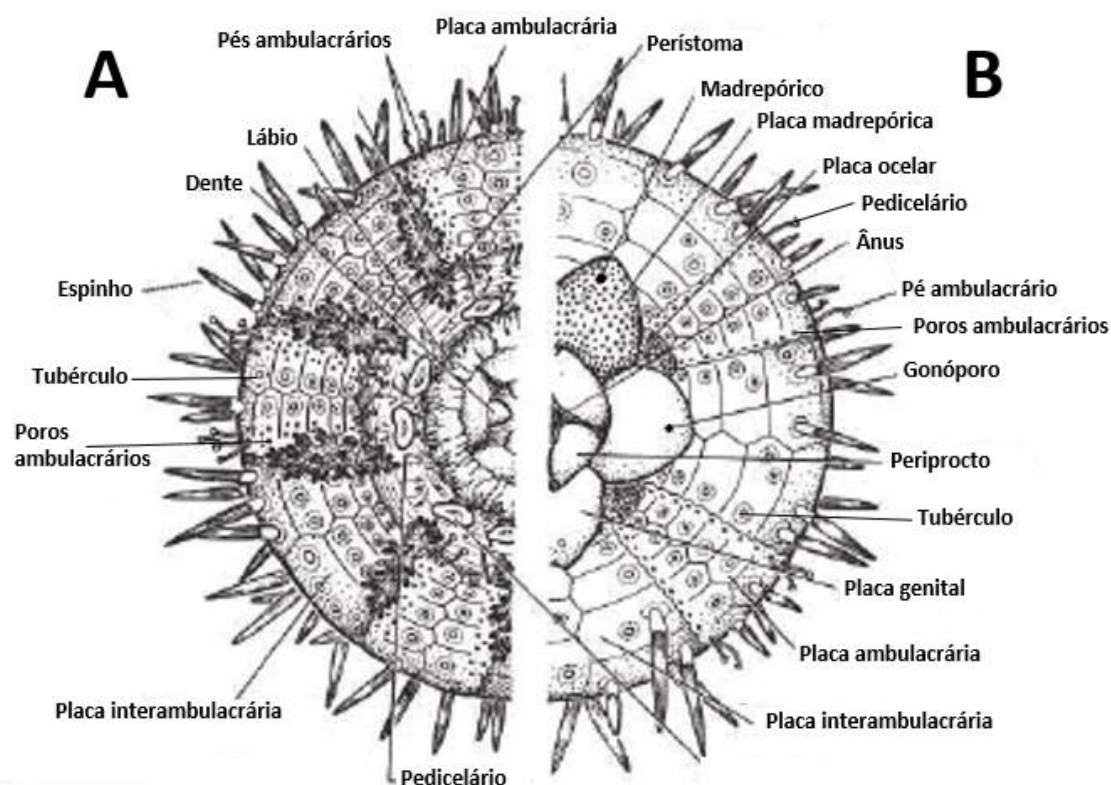


Figura 2: Anatomia externa geral dos ouriços-do-mar, representando os polos oral (A) e aboral (B) dos ouriços-do-mar. (Adaptado de: Dorey, 2013)

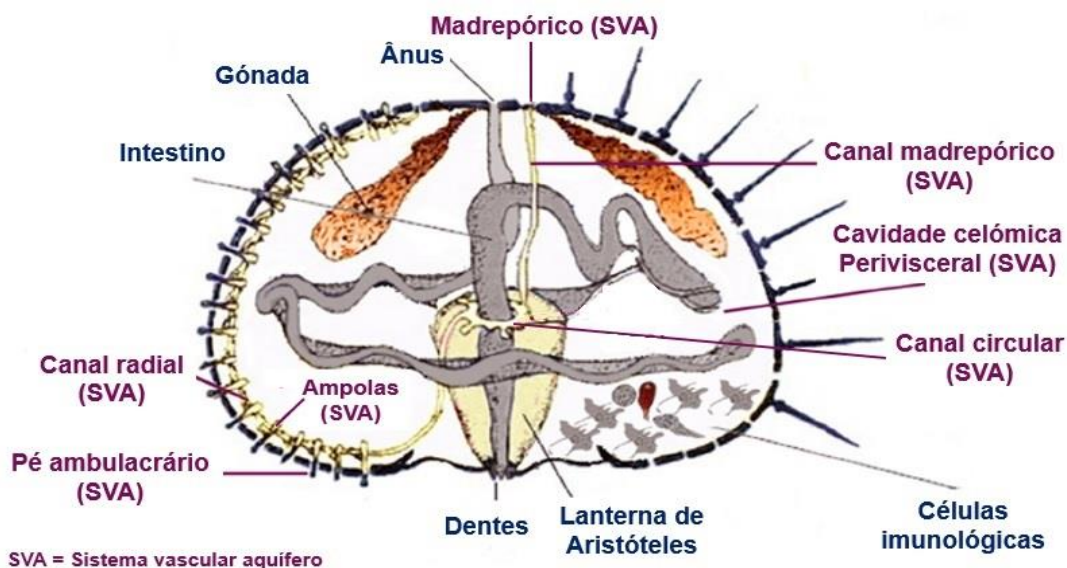


Figura 3: Anatomia interna dos ouriços-do-mar. Corte no plano radial. A ilustração esquemática destaca o sistema vascular aquífero (SVA) a violeta e as restantes estruturas a azul. (Adaptado de: Pinsino & Matranga, 2015)

1.3.3. Ciclo de vida do *Paracentrotus lividus*

O ciclo de vida dos ouriços-do-mar compreende diferentes fases larvares e uma fase adulta (Brundu *et al.*, 2017). A reprodução é sexuada, são organismos dioicos, apesar do hermafroditismo já ter sido observado (Boudouresque & Verlaque, 2007; Byrne, 1990; Spirlet, Grosjean & Jangoux, 1998), e não apresentam dimorfismo sexual, querendo isto dizer que a sua distinção apenas se torna possível durante a libertação dos gametas. Geralmente, os óvulos e espermatozoides são libertados diretamente na coluna de água seguida pela fecundação externa, originando larvas planctónicas. Estas apresentam desenvolvimento indireto, alterando a sua morfologia com o desenvolvimento de dois pares de braços adicionais aos iniciais, passando pelas fases de dois, três e quatro pares de braços, designando-se por equinopluteus. As fases larvares envolvem o crescimento somático, incluindo o desenvolvimento do rudimento no lado esquerdo do estômago, durante a fase de 4 pares de braços (Boudouresque & Verlaque, 2007; McEdward & Miner, 2007). Neste período, a competência larvar para o assentamento é alcançada quando o rudimento atinge o tamanho do estômago e se observam os primeiros espinhos e pés ambulacrários a emergir desta estrutura (Harris & Eddy, n.d.). O assentamento é induzido em resposta às condições ambientais que assinalam a disponibilidade de condições

bentónicas adequadas (substrato) a este processo. O desenvolvimento após o assentamento envolve o crescimento somático e maturação sexual dos adultos (Boudouresque & Verlaque, 2007; McEdward & Miner, 2007).

Na espécie *P. lividus* sabe-se que, *in vitro*, a maturação sexual ocorre entre os 13 e 20 milímetros (mm) de diâmetro, correspondendo a um período de 5 meses após nascimento, *in situ* esta maturação ocorre mais tarde (Cellario & Fenaux 1990). A análise histológica das gonadas indica a existência de um ciclo gametogénico anual, com um ou dois picos sazonais de desova (Lozano *et al.*, 1995), apesar de ser possível a ocorrência de indivíduos adultos com gónadas maduras durante o ano inteiro (Boudouresque & Verlaque, 2007; Byrne, 1990). Em geral, sabe-se que a temperatura da água do mar entre os 18 e 22 °C, fotoperíodo curto (inverno) e a disponibilidade elevada de alimento adequado favorecem a gametogénese nos ouriços-do-mar (Boudouresque & Verlaque, 2007; Byrne, 1990; Gago *et al.*, 2003).

A desova realiza-se nos machos e fêmeas em simultâneo, no entanto, este episódio nunca envolve todos os indivíduos da mesma população, por se encontrarem em estados de maturação distintos e, independentemente de as populações demonstrarem um ou mais picos de desova ao longo do ano, existem estudos que demonstram que a desova pode ocorrer durante o ano inteiro, mas em menor percentagem (Boudouresque & Verlaque, 2007; Lozano *et al.*, 1995).

1.3.3.1. Gametogénese

Nos ouriços-do-mar, as gónadas têm duas funções complementares, o armazenamento de nutrientes e a gametogénese. As gónadas crescem em tamanho, não só pelo desenvolvimento dos gâmetas, mas também pela presença de células somáticas, os fagócitos nutritivos (*nutritive phagocytes*, NP), que armazenam reservas nutritivas antes de se dar o início da gametogénese (Walker *et al.*, 2007).

Durante o ciclo gametogénico, as gónadas de ambos os sexos atravessam uma série de alterações estruturais. Estas alterações podem ser classificadas de acordo com a atividade das duas principais classes celulares do epitélio germinativo, as células germinativas e os fagócitos nutritivos (ver secção 2.3.), por isso é importante que o sistema de identificação do estado reprodutivo nos ouriços-do-mar considere ambas as populações celulares, reconhecendo assim

que o tamanho das gónadas nestes organismos não está exclusivamente relacionado com o processo de gametogénese (Walker *et al.*, 2007).

Os NPs são células somáticas muito versáteis que fornecem um microambiente estrutural e nutricional para as células germinativas durante a gametogénese. Esta versatilidade permite que os NPs apresentem células germinativas em diferentes fases e, simultaneamente, fagocitar gâmetas residuais. Por isso, é assumido que os NPs são capazes de reconhecer os diferentes estádios das células germinativas e de reagir de acordo, pois erros neste reconhecimento podem originar gonadas estéreis (Ghisaura *et al.*, 2016; Walker *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que a administração de alimento em abundância aos ouriços-do-mar após a desova resulta no crescimento substancial dos NPs em ambos os sexos. Este crescimento é o responsável pelo aumento do tamanho das gónadas, que permite atingir índices gonadosomáticos (IG) superiores a 20%. Se os ouriços-do-mar permanecerem sob um regime de racionamento *ad libitum* durante a pré-gametogénese, os NPs continuarão a crescer e, portanto, resultará em gonadas maiores (Walker *et al.*, 2007).

Como a maioria das culturas preferem gónadas que contêm menor número de gâmetas relativamente aos NPs, o conhecimento mais profundo da gametogénese nos ouriços-do-mar deverá possibilitar a manipulação dos diversos estádios de modo a, por um lado, suprimir este processo para a produção de gónadas de alta qualidade para consumo ou, por outro lado, promover a gametogénese para a produção de lotes de semente de ouriços-do-mar (Walker *et al.*, 2007).

1.3.3.2. Desenvolvimento larvar

O desenvolvimento larvar pode ser descrito através de três características, o modo de nutrição (lecitotrófica ou planctotrófica), tipo de ambiente (pelágico ou bentónico) e tipo de metamorfose (larva simples, complexa ou inexistência de larva) (McEdward & Miner, 2007). A espécie *P. lividus* apresenta larvas pluteus (equinopluteus) pelágicas e planctotróficas restritas, sendo este o padrão mais comum entre as espécies de ouriços-do-mar edíveis (McEdward & Miner, 2007).

A larva equinopluteus é uma larva complexa que, tipicamente, progride por quatro fases distintas: fase piramidal pluteus, 2, 3 e 4 pares de braços (Figura 4:

A; B; C, respetivamente), suportados por um esqueleto calcário. Nestes, existem estruturas ciliadas (bandas de cílios) responsáveis pela natação e captação de alimento (Kelly, *et al.*, 2000). Durante o desenvolvimento larvar, as bandas ciliadas crescem, acompanhando o desenvolvimento do 3º e 4º pares de braços. Assim, a capacidade de captação de alimento aumenta de forma a satisfazer os requerimentos nutricionais dos diferentes estados larvares (Kelly *et al.*, 2000).

A fase larvar planctónica tem uma duração estimada de 30 dias, mas esta duração está dependente da espécie e condições ambientais, tais como a temperatura e disponibilidade de alimento (Boudouresque & Verlaque, 2007; Harris & Eddy, n.d.). De facto, em condições *in vitro*, este período pode ser reduzido aos 14 a 19 dias em condições de alimentação adequadas (Boudouresque & Verlaque, 2007). Após o assentamento segue-se o desenvolvimento da forma adulta, através da degradação das estruturas larvares, que se incorporam no rudimento ou em reservas energéticas. Nesta fase, o estado nutricional das larvas pré-assentamento, pode influenciar o desenvolvimento e sobrevivência pós-assentamento. A sobrevivência de ouriços-do-mar recentemente assentes pode ser inferior a 1% (Harris & Eddy, n.d.).

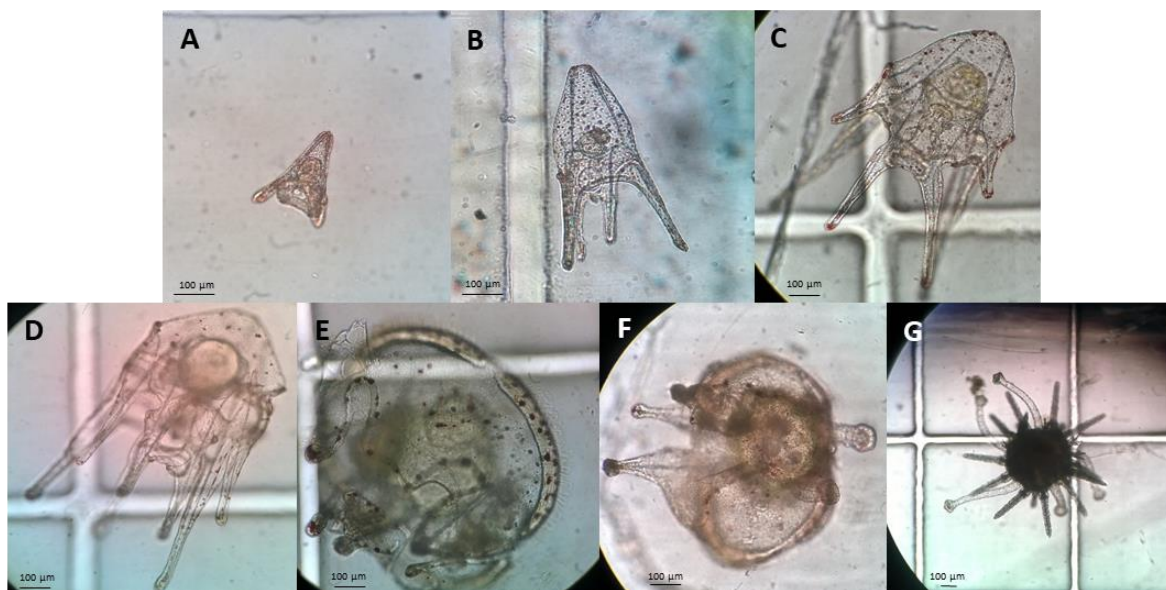


Figura 4: Representação esquemática das diferentes fases larvares e assentamento de *Paracentrotus lividus*. **A:** Fase piramidal; **B:** Fase 2 pares de braços (4b); **C:** Fase 3 pares de braços (6b); **D:** Fase 4 pares de braços (8b); **E:** Fase 4 pares de braços (8b) avançada; **F:** Pré-metamorfose; **G:** Juvenil recém assente. (Fonte: fotografia pessoal, 2018)

1.3.4. Alimentação e nutrição

Os ouriços-do-mar adultos alimentam-se utilizando uma complexa boca conhecida como Lanterna de Aristóteles. Os dentes apresentam dureza suficiente para que sejam capazes de mastigar através de materiais resistentes, tais como as coberturas de plástico de covos; erodir as superfícies de algas coralinas e formar buracos na rocha (Harris & Eddy, n.d.). A maioria das espécies de ouriço-do-mar são omnívoras e, de facto, beneficiam das dietas mistas que oferecem elevadas percentagens de proteína, em oposição às dietas estritamente vegetarianas. *In loco*, as fontes de proteína podem provir de macroalgas, pequenos crustáceos e também da alimentação oportunista de vertebrados mortos (Harris & Eddy, n.d.).

No estômago, são produzidas enzimas capazes de digerir proteínas, carboidratos e lípidos. A maioria das espécies apresentam preferência por macroalgas, demonstrando eleição por espécies distintas, apesar da disponibilidade destas ser um fator fundamental neste comportamento. Quando as macroalgas estão presentes, os ouriços-do-mar alimentar-se-ão continuamente e, nestas condições, o tempo de passagem da matéria

consumida pelo trato digestivo pode variar entre as 8 e as 12 horas (h) (Harris & Eddy, n.d.; Lawrence, 2001). Por outro lado, em condições limitantes de alimentação, a velocidade de passagem da matéria consumida reduz-se ao ponto de serem observados ouriços-do-mar em regime de jejum, a libertar fezes durante duas semanas (Harris & Eddy, n.d.; Lawrence, 2001).

Nas fases larvares, como se tratam de larvas (ou equinopluteus) planctónicas, necessitam de uma fonte de alimento exógeno, o fitoplâncton. No meio ambiente, os equinopluteus alimentam-se destas células em suspensão na água circundante. As taxas de ingestão e seletividade de partículas dos equinopluteus são influenciadas pela concentração, sabor, temperatura, fase do desenvolvimento larvar e tamanho das partículas (Azad *et al.*, 2010; McEdward & Miner, 2007). Em laboratório, os equinopluteus ingerem preferencialmente partículas de 10 micrómetros (μm) quando comparado com partículas de 5 μm (McEdward & Miner, 2007).

Ensaio experimentais mostram que tratamentos de baixas concentrações de fitoplâncton, como também os de concentrações elevadas, apresentam efeitos negativos no desenvolvimento dos equinopluteus, estando considerado como óptimo as concentrações moderadas para taxas de desenvolvimento larvar máximas, situando-se entre as 1500 e as 9000 células. ml^{-1} (Azad *et al.*, 2010; McEdward & Miner, 2007). O rápido desenvolvimento larvar pode ser suportado através do cultivo de várias espécies de microalgas (McEdward & Miner, 2007), como por exemplo a *Dunaliella tertiolecta* (Azad *et al.*, 2011; Castilla-Gavilán *et al.*, 2018), *Isochrysis galbana* (Brundu *et al.*, 2016), *Phaeodactylum tricornutum* (Brundu *et al.*, 2016) e *Rhodomonas* sp. (Castilla-Gavilán *et al.*, 2018).

As microalgas são organismos unicelulares autotróficos, que podem situar-se entre os 2 μm e os 100 μm de tamanho. Como produtores primários, são o principal constituinte da base da cadeia trófica, o fitoplâncton, e é de fundamental importância para os estados larvares de muitas espécies marinhas (Ferreira, 2009). Várias espécies de fitoplâncton têm sido usadas tanto em condições de laboratório como em maternidades, mas poucos estudos têm abordado os efeitos específicos da administração de diferentes espécies de microalgas e regimes alimentares no crescimento e sobrevivência larvar dos equinodermes. No entanto, estudos feitos neste sentido evidenciam vantagens no desempenho do crescimento larvar, quando utilizadas as microalgas *Dunaliella tertiolecta*

(Castilla-Gavilán *et al.*, 2018) e *Rhodomonas lens* (Azad, *et al.*, 2011; Carboni *et al.*, 2012; Castilla-Gavilán *et al.*, 2018).

1.4. Objetivos do estudo

Este trabalho experimental tinha dois objetivos complementares. O primeiro objetivo estabelecido foi a seleção de um método de indução de desova de ouriços-do-mar provenientes das populações endémicas de *P. lividus* da ilha da Madeira, que permitisse a maior taxa de sucesso na quantidade de gâmetas libertados e sobrevivência dos indivíduos após a indução da desova. O segundo objetivo visou avaliar o efeito de duas dietas monoespecíficas de duas espécies de microalgas (*Dunaliella tertiolecta* e *Rhodomonas marina*) e em três concentrações diferentes e ajustadas ao desenvolvimento larvar. Em suma, este trabalho pretendeu definir um protocolo de produção de *P. lividus* de forma a maximizar a sobrevivência antes do assentamento.

2. Material e métodos

2.1. Recolha e manutenção dos espécimes

O grupo amostral foi composto por 80 indivíduos ($n=80$) da espécie *P. lividus* com tamanho corporal superior a 35 mm, capturados à mão, durante o mês de outubro de 2017. A amostragem realizou-se em poças-de-maré nas praias dos Reis Magos ($32^{\circ}38'44.24''\text{N}$; $16^{\circ}49'26.53''\text{W}$) e Poças do Governador ($32^{\circ}37'59.00''\text{N}$; $16^{\circ}56'36.33''\text{W}$), localizadas na costa sul da ilha da Madeira. Após a recolha, os indivíduos foram transportados para a área experimental do Centro de Maricultura da Calheta (CMC), em recipientes de 7 litros (L) contendo água do mar e arejamento.

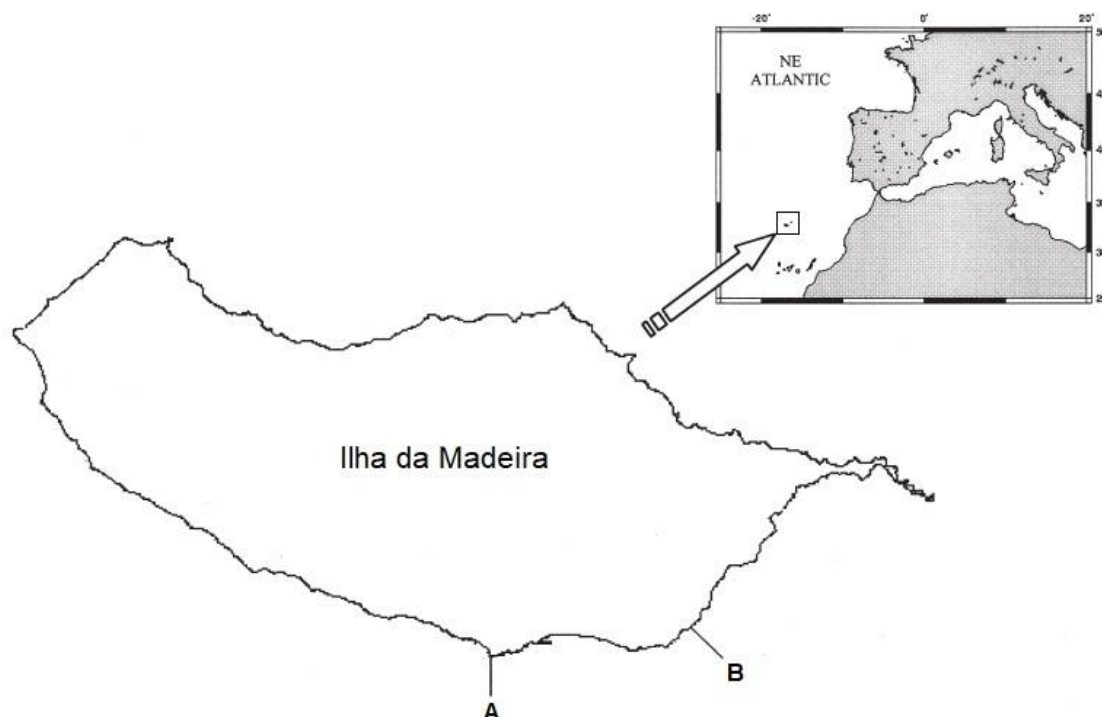


Figura 5: Localização da poças-de-maré da recolha do grupo amostral de *Paracentrotus lividus* adultos, destinados às experiências de indução. **A:** Poças do Governador; **B:** Reis Magos. (Adaptado de: Alves *et al.*, 2001)

No CMC, registaram-se os dados biométricos dos indivíduos, que compreendem as medições individuais do diâmetro corporal (D_c) e altura corporal (A_c) por meio de um paquímetro (DEXTER 0,02 mm), tal como o peso individual húmido (P_h) numa balança analítica (RADWAG WTC 600.1). Posteriormente, os ouriços-do-mar foram divididos em quatro grupos de 15

indivíduos e mantidos em tanques cilíndricos de 200 L (Figura 5) com água do mar filtrada (filtros de cartucho com porosidade de 50 μm , arejamento e renovação da água com um caudal de 90 L/h. Inicialmente (outubro), o fotoperíodo foi estabelecido nas 14h dia e 10h noite (14h D: 10h N), sendo alterado para 12h D: 12h N, em janeiro. Relativamente aos parâmetros da qualidade da água nos tanques, o oxigénio dissolvido (O_2) apresentou-se nos $6,90 \pm 0,01$ miligramas por litro (mg.L^{-1}); a temperatura (T) nos $22,05 \pm 0,70$ °C (registados com sonda multiparamétrica OxyGuard® HandyPolaris); pH = $8,16 \pm 0,02$ (medidor de pH Checker HANNA); salinidade = 37,5 (refratómetro de aquariofilia) e as concentrações de amónia (NH_3), nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) mantiveram-se a 0 mg.L^{-1} (Mcolortest: NH_3 <0.05 – 5mg/l; NO_3^- 10 – 500 mg/l; NO_2^- 0,025 – 0,5 mg/l).

A alimentação foi composta por uma mistura das macroalgas presentes nos locais da amostragem (ex.: *Asparagopsis armata*, *Codium tomentosum*, *Corallina* sp., *Ulva lactuca*), sendo administrada *ad libitum* em dias alternados. A espécie de macroalga em maior proporção (> 80%) na mistura foi a *A. armata*.



Figura 6: Tanques cilíndricos de 200L de manutenção do grupo amostral de *Paracentrotus lividus* capturados para as experiências de indução de desova (Fonte: fotografia pessoal, 2017).

2.2. Caracterização do estado de maturação

Do grupo amostral, foram aleatoriamente selecionados, 20 indivíduos ($n=20$) e registados os dados biométricos (D_c , A_c e P_h) e removidas as gónadas, colocando-as em papel até atingirem um peso húmido constante (Anexo 2) e pesadas (P_g) para o cálculo do índice gonadossomático (IG), de acordo com a seguinte fórmula (Byrne, 1990; Fabbrocini & D'Adamo, 2010):

$$IG(\%) = \left(\frac{P_g}{P_h} \right) \times 100$$

2.2.1 Histologia

A identificação histológica do estado de maturação dos indivíduos amostrados baseou-se na escala de maturação definidas por Byrne (1990) que descreve o ciclo gametogénico em seis estádios:

Estádio I – fase de recuperação: Neste estágio, observam-se os gâmetas primários ou pré-vitelinos (5 a 30 μm de diâmetro) junto à parede ascial e os fagócitos nutritivos formam uma rede no lúmen da gónada.

Estádio II – fase de crescimento: Com o decorrer da vitelogénese, os gâmetas pré-vitelinos aumentam de tamanho (10 a 50 μm de diâmetro) e permanecem juntos à parede ascial da gónada, rodeados por fagócitos nutritivos.

Estádio III – fase de pré maturação: Neste momento, já é possível observar gâmetas em todas as fases de desenvolvimento (10 a 90 μm de diâmetro). Os gâmetas de maiores dimensões separam-se da parede ascial e projetam-se para o centro do lúmen, deslocando os fagócitos nutritivos da sua posição central.

Estádio IV – fase de maturação: Esta fase corresponde à pré desova e as gónadas encontram-se cheias de gâmetas grandes (90 μm de diâmetro) e densamente compactados, observando-se poucos gâmetas pequenos (10 a 60 μm de diâmetro) ao longo da parede ascial. Neste período, os fagócitos nutritivos encontram-se ausentes ou formam uma camada muito fina na parede ascial.

Estádio V – desova parcial: As gónadas parcialmente desovadas apresentam os gâmetas dispersos pelo lúmen, observando-se os espaços deixados pelos gâmetas já libertados, como também a presença de gâmetas no oviduto. Morfologicamente, este é o estágio mais variável e algumas gónadas podem conter, simultaneamente, gâmetas em todas as fases de desenvolvimento. Por outro lado, algumas gónadas podem conter apenas gâmetas de grandes dimensões, como descrito para o estágio IV.

Estádio VI – vazios: As gónadas vazias caracterizam-se por exibirem paredes asciais finas, de aparência vazia e uma rede de fagócitos nutritivos lassa ou ausente. O número e tipo de gâmetas presentes neste estágio é variável, podendo ser possível a existência de poucos gâmetas que não foram libertados, vestigiais ou, por outro lado, completamente ausentes.

Assim, neste estudo, os indivíduos amostrados foram caracterizados como **adultos aptos** para desova por indução (gónadas com gâmetas maduros) e **adultos não aptos** para desova por indução (gónadas sem gâmetas maduros). Tendo em conta este objetivo, os diferentes estádios foram organizados em três fases principais, refletindo assim a tendência do estado reprodutivo populacional:

1) Fase de crescimento - correspondente aos períodos de outono e inverno, quando as gónadas acumulam material de reserva (**adultos não aptos**), aqui enquadram-se os estádios I e II acima descritos (Tabela I).

2) Fase de maturação e postura parcial - esta compreende a primavera e verão, período correspondente à gametogénese e reprodução (**adultos aptos**), abrangendo os estádios III, IV e V anteriormente descritos (Tabela I).

3) Fase vazia/pós-desova – nesta fase, os gâmetas residuais são reabsorvidos pelos fagócitos nutritivos após a época reprodutiva e as gónadas apresentam-se desprovidas de células sexuais (**adultos não aptos**), compreendendo o estágio VI e a transição para o estágio I previamente descritos (Tabela II).

Tabela I: Estádios de maturação das gónadas em *Paracentrotus lividus* descritos por Byrne (1990) e os estádios simplificados, utilizados na avaliação histológica do estado de maturação do grupo amostral de ouriços-do-mar adultos.

Estádios (Byrne, 1990)	Estádios simplificados
I – Recuperação	1) – Pré-desova (Crescimento)
II – Crescimento	Adulto não apto para desova
III – Pré maturação	2) – Desova (Gametogénese)
IV - Maturação	Adulto apto para desova
V – Desova parcial	3) – Pós-desova (Regeneração)
VI - Vazios	Adulto não apto para desova

2.2.2. Fixação de tecidos

Após a recolha, as amostras (terço central das gónadas, anexo 2) foram fixadas em formol tamponado a 4% durante, pelo menos, um período de 24h.

2.2.3. Processamento de tecidos

Para a desidratação e inclusão em parafina, utilizou-se um processador de tecidos automático (Tissue Tek – VIP 5 Jr), no qual foi programado um protocolo de 11h de passagem das amostras em diferentes concentrações de álcool, xilol e parafina (Anexo 3).

2.2.4. Cortes histológicos

Após a montagem das amostras em blocos com parafina, procedeu-se aos cortes histológicos de 5 µm de espessura com o auxílio de um micrótomo (Leica – RM 2025). Os cortes foram montados nas lâminas de vidro em banho-maria de água destilada aquecida a 37°C e, posteriormente, corados de acordo com o procedimento descrito no ponto que se segue.

2.2.5. Coloração ácido periódico - Schiff (PAS)

O processo de coloração iniciou-se com a desparafinação e reidratação das lâminas, através de banhos sucessivos em tinas de vidro com xilol e álcool a diferentes concentrações (Anexo 3.1.). Seguidamente, as preparações foram oxidadas em ácido periódico, passando também pelo reagente de Schiff e hematoxilina nº 3 Gill. Cada conjunto de banhos seguiu uma sequência de tempos pré-determinada, finalizando o procedimento com uma lavagem e reidratação das lâminas (Anexo 3.1.). Após a coloração, as lâminas foram finalizadas com uma lamela de vidro em meio de montagem (Neo-Mount).

2.3. Experiências de indução de desova

Neste trabalho, avaliaram-se quatro metodologias de indução distintas, a injeção de cloreto de potássio (KCl) a 0,5M na cavidade celómica (I1), a agitação dos ouriços-do-mar (I2), adição de microalgas (I3) e a adição de gâmetas coespecíficos (I4). Nos ensaios de indução foram, utilizados 15 indivíduos, 10 submetidos a cada metodologia e 5 usados como grupo de controlo. Todos os indivíduos submetidos às metodologias de indução foram avaliados individualmente em recipientes de vidro de 1L para as induções por injeção de KCl 0,5M, agitação, e adição de gâmetas coespecíficos (Figura 6B). A indução por adição de microalgas realizou-se em aquários de 12L (Figura 6C). Após uma lavagem com água do mar para a remoção de detritos e outros organismos marinhos, os ouriços-do-mar foram transportados da área experimental para o laboratório do CMC num tabuleiro contendo água salgada do tanque de manutenção e uma toalha no fundo do tabuleiro, de modo a evitar a forte adesão

dos indivíduos ao tabuleiro de transporte (Figura 6A). Aqui, foram registados os dados biométricos (D_c , A_c e P_h).

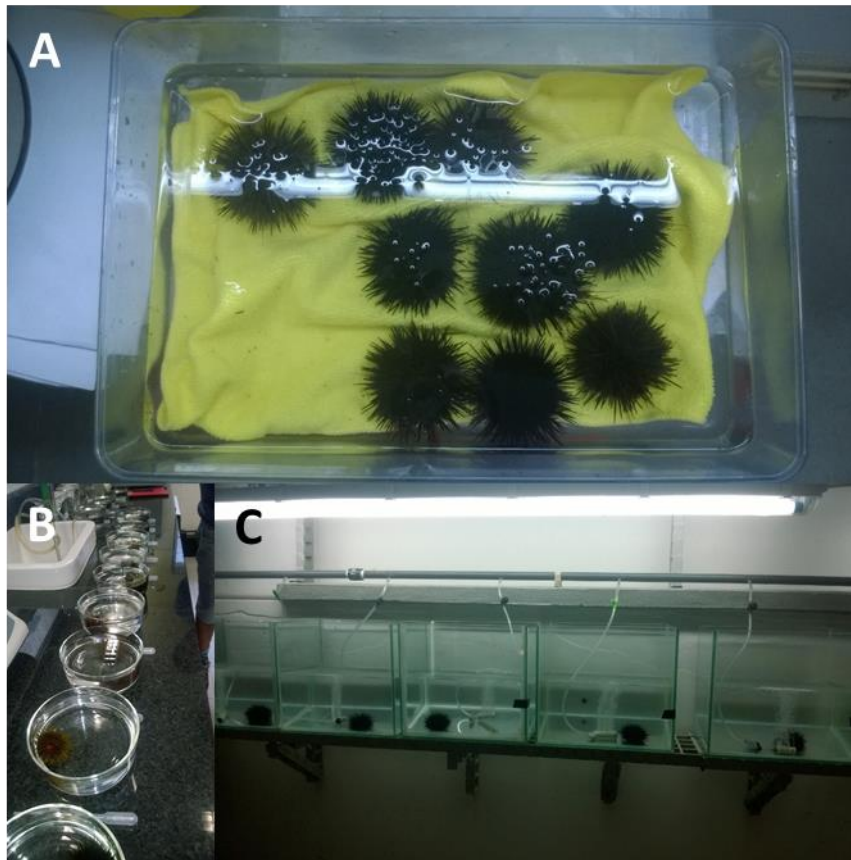


Figura 7: Recipientes para o transporte e experiências de indução de *Paracentrotus lividus*. **A:** Tabuleiro de transporte com toalha no fundo; **B:** Taças de vidro de 1L; **C:** Aquários de 12L. (Fonte: fotografia pessoal, 2017)

2.3.1. Indução por injeção de cloreto de potássio (KCl) 0,5M

O ensaio de indução por injeção de KCl processou-se, em termos logísticos e metodológicos, de acordo com o descrito na secção 2.3. Nesta experiência cada ouriço-do-mar foi injetado com 40 microlitros por grama ($\mu\text{l.g}^{-1}$) de uma solução de KCl a 0,5 molar (M). A injeção foi aplicada com uma seringa de 2 ml e agulha de 0,2 mm de espessura, introduzida através da membrana do perístoma, na cavidade celómica, orientada num ângulo de 45° para a periferia do corpo dos indivíduos, de modo a evitar a lanterna de Aristóteles e a aplicação inadvertida da solução de KCl no sistema digestivo.

2.3.2. Indução por agitação

Após o transporte para o laboratório do CMC e preparação (de acordo com a secção 2.3.) dos ouriços-do-mar, os indivíduos destinados à experiência foram agitados vigorosamente durante 1 minuto (Gago & Luís, 2011) e colocados, individualmente, em posição natural (face oral orientada para o fundo) nos recipientes de vidro contendo 800 mililitros (ml) de água do mar autoclavada, de modo a cobrir os indivíduos na totalidade e observou-se a resposta durante 30 minutos após a aplicação da metodologia. Para os casos positivos de libertação de gâmetas/desova, procedeu-se à homogeneização e quantificação dos gâmetas libertados ao microscópio ótico composto (MOC), com recurso a uma câmara de Malassez para os gâmetas masculinos e uma câmara de Sedgwick-rafter para os gâmetas femininos. O grupo de controlo não foi submetido à agitação. Aquando o término do período da experiência, todos os indivíduos foram devolvidos ao tanque de manutenção, com separação entre o grupo induzido e controlo, registando-se a mortalidade durante um período de 5 dias.

2.3.3. Indução por adição de microalgas

Após a preparação do grupo de indução (de acordo com a secção 2.3.), os ouriços-do-mar foram colocados, individualmente, em aquários com 12 L de água do mar previamente filtrada, esterilizada com hipoclorito de sódio (NaClO) e arejamento moderado. Esta experiência realizou-se mediante a adição da microalga *Nannochloropsis oculata*, numa concentração de 8000 células por litro (cél.L⁻¹). A avaliação deste ensaio teve uma duração de 5 dias onde foram registados os resultados de indução assim como os parâmetros da qualidade da água (O₂, T, pH, salinidade e amónia). Durante a duração da experiência procedeu-se à renovação de 50% da água em dias intercalados. Após o término do tempo da experiência, todos os indivíduos foram devolvidos ao tanque de manutenção, com divisão entre o grupo induzido e controlo, registando-se a mortalidade durante um período de 5 dias.

2.3.4. Indução por adição de gâmetas espermatozoides coespecíficos

Em termos logísticos e metodológicos, o ensaio por adição de gâmetas coespecíficos organizou-se de acordo com descrito na secção 2.3. No entanto, este ensaio caracterizou-se por ser necessária a aplicação prévia da técnica de indução descrita na secção 2.3.1., para a obtenção dos gâmetas necessários à realização do presente ensaio. A recolha dos espermatozoides realizou-se com recurso a uma pipeta de Pasteur, diretamente de um ouriço-do-mar induzido com injeção de KCl 0,5M, e aplicou-se 1 ml da solução concentrada, a todos os indivíduos do grupo de indução por adição de gâmetas coespecíficos. Após o término do tempo de ensaio, todos os indivíduos foram devolvidos ao tanque de manutenção, com divisão entre o grupo induzido e controlo, registando-se a mortalidade durante um período de 5 dias.

2.4. Cultivo de microalgas

A seleção das espécies a produzir deve ser feita de acordo com a aceitabilidade, digestibilidade e necessidades nutricionais das larvas, devendo também ter em conta a dimensão das células, o fácil cultivo em sistemas simples, a taxa de crescimento, capacidade de manutenção da biomassa, ausência de produção de metabolitos tóxicos e que o ciclo de vida esteja dominado em laboratório (Carboni *et al.*, 2012; Ferreira, 2009).

Neste trabalho experimental a produção e manutenção das microalgas baseou-se no método de volumes limitados ou *batch*, isto é, o volume inicial é igual ao volume final, onde não é acrescentado meio novo ao cultivo, reduzindo assim os riscos de contaminação (Ferreira, 2009). As microalgas utilizadas nos ensaios larvares foram mantidas em volumes intermédios de 4 L, fotoperíodo de 24h e à temperatura de $17 \pm 1^\circ\text{C}$, na sala de manutenção de microalgas do CMC. Para tal, utilizou-se balões de vidro com capacidade de 5 L e as culturas foram renovadas semanalmente, garantindo que o inóculo dos novos cultivos se apresentasse bem concentrado, mas em fase de crescimento. Por cada inoculação utilizou-se 3 L de água do mar filtrada e autoclavada a 121°C durante 15 minutos, 2 ml.L^{-1} de nutriente de formulação comercial (Nutribloom ©) e 800 ml de inóculo da espécie pretendida. Este procedimento foi executado sempre à chama.

2.5. Ensaios de desenvolvimento larvar

Para a realização dos ensaios larvares, procedeu-se à fertilização artificial dos gâmetas (solução-mãe) de ouriço-do-mar, obtidos com a metodologia de indução identificada como a mais expedita, a injeção de KCl 0,5M. Após a obtenção dos gâmetas (masculinos e femininos), procedeu-se à sua contagem de modo a utilizar um rácio de 500 espermatozoides por cada oócito (500:1) na fecundação, em água do mar filtrada e autoclavada (Ramos, 2017). Duas horas depois da mistura dos gâmetas determinou-se a taxa de fecundação. A solução-mãe foi mantida num copo graduado de vidro de 800 ml, com arejamento suave (1 a 2 bolhas de ar por segundo) e $T = 18,95 \pm 0,35^\circ\text{C}$, até as larvas atingirem

a fase piramidal de pluteus. Nesta altura, procedeu-se a uma nova contagem de modo a determinar a densidade larvar para a inoculação das incubadoras cilindro-cónicas de 7 L contendo água do mar previamente filtrada e esterilizada com NaClO. Em todos os ensaios larvares o fotoperíodo ficou estabelecido nas 12h D: 12h N com arejamento baixo/moderado (3 a 4 bolhas de ar por segundo). Os parâmetros da qualidade da água foram registados diariamente, e as trocas parciais de água realizaram-se três vezes por semana com a troca de 10% da água das incubadoras (Inc.) cilindro-cónicas (Figura 7).

O desenho experimental compôs-se por três tratamentos em triplicado, de dietas monoespecíficas das microalgas *R. marina* e *D. tertiolecta*. O racionamento dos tratamentos estabeleceu-se nas 4000, 8000 e 16000 cél.ml⁻¹ (tratamentos T1, T2 e T3, respetivamente) (Tabela II). A densidade larvar foi de 2 larvas por mililitro (ind.ml⁻¹) ($n_{\text{inicial}} = 14000 \text{ ind.incubadora}^{-1}$) de acordo com Azad *et al.* (2010) e com controlo de temperatura ($21 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por meio de termostatos de aquariofilia para ambos os ensaios.

Tabela II: Concentrações de racionamento de microalga (*Dunaliella tertiolecta* e *Rhodomonas marina*) por tratamentos (T1; T2 e T3) e por fase larvar: larvas iniciais; 3 pares de braços (6b) e 4 pares de braços (8b).

		T1 (incubadoras 1, 2 e 3)	T2 (incubadoras 4, 5 e 6)	T3 (incubadoras 7, 8 e 9)
Dia 0 nas Incubadoras	Concentração inicial de CI (cél.ml⁻¹)	4000	8000	16000
Fase 6b	2 x CI (cél.ml⁻¹)	8000	16000	32000
Fase 8b	4 x CI (cél.ml⁻¹)	16000	32000	64000



Figura 8: Incubadoras cilindro-cônicas de 7L utilizadas nos ensaios larvares de *Paracentrotus lividus*. Tratamento **T1**: Incubadoras 1, 2 e 3; Tratamento **T2**: Incubadoras 4, 5 e 6; Tratamento **T3**: Incubadoras 7, 8 e 9. (Fonte: fotografia pessoal, 2017)

2.5.1. Desenvolvimento, crescimento e sobrevivência larvar

No ensaio larvar *R. marina*, Nas fases 4b e 6b foi recolhida uma amostra aleatória de 30 larvas por cada incubadora, para a medição das medidas biométricas comprimento total (CT), comprimento corporal (CC), largura corporal (LC), braço pós-oral (BP), comprimento do estômago (CE) (Figura 9) e determinação das fases larvares (4 braços: 4b; 6 braços: 6b; 8 braços: 8b, pré-metamorfose e ouriço assente). A taxa de sobrevivência foi calculada através da diferença entre o n inicial e n final de larvas em cada incubadora. No ensaio larvar *D. tertiolecta* as amostragens procederam-se do mesmo modo que anteriormente descrito. As larvas foram observadas e fotografadas ao MOC (Leica DMI8), e as medições executadas mediante a utilização do programa *Leica Application Suite X (LAS-X)*.

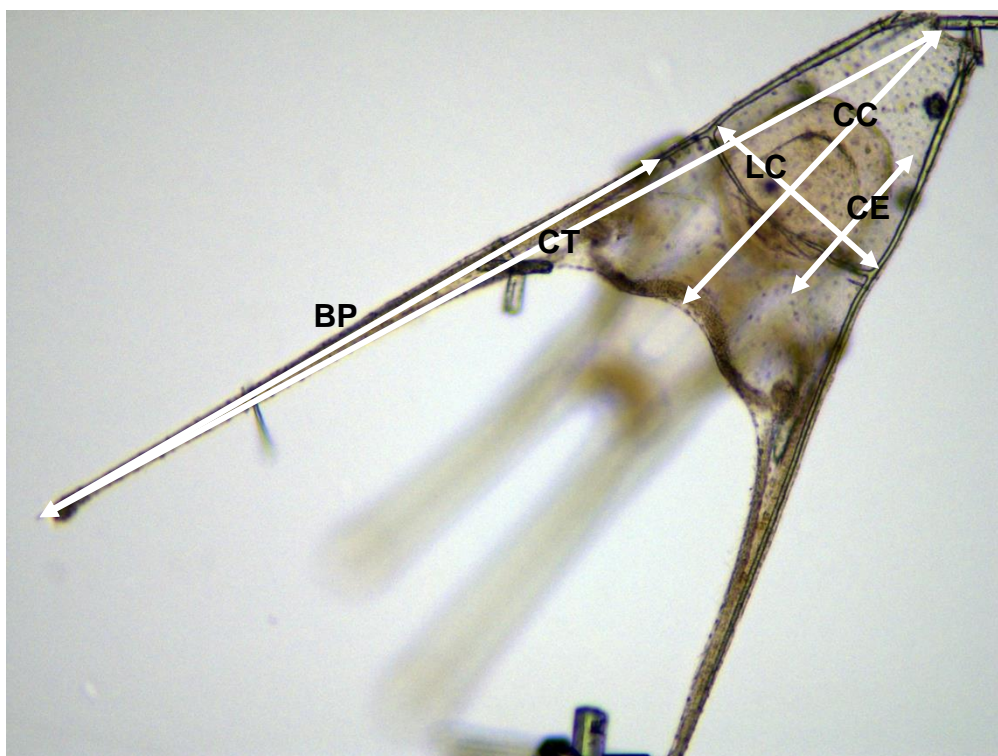


Figura 9: Larva equinopluteus de *Paracentrotus lividus* na fase 2 pares de braços (4b). Dados biométricos - Comprimento total: **CT**; Comprimento corporal: **CC**; Largura corporal: **LC**; Braço pós-oral: **BP**; Comprimento do estômago: **CE**. (Fonte: fotografia pessoal, 2018)

2.6. Análise estatística

Para avaliar a distribuição dos dados biométricos, parâmetros da qualidade da água, caracterização reprodutiva, resposta às diferentes metodologias de indução e taxas de sobrevivência, aplicou-se a **análise de variância** (ANOVA) de um fator ($F_{\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos}} = \text{valor}$; nível de significância p) sempre que se validaram os pressupostos da normalidade e homogeneidade ($F_{\text{levene}} = \text{graus de liberdade} = \text{valor}$; nível de significância p) dos dados. Perante o não cumprimento de, pelo menos, um dos pressupostos anteriores foi aplicado o teste não paramétrico **Kruskal-Wallis** ($H_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor}$; nível de significância p) (Zar, 2010). Quando aplicável, realizaram-se os testes *post-hoc* de comparações múltiplas *HSD-Tukey* e *Bonferroni* dependendo se os dados obedeceram a um planeamento equilibrado ou não. Os resultados foram expressos na forma média \pm desvio-padrão (DP), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} < 0,05$). A mesma metodologia estatística foi aplicada à análise da taxa de

sobrevivência e desenvolvimento larvar sob o efeito de duas dietas monoespecíficas a diferentes concentrações das microalgas *Rhodomonas marina* e *Dunaliella tertiolecta*. Toda a análise estatística foi executada com o programa *IBM SPSS Statistics 24*.

3. Resultados

3.1. Induções de desova em *P. lividus*

3.1.1. Determinação do estado de maturação da população

A amostra analisada histologicamente ($n = 20$) caracterizou-se pelos valores médios $D_C = 39,50 \pm 4,11$ mm, $A_C = 20,49 \pm 3,47$ mm, $P_h = 33,75 \pm 8,52$ g e $IG = 3,88 \pm 1,97\%$. A análise das secções histológicas das gónadas revelou que 40% ($n = 8$) dos indivíduos analisados eram machos e 60% ($n = 12$) eram fêmeas (Figura 10A). Relativamente ao estado de maturação das gónadas, 60% ($n = 12$) dos indivíduos encontravam-se na fase de pré-desova, 15% ($n = 3$) na fase de desova e 25% ($n = 5$) na fase de pós-desova (Figura 10B), indicando que 15% ($n = 3$) dos indivíduos foram classificados como adultos aptos para desovar e 85% ($n = 17$) classificados como adultos não aptos para a desova (Figuras 10C e 11). A análise estatística revelou não existirem diferenças significativas entre indivíduos no valor médio do IG ($F_{1,18} = 0,312$; $p > 0,05$), estado de maturação ($H_1 = 0,017$; $p > 0,05$) e aptidão para desova ($H_1 = 0,062$; $p > 0,05$) entre a categoria sexo.

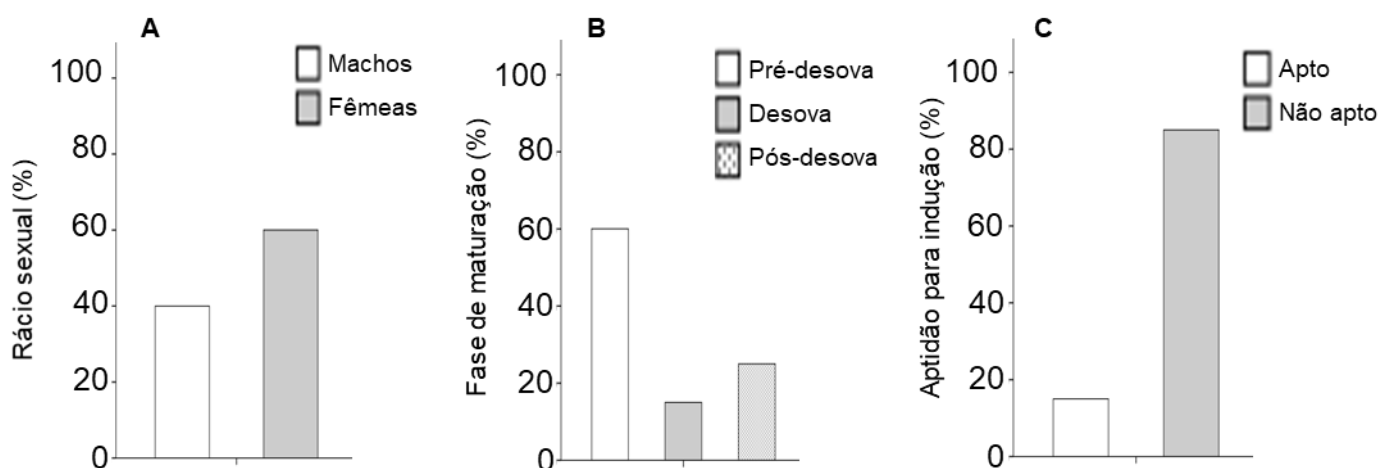


Figura 10: Rácio sexual (A), estado de maturação (B) e aptidão para indução (C), do grupo amostral de *Paracentrotus lividus* usados nas experiências de indução de desova.

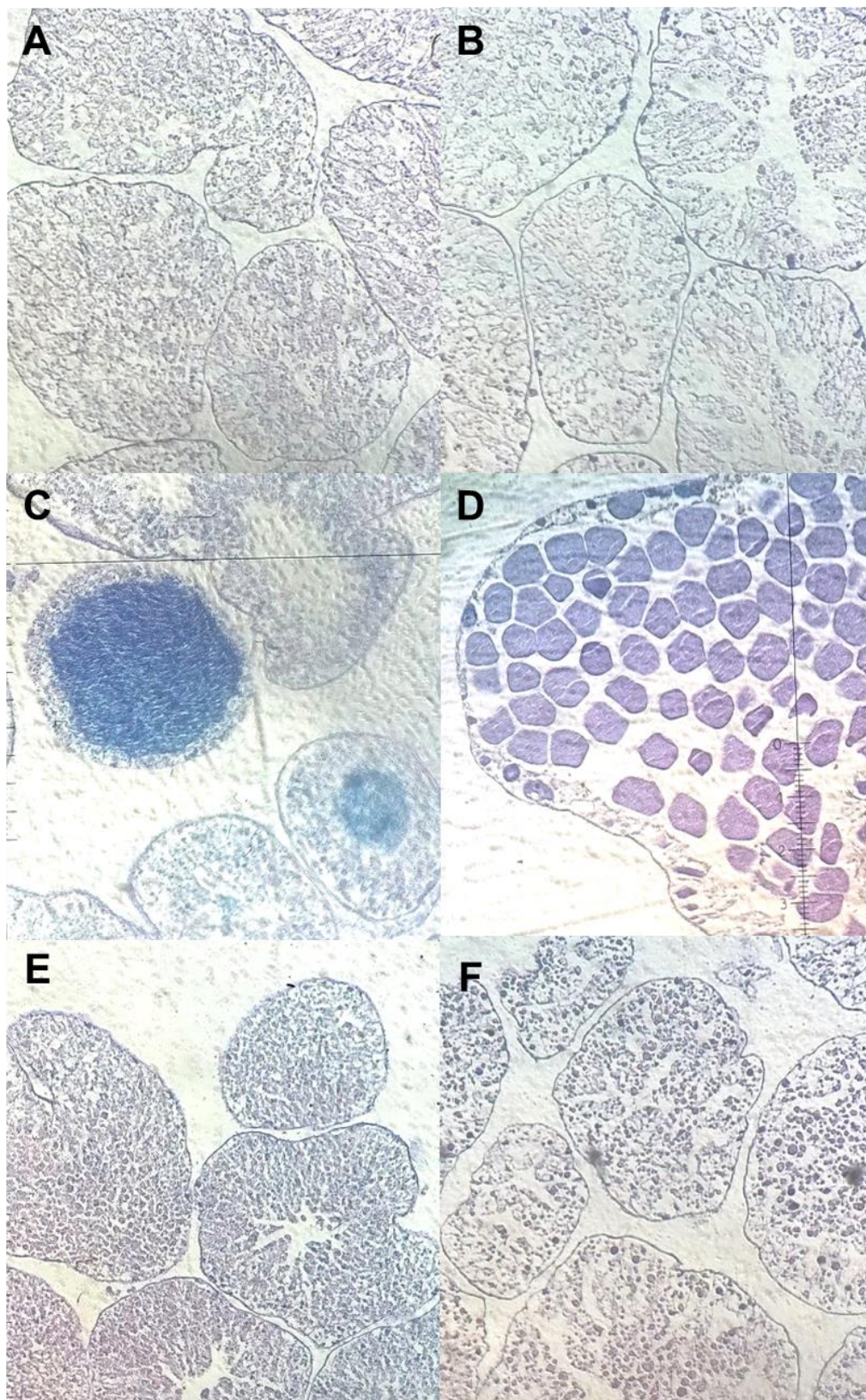


Figura 11: Secções transversais das gónadas do grupo amostral de *Paracentrotus lividus* adultos usados para a caracterização do estado de maturação sexual. Análise histológica – **A:** Macho na fase pré-desova (não apto para desova); **B:** Fêmea na fase pré-desova (não apto para desova); **C:** Macho na fase de desova (apto para desova); **D:** Fêmea na fase de desova (apto para desova); **E:** Macho na fase pós-desova (não apto para desova); **F:** Fêmea na fase pós-desova (não apto para desova). (Fonte: fotografia pessoal, 2017)

3.1.2. Induções de desova em *P. lividus*

Os quatro grupos destinados às experiências de indução de desova, quando comparados entre si, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros biométricos D_c , P_h e A_c (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) (Figura 12). O teste Levene para a homogeneidade, mostrou que a amostra era homogénea no que diz respeito ao parâmetro D_c ($F_{Levene\ 4,75} = 1,61$; $p\text{-value} > 0,05$), mas que esta não era homogénea no que diz respeito aos parâmetros P_h ($F_{Levene=4,75} = 3,529$; $p\text{-value} < 0,05$) e A_c ($F_{Levene=4,75} = 3,239$; $p\text{-value} < 0,05$).

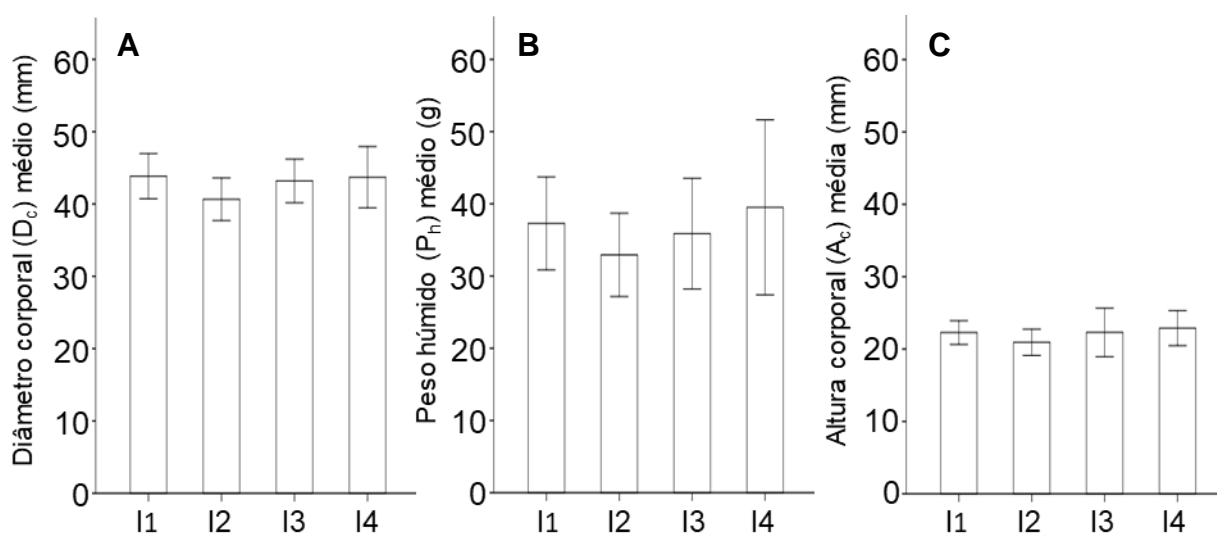


Figura 12: Dados biométricos do grupo amostral de *Paracentrotus lividus* usados na experiência de indução de desova **A:** Diâmetro corporal médio (D_c); **B:** Peso individual húmido médio (P_h) e **C:** Altura corporal média (A_c). **I1:** Injeção como solução de KCl 0,5M; **I2:** Agitação; **I3:** Adição de microalga; **I4:** Adição de gâmetas coespecíficos.

O método de indução da desova por agitação resultou na taxa de mortalidade mais elevada (70%, $n = 7$), em comparação com os outros métodos estudados. Na indução por injeção com KCl 0,5M observou-se uma taxa de mortalidade de 10% ($n = 1$), ao passo que as metodologias de indução por adição de microalga (*N. oculata*) e adição de gâmetas coespecíficos (espermatozoides) não causaram mortalidade nos indivíduos (taxa de mortalidade = 0%) (Figura 13).

Na resposta à indução, o método por injeção de KCl 0,5M obteve a taxa de resposta positiva mais elevada, com 30% ($n=3$) dos indivíduos positivamente induzidos nos primeiros 5 min após a aplicação da metodologia. O método por agitação induziu positivamente 10% ($n=1$) dos indivíduos durante o período de 30 min e a adição de microalga (*N. oculata*) também apresentou uma taxa de indução de 10% ($n=1$), mas durante um período de 24h. A metodologia de indução por adição de gâmetas cooespecíficos não produziu resultados positivos. A análise dos resultados (resposta à indução, mortalidade e determinação de sexo) das experiências de indução de desova em *P. lividus*, quando comparados com os respetivos grupos de controlo, mostrou existirem diferenças estatisticamente significativas na taxa de mortalidade do método de indução por agitação ($H_1 = 6,125$; $p < 0,05$). A resposta à indução ($H_1 = 1,750$; $p > 0,05$) e a determinação de sexo ($H_1 = 1,731$; $p > 0,05$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos de indução de desova (Figura 13).

Da comparação dos resultados (resposta à indução, mortalidade e determinação de sexo) entre as diferentes experiências de indução de desova em *P. lividus*, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a resposta à indução ($H_3 = 4,234$; $p > 0,05$) e determinação de sexo ($H_3 = 4,585$; $p > 0,05$), mas verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas na taxa de mortalidade ($H_3 = 20,719$; $p < 0,05$). Estas diferenças encontraram-se no grupo de indução por agitação quando comparado com os restantes grupos de indução de desova (testes *HSD-Tukey*; $p < 0,05$) (Figura 13).

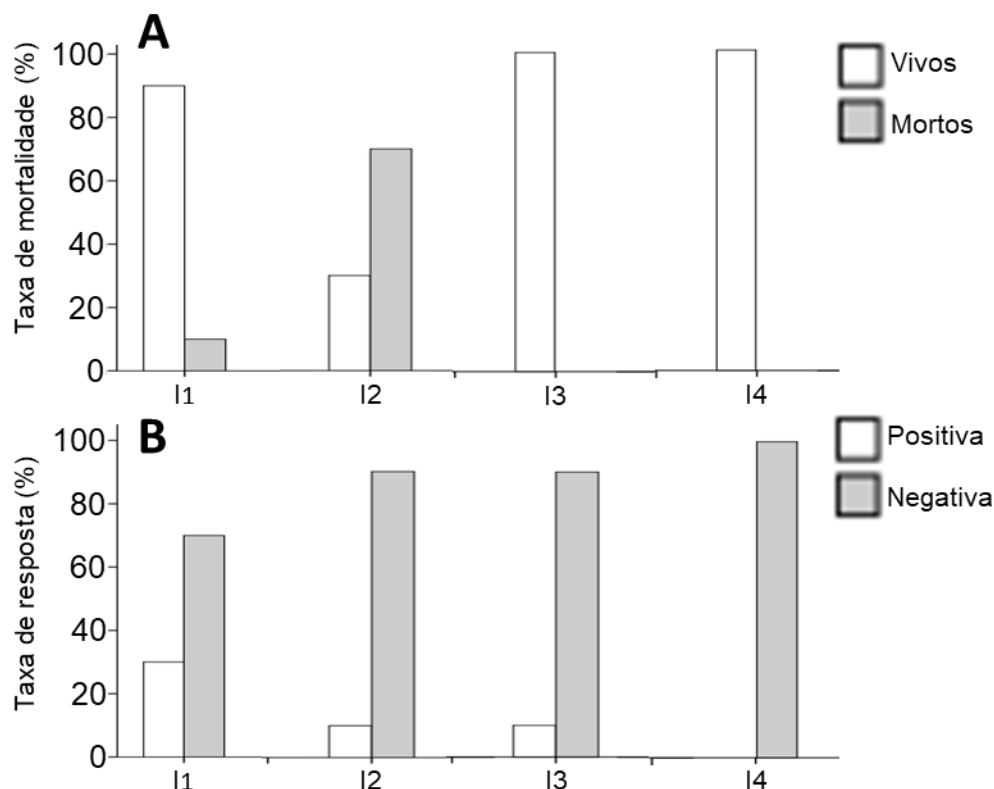


Figura 13: Resultados das induções de desova em *Paracentrotus lividus*. **A:** Taxa de mortalidade; **B:** Taxa de resposta. **I1:** Injeção como solução de KCl 0,5M; **I2:** Agitação; **I3:** Adição de microalga; **I4:** Adição de gâmetas coespecíficos.

3.2. Ensaios larvares de *P. lividus*

As amostragens foram estabelecidas quando a maioria ($\approx 70\%$) das larvas se encontrassem nas fases 6b e 8b (1ª e 2ª amostragem, respetivamente). Consequentemente, no ensaio larvar com alimentação de *R. marina*, a 1ª e 2ª amostragem corresponderam aos 10 e 17 dias pós fecundação (DPF), respetivamente. Para o ensaio larvar *D. tertiolecta* as amostragens por fase larvar corresponderam aos 10 DPF para a 1ª amostragem e 15 DPF para a 2ª amostragem.

3.2.1. Taxa de sobrevivência

Relativamente à distribuição da taxa de sobrevivência larvar, para o ensaio larvar *R. marina*, os resultados mostraram uma maior sobrevivência no tratamento T1 (taxa sobrevivência média = 25,5%) relativamente aos

tratamentos T2 e T3 (3,97% e 0,27%, respetivamente) (figura 14). A análise estatística mostrou que as diferenças detetadas foram estatisticamente significativas entre tratamentos ($H_2 = 49,700$; $p < 0,05$), encontrando-se na comparação do tratamento T1 com os tratamentos T2 e T3 (testes *HSD-Tukey*; $p < 0,05$), não existindo diferenças significativas entre os tratamentos T2 e T3 (testes *HSD-Tukey*; $p > 0,05$).

No ensaio larvar *D. tertiolecta* observaram-se as taxas de sobrevivência médias de 8,69% para o tratamento T1, 0,01% para o tratamento T2 e 7,54% no tratamento T3 (Figura 14). A análise estatística dos resultados indicou que as diferenças encontradas foram significativamente diferentes entre tratamentos ($H_2 = 35,822$; $p < 0,05$). Estas diferenças, localizaram-se na comparação do tratamento T2 com os tratamentos T1 e T3 (testes *HSD-Tukey*; $p < 0,05$). Os tratamentos T1 e T3, quando comparados, não exibiram diferenças estatisticamente significativas (testes *HSD-Tukey*; $p > 0,05$).

Quando comparada a taxa de sobrevivência larvar média ao nível dos tratamentos entre os ensaios larvares (*R. marina* e *D. tertiolecta*), verificou-se presença de diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos T1 ($H_1 = 52,662$; $p < 0,05$), T2 (*Kruskal-Wallis* $H_1 = 40,271$; $p < 0,05$) e T3 ($H_1 = 117,841$; $p < 0,05$). O tratamento T1 do ensaio larvar com *R. marina* apresentou uma taxa de sobrevivência média de 25,5%, contrastando com a taxa de sobrevivência de 11,98% no ensaio larvar com *D. tertiolecta*. No tratamento T2 registaram-se taxas de sobrevivência de 5,22% e 0,25% para os ensaios com *R. marina* e *D. tertiolecta*, respetivamente, e no tratamento T3 observaram-se as taxas de sobrevivência de 0,29% e 7,50% para os ensaios com *R. marina* e *D. tertiolecta*, respetivamente (Figura 14).

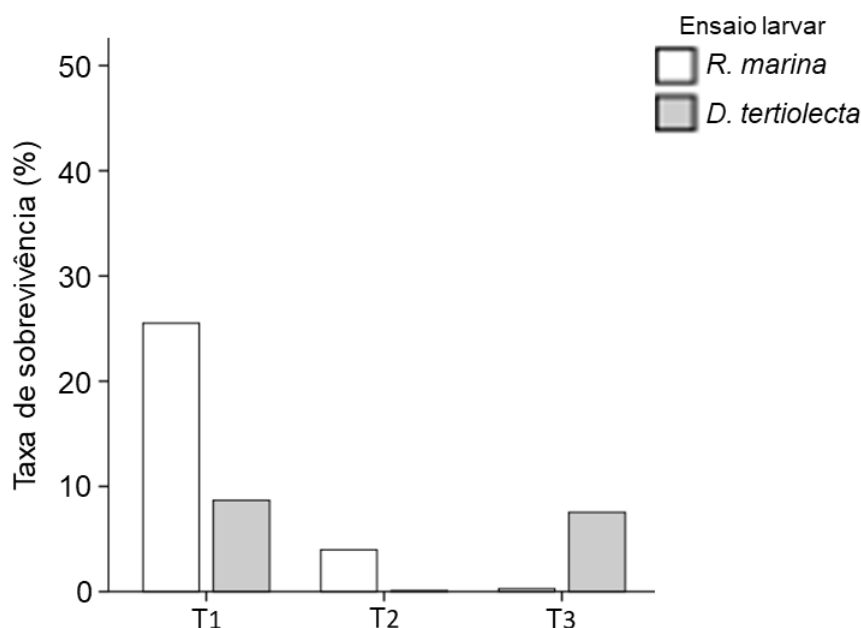


Figura 14: Comparação das taxas de sobrevivência entre ensaios com alimentação *Rhodomonas marina* e *Dunaliella tertiolecta*. As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.

3.2.2. Desenvolvimento larvar

3.2.2.1. Ensaio larvar de *P. lividus* alimentados com *R. marina*

Aos 10 DPF, no ensaio larvar *R. marina*, detetaram-se diferenças estatisticamente significativas na distribuição da fase larvar entre os diferentes tratamentos ($H_2 = 104,367$; $p < 0,05$). Estas diferenças encontraram-se entre todos os tratamentos quando comparados entre si (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$). No tratamento T1, 60,8% ($n = 59$) das larvas encontravam-se da fase 4b e 39,2% ($n = 38$) na fase 6b. O tratamento T2 apresentou 16,3% ($n = 15$) das larvas na fase 4b, 40,2% ($n = 37$) na fase 6b e 43,5% ($n = 40$) na fase 8b. Para o tratamento T3 verificou-se que 7,9% ($n = 7$) das larvas se encontravam na fase 4b, 33,7% ($n = 30$) na fase 6b, 57,3% ($n = 51$) na fase 8b e 1,1% ($n = 1$) em pré-metamorfose (Figura 15).

Aos 17 DPF, também foram detetadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição da fase larvar ($H_2 = 27,525$; $p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos (T1, T2, T3). Estas diferenças foram observadas no tratamento T1 quando comparados com os tratamentos T2 e T3 (testes

Bonferroni; $p < 0,05$), não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos T2 e T3 (testes *Bonferroni*; $p > 0,05$) (Figura 15). Aqui, observou-se que 2,2% ($n=2$) das larvas se encontravam na fase 4b, 25,3% ($n=23$) na fase 6b e 72,5% ($n=66$) na fase 8b para o tratamento T1 (Figura 15). No tratamento T2, 10,8% ($n=7$) das larvas se encontravam na fase 6b, 87,7% ($n=57$) na fase 8b e 1,5% ($n=1$) em pré-metamorfose e, no tratamento T3, 95,5% ($n=63$) das larvas encontraram-se na fase 8b, 1,5% ($n=1$) em pré-metamorfose e 3% ($n=2$) das larvas assentaram com sucesso (Figura 15).

Quando comparadas entre amostragens, a distribuição das fases larvares provou ser significativamente diferente no tratamento T1 ($H_1 = 119,476$; $p < 0,05$), T2 ($H_1 = 35,551$; $p < 0,05$) e T3 ($H_1 = 35,341$; $p < 0,05$) (Figura 15).

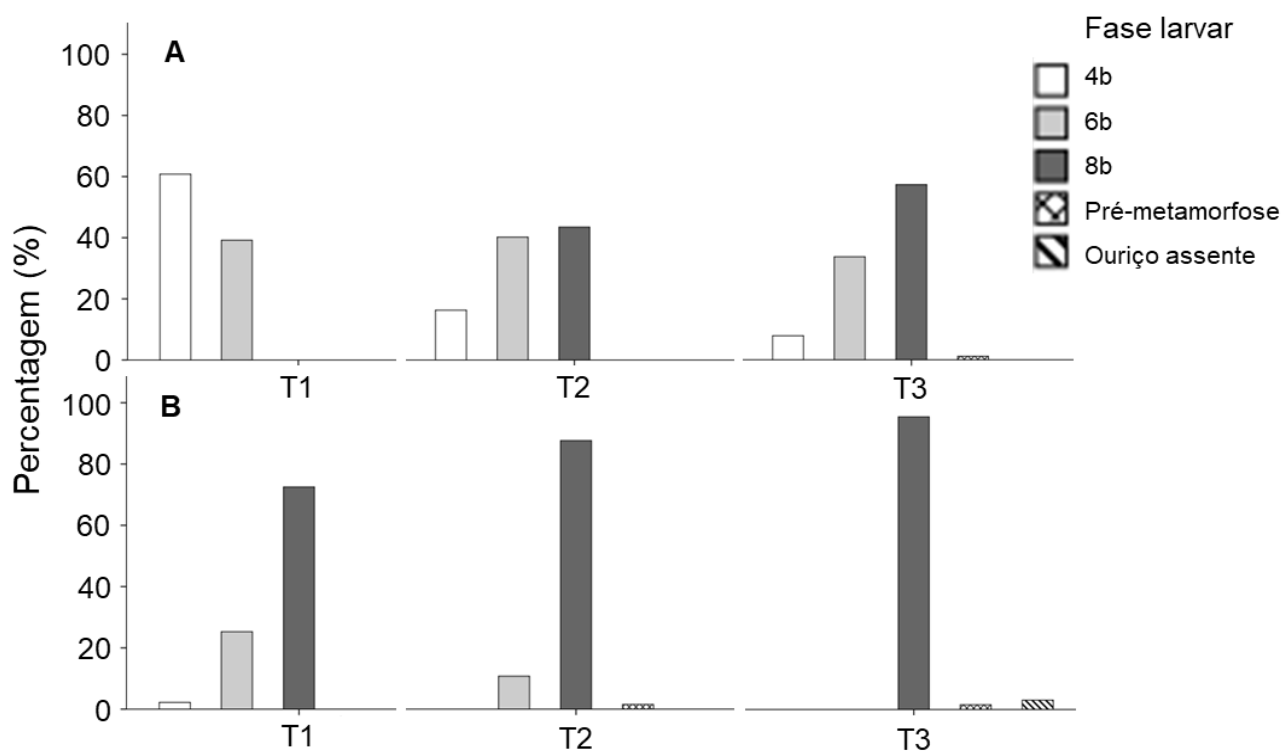


Figura 15: Percentagem de indivíduos por estágio de desenvolvimento das larvas *Paracentrotus lividus* ao longo do ensaio de alimentação com *Rhodomonas marina*. As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. **A:** Amostragem aos 10 dias pós fecundação (DPF); **B:** Amostragem aos 17 dias pós fecundação (DPF).

3.2.2.2. Ensaio larvar de *P. lividus* alimentados com *D. tertiolecta*

No ensaio *D. tertiolecta*, 10 DPF, a distribuição da fase larvar mostrou existirem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos ($H_2 = 15,689$; $p < 0,05$). Estas diferenças registaram-se na comparação do tratamento T2 com o T3 (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) mas, entre os tratamentos T1 com o T2 e T1 com o T3, não se registaram diferenças estatisticamente significativas (testes *Bonferroni*; $p > 0,05$) (Figura 16). Nesta amostragem, 8,5% ($n=6$) das larvas encontravam-se na fase 4b, 5,6% ($n=4$) na fase 6b, 81,7% ($n=58$) na fase 8b e 4,2% ($n=3$) em pré-metamorfose, para o tratamento T1 (Figura 16). No tratamento T2 observou-se 8,8% ($n=8$) das larvas na fase 4b, 24,2% ($n=22$) na fase 6b, 62,6% ($n=57$) na fase 8b, 2,2% ($n=2$) em pré-metamorfose e 2,2% ($n=2$) assentaram com sucesso (Figura 16).

Ao dia 15 DPF, a distribuição da fase larvar entre os diferentes tratamentos mostrou existirem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos ($H_2 = 26,347$; $p < 0,05$). Aqui o tratamento T1 foi significativamente diferente dos tratamentos T2 e T3 (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), mas não se observaram diferenças significativas na distribuição média das fases larvares entre os tratamentos T2 e T3 (testes *Bonferroni*; $p > 0,05$) (Figura 16). As diferenças observadas mostraram que no tratamento T1 3,2% ($n=2$) encontravam-se na fase 4b, 1,6% ($n=1$) na fase 6b, 47,6% ($n=30$) na fase 8b, 30,2% ($n=19$) em pré-metamorfose e 17,5% ($n=11$) completaram a metamorfose e apresentaram-se como ouriços assentes com sucesso (Figura 16). No tratamento T2, 11,1% ($n=3$) das larvas apresentavam-se na fase 8b como também em pré-metamorfose (11,1%; $n=3$) e 77,8% ($n=21$) assentaram com sucesso (Figura 16). No tratamento T3, observou-se 4,4% ($n=4$) das larvas na fase 6b, 30,8% ($n=28$) na fase 8b, 8,8% ($n=8$) das larvas encontravam-se em pré-metamorfose e 56% ($n=51$) dos indivíduos assentaram com sucesso (Figura 16).

Entre amostragens, a distribuição das fases larvares provou ser significativamente diferente no tratamento T1 ($H_1 = 30,731$; $p < 0,05$), T2 ($H_1 = 56,343$; $p < 0,05$) e T3 ($H_1 = 46,205$; $p < 0,05$).

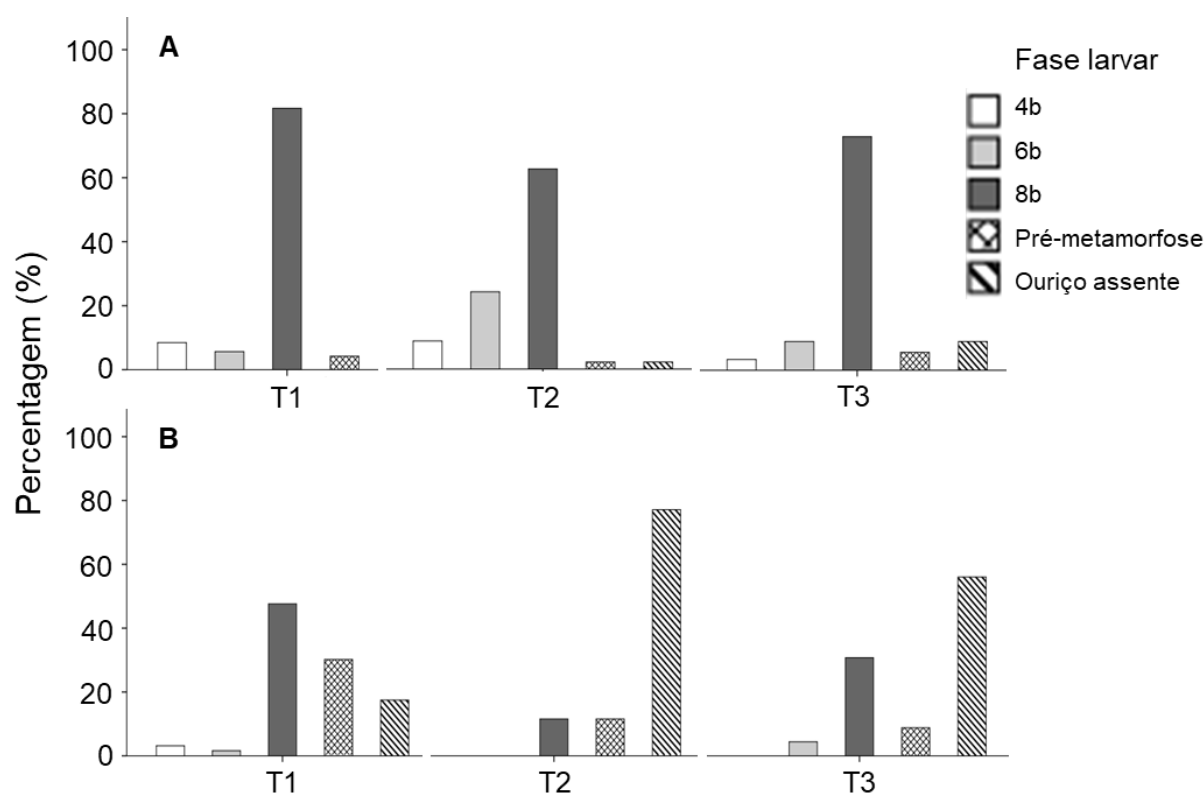


Figura 16: Percentagem de indivíduos por estágio de desenvolvimento das larvas *Paracentrotus lividus* ao longo do ensaio de alimentação com *Dunaliella tertiolecta*. As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II. **A:** Amostragem aos 10 dias pós fecundação (DPF); **B:** Amostragem aos 15 dias pós fecundação (DPF).

3.2.3. Crescimento larvar *P. lividus*

3.2.3.1. Ensaio larvar *R. marina*

Relativamente às medidas biométricas das larvas (CT, CC, LC, BP e CE) observou-se que no ensaio larvar *R. marina*, aos 10 DPF, existiram diferenças estatisticamente significativas na distribuição média das medidas biométricas CT ($H_2 = 44,172$; $p < 0,05$), CC ($F_{2,275} = 9,795$; $p < 0,05$), LC ($H_2 = 129,296$; $p < 0,05$), BP ($F_{2,275} = 27,935$; $p < 0,05$) e CE ($H_2 = 141,305$; $p < 0,05$), quando comparadas por tratamentos (T1, T2, T3). A distribuição média do CC foi significativamente inferior ($345,84 \pm 44,65 \mu\text{m}$) no tratamento T1 quando comparado com os tratamentos T2 e T3 ($369,80 \pm 53,48 \mu\text{m}$ e $378,04 \pm 57,08 \mu\text{m}$, respectivamente) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos T2 e T3 (testes *Bonferroni*; $p > 0,05$) (Figura 17, Tabela III). Os valores médios para as restantes medidas biométricas apresentaram-se significativamente inferiores no tratamento T1 (CT: $648,47 \pm 138,81 \mu\text{m}$; LC: $208,83 \pm 53,82 \mu\text{m}$; BP: $347,01 \pm 128,75 \mu\text{m}$; CE: $141,61 \pm 39,43 \mu\text{m}$) em comparação com os tratamentos T2 (CT: $783,36 \pm 131,56 \mu\text{m}$; LC: $340,23 \pm 101,51 \mu\text{m}$; BP: $476,76 \pm 118,65 \mu\text{m}$; CE: $221,75 \pm 59,79 \mu\text{m}$) e T3, (CT: $720,96 \pm 124,73 \mu\text{m}$; LC: $372,74 \pm 91,39 \mu\text{m}$; BP: $397,50 \pm 111,16 \mu\text{m}$; CE: $261,17 \pm 65,85 \mu\text{m}$) como também médias inferiores nas medidas LC e BP no tratamento T2 quando comparado com o tratamento T3 (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) (Figura 17, Tabela III).

Aos 17 DPF, também se verificou a existência de diferenças significativas na distribuição média de todas as medidas biométricas (CT: $F_{2,217} = 20,076$; $p < 0,05$; CC: $H_2 = 39,514$; $p < 0,05$; LC: $H_2 = 90,204$; $p < 0,05$; BP: $F_{2,214} = 57,006$; $p < 0,05$ e CE: $H_2 = 95,097$; $p < 0,05$), quando comparadas entre tratamentos. Para a distribuição média do CT, estas diferenças encontraram-se no tratamento T3 ($660,10 \pm 144,61 \mu\text{m}$) quando comparado com os tratamentos T1 ($802,03 \pm 137,92 \mu\text{m}$) e T2 ($759,14 \pm 132,40 \mu\text{m}$) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) sendo que a distribuição média do CT foi significativamente inferior no tratamento T3 (Figura 17, Tabela III). As médias do CC e LC também se apresentaram significativamente inferiores no tratamento T1 ($364,17 \pm 46,72 \mu\text{m}$ e $342,62 \pm 64,90 \mu\text{m}$, respetivamente) quando comparado com os tratamentos T2 ($422,59$

$\pm 82,81 \mu\text{m}$ e $472,91 \pm 122,69 \mu\text{m}$, respetivamente) e T3 ($433,58 \pm 75,54 \mu\text{m}$ e $504,85 \pm 101,73 \mu\text{m}$, respetivamente) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), não existindo diferenças significativas entre os tratamentos T2 e T3 (testes *Bonferroni*; $p > 0,05$) (Figura 17, Tabela III). A distribuição média do BP mostrou-se significativamente maior no tratamento T1 ($477,20 \pm 129,61 \mu\text{m}$) quando comparado com os tratamentos T2 e T3 ($389,64 \pm 140,19 \mu\text{m}$ e $279,32 \pm 135,18 \mu\text{m}$, respetivamente) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), como também foi significativamente superior no tratamento T2 quando comparado com o tratamento T3 (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) (Figura 17, Tabela III). A distribuição média do CE foi significativamente maior no tratamento T3 ($324,64 \pm 59,69 \mu\text{m}$) quando comparado com os restantes tratamentos (T1 = $210,58 \pm 129,61 \mu\text{m}$ e T2 = $288,58 \pm 80,70 \mu\text{m}$) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), como também, no tratamento T2 quando comparado com o T1 (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) (Figura 17).

Das comparações entre amostragens (10 e 17 DPF), as distribuições médias de todas as medidas biométricas das larvas mostraram-se significativamente diferentes no tratamento T1 (CT: $F_{1,186} = 57,817$; $p < 0,05$; CC: $F_{1,186} = 7,562$; $p < 0,05$; LC: $H_1 = 108,257$; $p < 0,05$; BP: $F_{1,186} = 47,694$; $p < 0,05$; CE: $H_1 = 81,932$; $p < 0,05$). Estas diferenças mostraram que existe um aumento significativo dos valores médios de todas as medidas biométricas para este tratamento (Figura 17, Tabela III). No tratamento T2, não se observaram diferenças significativas na média do CT ($H_1 = 2,208$; $p > 0,05$), entre amostragens, mas a média das medidas biométricas CC ($H_1 = 14,745$; $p < 0,05$), LC ($H_1 = 40,015$; $p < 0,05$) e CE ($H_1 = 25,736$; $p < 0,05$) também mostrou um padrão de aumento significativo. A comparação da média do BP ($H_1 = 15,090$; $p < 0,05$) entre amostragens mostrou que este foi menor aos 17 DPF (Figura 13). No tratamento T3, os dados exibiram um padrão de crescimento significativo para as medidas biométricas CC ($F_{1,149} = 26,456$; $p < 0,05$), LC ($F_{1,153} = 71,878$; $p < 0,05$) e CE ($F_{1,151} = 44,532$; $p < 0,05$), ao passo que as médias do CT ($F_{1,151} = 7,748$; $p < 0,05$) e BP ($H_1 = 27,095$; $p < 0,05$) evidenciaram uma regressão significativa para estas medidas larvares, entre amostragens (Figura 17, Tabela III).

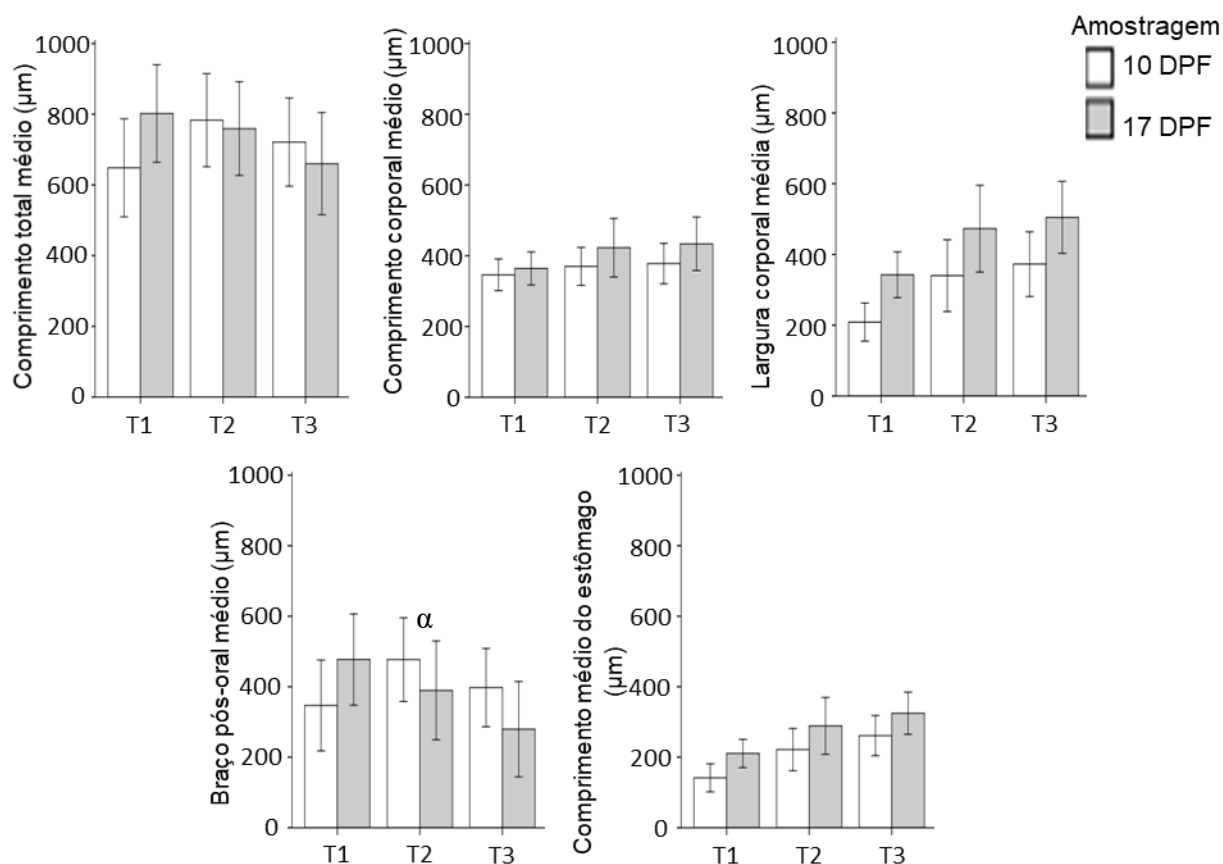


Figura 17: Medidas biométricas das larvas de *Paracentrotus lividus* do ensaio de alimentação com *Rhodomonas marina*, aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 17 dias pós fecundação (DPF). As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.

Tabela III: Médias (\pm desvio padrão) das medidas biométricas das larvas *Paracentrotus lividus* do ensaio com alimentação *Rhodomonas marina*, aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 17 dias pós fecundação (DPF). As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.

	10 DPF			17 DPF		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Comprimento total (CT, μm)	648,47 \pm 138,81	783,36 \pm 131,56	720,96 \pm 124,73	802,03 \pm 137,92	759,14 \pm 132,40	660,10 \pm 144,61
Comprimento corporal (CC, μm)	345,84 \pm 44,65	369,80 \pm 53,48	378,04 \pm 57,08	364,17 \pm 46,72	422,59 \pm 82,81	433,58 \pm 75,54
Largura corporal (LC, μm)	208,83 \pm 53,82	340,23 \pm 101,51	372,74 \pm 91,39	342,62 \pm 64,90	472,91 \pm 122,69	472,91 \pm 122,69
Braço pós-oral (BP, μm)	347,01 \pm 128,75	476,76 \pm 118,65	397,50 \pm 111,16	477,20 \pm 129,61	389,64 \pm 140,19	279,32 \pm 135,18
Comprimento do estômago (CE, μm)	141,61 \pm 39,43	221,75 \pm 59,79	261,17 \pm 65,85	210,58 \pm 129,61	288,58 \pm 80,70	324,64 \pm 59,69

3.2.3.2. Ensaio larvar *D. tertiolecta*

No ensaio larvar *D. tertiolecta*, aos 10 DPF, todos os valores médios das medidas biométricas das larvas apresentaram-se significativamente diferentes (CT: $H_2 = 76,170$; $p < 0,05$; $p < 0,05$; CC: $H_2 = 85,280$; $p < 0,05$; $p < 0,05$; LC: $H_2 = 54,406$; $p < 0,05$; BP: $H_2 = 87,306$; $p < 0,05$ e CE: $F_{2,242} = 31,919$; $p < 0,05$), quando comparados entre tratamentos (T1, T2 e T3). Os resultados das medidas CT, CC, BP e CE mostraram que estas foram significativamente superiores no tratamento T3 (CT: $745,45 \pm 158,32 \mu\text{m}$; CC: $366,23 \pm 43,06 \mu\text{m}$; BP: $455,88 \pm 113,99 \mu\text{m}$; CE: $274,38 \pm 54,78 \mu\text{m}$) comparativamente com os tratamentos T1 (CT: $664,19 \pm 147,08 \mu\text{m}$; CC: $323,57 \pm 43,65 \mu\text{m}$; BP: $379,99 \pm 139,43 \mu\text{m}$; CE: $233,02 \pm 56,30 \mu\text{m}$) e T2 (CT: $562,13 \pm 87,58 \mu\text{m}$; CC: $294,56 \pm 38,21 \mu\text{m}$; BP: $272,12 \pm 79,98 \mu\text{m}$; CE: $209,35 \pm 51,45 \mu\text{m}$) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), excepto a LC que não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparada entre o tratamento T1 ($386,20 \pm 85,85 \mu\text{m}$) com o T3 ($274,38 \pm 54,78 \mu\text{m}$) (testes *Bonferroni*; $p > 0,05$).

Aos 15 DPF, a distribuição média do CT ($H_2 = 25,202$; $p < 0,05$), CC ($H_2 = 13,279$; $p < 0,05$), BP ($H_2 = 12,558$; $p < 0,05$) e CE ($H_2 = 6,172$; $p < 0,05$) apresentaram diferenças estatisticamente significativas, ao contrário da distribuição média da LC, que não apresentou diferenças significativas ($H_2 = 5,687$; $p > 0,05$), entre todos os tratamentos. Os resultados médios para o CT e BP foram significativamente inferiores no tratamento T2 ($361,32 \pm 38,89 \mu\text{m}$ e $112,52 \pm 57,81 \mu\text{m}$, respetivamente) comparativamente com os tratamentos T1 ($524,29 \pm 200,69$ e $275,04 \pm 174,30 \mu\text{m}$, respetivamente) e T3 ($508,94 \pm 160,70$ e $320,70 \pm 127,66 \mu\text{m}$, respetivamente) (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$), no CC estas diferenças encontraram-se na comparação do tratamento T3 com os tratamentos T1 e T2 e, para o CE as diferenças significativas localizaram-se na comparação do tratamento T1 com o T3 (testes *Bonferroni*; $p < 0,05$) (Figura 18, Tabela IV).

Entre amostragens (10 e 15 DPF) observou-se que as distribuições médias das medidas biométricas das larvas CT ($H_1 = 17,317$; $p < 0,05$), CC ($H_1 = 5,228$; $p < 0,05$), LC ($H_1 = 6,429$; $p < 0,05$) e BP ($H_1 = 12,624$; $p < 0,05$), foram inferiores no tratamento T1 e a média do CE ($H_1 = 0,947$; $p > 0,05$) não apresentou variações significativas entre amostragens (Figura 14). No tratamento T2, as médias do CT ($H_1 = 54,981$; $p < 0,05$) e BP ($H_1 = 14,630$; $p < 0,05$) foram

inferiores aos 15 DPF (Figura 18). As restantes medidas biométricas (CC: $F_{1,93} = 0,523$; $p > 0,05$; LC: $H_1 = 1,114$; $p > 0,05$ e CE: $H_1 = 0,008$; $p > 0,05$) não exibiram diferenças significativas nas médias entre amostragens (Figura 18, Tabela IV). No tratamento T3 verificou-se a existência de diferenças significativas nas médias do CT ($H_1 = 59,169$; $p < 0,05$), CC ($F_{1,119} = 5,039$; $p < 0,05$) e BP ($F_{1,119} = 34,762$; $p < 0,05$) quando comparadas entre amostragens e, contrariamente, as médias do LC ($H_1 = 3,387$; $p > 0,05$) e CE ($F_{1,121} = 0,698$; $p > 0,05$), não apresentaram variações significativas entre as amostragens (Figura 18, Tabela IV).

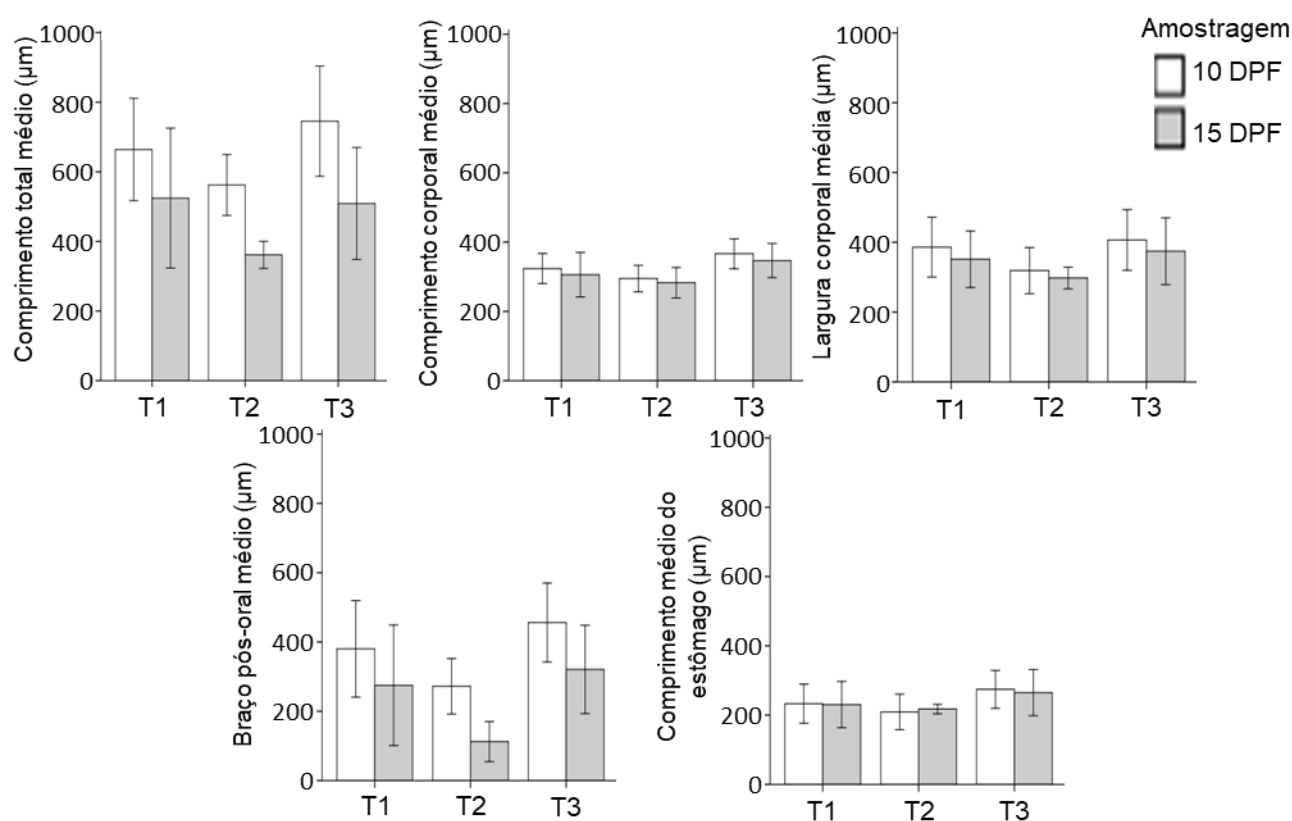


Figura 18: Medidas biométricas das larvas de *Paracentrotus lividus* do ensaio de alimentação com *Dunaliella tertiolecta*, aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 17 dias pós fecundação (DPF). As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.

Tabela IV: Médias (\pm desvio padrão) das medidas biométricas das larvas *Paracentrotus lividus* do ensaio com alimentação *Dunaliella tertiolecta*, aos 10 dias pós fecundação (DPF) e 15 dias pós fecundação (DPF). As condições dos tratamentos T1, T2 e T3 estão definidas na tabela II.

	10 DPF			15 DPF		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Comprimento total (CT, μm)	664,19 \pm 147,08	562,13 \pm 87,58	745,45 \pm 158,32	524,29 \pm 200,69	361,32 \pm 38,89	508,94 \pm 160,70
Comprimento corporal (CC, μm)	323,57 \pm 43,65	294,56 \pm 38,21	366,23 \pm 43,06	305,78 \pm 64,13	282,80 \pm 44,00	346,64 \pm 49,24
Largura corporal (LC, μm)	386,20 \pm 85,85	318,80 \pm 66,20	274,38 \pm 54,78	351,22 \pm 80,66	297,77 \pm 30,95	374,47 \pm 95,75
Braço pós-oral (BP, μm)	379,99 \pm 139,43	272,12 \pm 79,98	455,88 \pm 113,99	275,04 \pm 174,30	112,52 \pm 57,81	320,70 \pm 127,66
Comprimento do estômago (CE, μm)	233,02 \pm 56,30	209,35 \pm 51,45	274,38 \pm 54,78	230,33 \pm 66,83	217,65 \pm 13,54	264,93 \pm 66,50

4. Discussão

4.1. Induções de desova em *P. lividus*

Nas experiências de indução de desova em *P. lividus*, distinguiram-se os métodos de indução como invasivos (injeção de KCl 0,5M e agitação) e não invasivos (adição de microalga e adição de gâmetas coespecíficos). Aqui pôde-se observar que os métodos de indução mais expeditos na obtenção de gâmetas foram a indução por injeção de KCl 0,5M (Gago & Luís, 2011), com resultados positivos nos primeiros 5 minutos após a realização da experiência e a indução por agitação. A metodologia de indução por adição de microalga (*N. oculata*), numa concentração de 8000 (cél.L⁻¹) revelou alcançar resultados positivos, mas a libertação de gâmetas ocorreu durante um período de 24h e, consequentemente, com gâmetas inviáveis no fim da experiência. A experiência de indução por adição de gâmetas coespecíficos (espermatozoides) não produziu resultados positivos.

Relativamente à taxa de mortalidade verificou-se que o método de indução por injeção de 40 µl.g⁻¹ de KCl a 0,5M causou uma mortalidade inferior (10% dos indivíduos submetidos) à descrita por outros autores, como por exemplo Gago & Luís (2011), que relata taxas de mortalidade superiores a 25%. Estes resultados deverão estar associados às diferentes dosagens utilizadas entre os trabalhos experimentais (1 ml KCl 0,1M; 1ml KCl 0,25M e 1 ml KCl 0,5M).

O método por agitação, que foi a metodologia que causou a mortalidade mais elevada (70% dos indivíduos submetidos), contrasta com os resultados obtidos pelo mesmo autor (Gago & Luís, 2011), que reporta uma taxa de sobrevivência de 100% dos indivíduos submetidos a este método de indução de desova. A mortalidade observada nesta metodologia pode estar associada às características da mesma, pois o único fator controlado foi o período de agitação, 1 min (Gago & Luís, 2011), em que a força aplicada, frequência e modo de agitação estão dependentes do operador.

Neste trabalho, é necessário referir que os resultados obtidos nas experiências de indução de desova em ouriços-do-mar estão condicionados pelo estado reprodutivo do grupo amostral. Por um lado, os ouriços-do-mar que compunham a amostra para a indução da desova apresentavam um índice

gonadossomático relativamente baixo (3,88) em relação ao valor médio mensal observada para o mês de Outubro na população de *P. lividus* da ilha da Madeira (4,89, Figura 19 A). Por outro lado, a informação disponível sobre o ciclo de maturação da população de ouriços-do-mar *P. lividus* na região mostra que no mês de captura do grupo amostras, Outubro, a maioria dos ouriços estão em estados de maturação de recuperação, crescimento e pré-maturação (estádios mat.1 e mat.2 na Figura 19B). Este facto com certeza limitou a aptidão para a desova mesmo quando são artificialmente induzidos. Será de esperar que ao repetir estas experiências numa época em que a percentagem de indivíduos maduros seja mais elevada, por exemplo Novembro ou Dezembro, os resultados obtidos sobre a eficácia dos diferentes métodos de indução da desova possam ser relativamente diferentes.

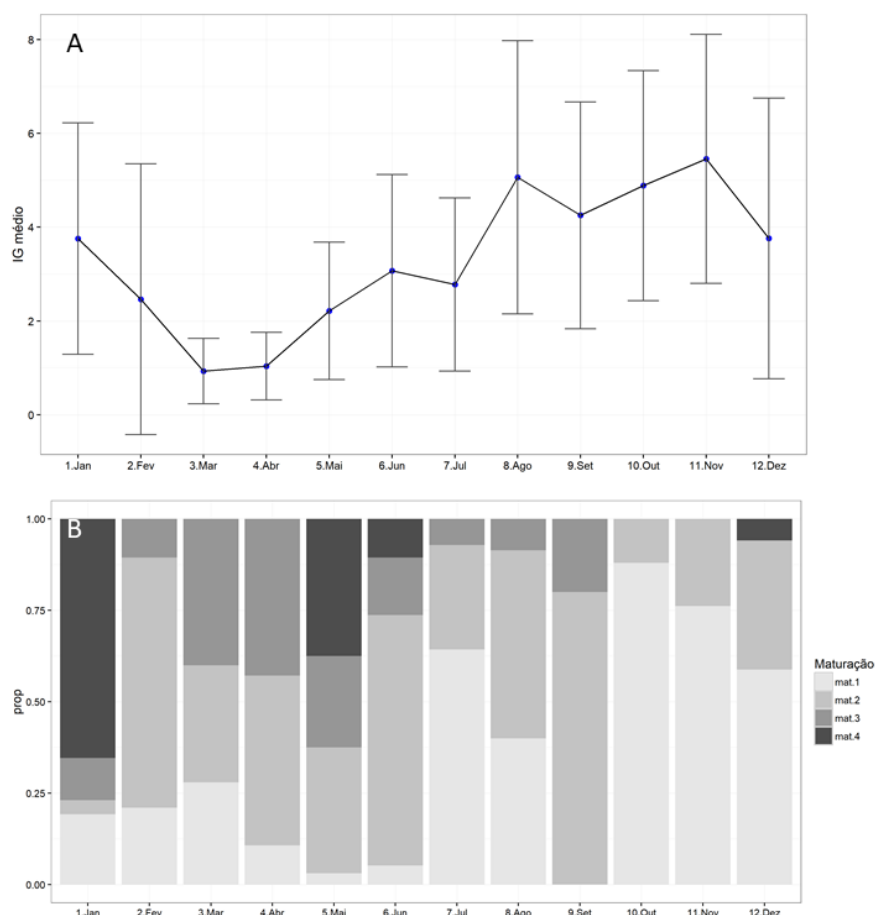


Figura 19: Evolução mensal do índice gonadossomático e do nível de maturação da população de ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* da ilha da Madeira. Os estádios de maturação mat.1, mat.2, mat.3, mat.4 representam os estados de maturação das gónadas recuperação, pré-maturação, maduro, e pós-desova respectivamente (dados não publicados).

4.2. Ensaios larvares de *P. lividus*

De acordo com trabalhos prévios (Brundu *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2000), no ensaio larvar *R. marina*, a taxa de sobrevivência mais elevada foi registada no tratamento de menor concentração de racionamento, T1 (taxa de sobrevivência = 25,5%). Nos tratamentos de maiores concentrações de racionamento (T2 e T3) observaram-se taxas de sobrevivência larvar significativamente mais baixas (taxa de sobrevivência = 3,97% e 0,27%, respetivamente), sugerindo que a concentração de racionamento para a *R. marina* é mais adequado nas 4000 cél.ml⁻¹ (Anexo 4).

O mesmo padrão não foi observado no ensaio de alimentação com *D. tertiolecta*. Neste registaram-se taxas de sobrevivência sem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos T1 e T2, mas este resultado reside no facto da incubadora 2 no tratamento T1 ter registado uma taxa de sobrevivência estatisticamente superior ($H_2 = 23,000$; $p < 0,05$) (Taxa de sobrevivência = 25,71%) relativamente às incubadoras 1 e 3 do mesmo tratamento (Taxa de sobrevivência = 0,32% e 0,04%) (Anexo 4). Neste ensaio larvar, existe a hipótese da taxa de sobrevivência se comportar da mesma forma ao observado no ensaio larvar com a microalga *R. marina*, relativamente aos tratamentos aplicados, surgindo assim a necessidade da repetição destes ensaios larvares em simultâneo e em condições de temperatura ambiental controlada.

No ensaio de alimentação com *R. marina*, os resultados mostraram que até à fase 8b, as larvas exibem um padrão de incremento em todas as medidas biométricas (CT, CC, LC, BP e CE) mas, ao iniciarem a fase pré-metamorfose as medidas CT e BP demonstram um padrão de regressão. Estes padrões de crescimento detetados estão associados ao desenvolvimento normal das larvas pluteus (Castilla-Gavilán *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2007). De acordo com outros autores (Carboni *et al.*, 2012; Castilla-Gavilán *et al.*, 2018), pela variabilidade das medidas CT e BP, estas não devem ser consideradas como indicadores do crescimento larvar devendo sim, utilizar-se o CC e LC nesta avaliação das larvas de ouriços-do-mar (Castilla-Gavilán *et al.*, 2018). Não esquecendo que os padrões de crescimento estão diretamente associados à espécie em análise,

podendo exibir comportamentos diferentes para diferentes espécies de ouriços-do-mar.

Relativamente às fases larvares, no ensaio de alimentação com *R. marina* verificou-se que, pelo menos, 70% das larvas atingiram a fase 8b em todos os tratamentos aos 17 DPF. Como referido noutros estudos, este rápido desenvolvimento larvar pode estar associado às baixas densidades larvares utilizadas (2 ind.ml⁻¹) (Azad, McKinley & Pearce, 2010; Castilla-Gavilán *et al.*, 2018), como também à utilização de temperaturas mais elevadas (21 ± 1 °C) (Castilla-Gavilán *et al.*, 2018). Comparativamente, o ensaio larvar de alimentação com *D. tertiolecta* caracterizou-se pelo controlo de temperatura ter sido alterado devido à temperatura ambiente, adicionando mais 0,5 °C aos 21 ± 1 °C inicialmente estipulados no desenho experimental. Os resultados observados no ensaio de alimentação com *D. marina* sugerem um desenvolvimento larvar mais acelerado, pois foi registada uma percentagem estatisticamente significativa de indivíduos assentes com sucesso nos tratamentos T2 (77,8%) e T3 (56%) aos 15 DPF.

5. Conclusões e considerações finais

Assim, entre os métodos de indução de desova invasivos (indução por injeção de KCl 0,5M e por agitação), destaca-se a indução por injeção de KCl 0,5M como o mais expedito, por ser possível a rápida obtenção de gâmetas, mesmo quando os indivíduos não se encontram na época de desova, com mortalidades associadas de 10% dos indivíduos submetidos ao método referido. Por outro lado, a adição de microalgas destacou-se como o método de indução de desova não invasivo com maiores potencialidades de uso futuro para a obtenção de gâmetas em ouriços-do-mar, sem comprometer a sobrevivência dos lotes de reprodutores, de modo a suprimir a necessidade da captura de indivíduos selvagens.

As diferenças observadas na taxa de sobrevivência larvar entre tratamentos podem ser explicadas pelo facto das baixas concentrações de racionamento promoverem menos desperdício de alimentação, reduzindo assim a quantidade de depósito de microalga não consumida, contribuindo para uma melhor qualidade dos parâmetros da água (Azad, McKinley & Pearce, 2010; Castilla-Gavilán *et al.*, 2018). Relativamente à escolha de espécie de microalga para um racionamento monoespecífico de larvas *P. lividus*, e de acordo com Castilla-Gavilán *et al.* (2018), a utilização da microalga *R. marina* apresenta vantagens no desenvolvimento larvar de ouriços-do-mar, pois permite ciclos de produção curtos com biomassas elevadas e a baixo custo, na produção de ouriços-do-mar.

Os resultados dos ensaios larvares mostraram que, o incremento de temperatura nas fases larvares dos ouriços-do-mar promove um rápido desenvolvimento larvar e, que o racionamento adequado, conforme a microalga utilizada, apresenta um importante papel na taxa de sobrevivência larvar. Ainda, é de referir a importância do controlo de temperatura adequado (sala de temperatura controlada) nas fases larvares dos ouriços-do-mar, pois a temperatura ambiental poderá induzir um desenvolvimento demasiado acelerado ou lento durante este período.

Referências Bibliográficas

- Alves, F.; Chícharo, L.; Serrão, E. & Abreu, A. D. (2001). Algal cover and sea urchin spatial distribution at Madeira Island (NE Atlantic). *Scientia Marina*, 65(4), 383-392.
- Andrew, N.; Agatsuma, Y.; Ballesteros, E.; Bazhin, A.; Creaser, E.; Barnes, D.; Botsford, L.; Bradbury, A.; Campbell, C.; Dixon, J.; Einarsson, S.; Gerring, P.; Hebert, K.; Hunter, M.; Hur, S.; Johnson, C.; Juinio-Menez, M.; Kalvass, P.; Miller, R.; Moreno, C.; Palleiro, J.; Rivas, D.; Robinson, S.; Schroeter, S.; Steneck, R.; Vadas, R.; Woodby, D. & Xiaoqi, Z. (2003). Status and management of world sea urchin fisheries. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*, 40, 343-425. doi: 10.1201/9780203180594.ch7
- Azad, A. K.; McKinley, S. & Pearce, C. M. (2010). Factors influencing the growth and survival of larval and juvenile echinoids. *Reviews in Aquaculture*, 2(3), 121-137. doi: 10.1111/j.1753-5131.2010.01030.x
- Azad, A. K.; Pearce, C. M. & McKinley, R. S. (2011). Influence of microalgal species and dietary rations on larval development and survival of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857). *Aquaculture*, 322, 210-217. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.09.029
- Boudouresque, C. F. & Verlaque, M. (2007). Ecology of *Paracentrotus lividus*. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 37, pp. 243-285). Elsevier.
- Harris, G. L. & Eddy, S., n.d. in: Brown, N., & Eddy, S. (2015). *Echinoderm Aquaculture*. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-96038-7
- Brundu, G.; Monleón, L. V.; Vallainc, D. & Carboni, S. (2016). Effects of larval diet and metamorphosis cue on survival and growth of sea urchin post-larvae (*Paracentrotus lividus*; Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 465, 265-271.
- Brundu, G.; Vallainc, D.; Baroli, M.; Figus, A. M.; Pinna, A. & Carboni, S. (2017). Effects of on-demand feeding on sea urchin larvae (*Paracentrotus lividus*; Lamarck, 1816), development, survival and microalgae

- utilization. Aquaculture Research, 48(4), 1550-1560. doi: 10.1111/are.12990
- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. Marine Biology, 104(2), 275-289.
- Castilla-Gavilán, M.; Buzin, F.; Cognie, B.; Dumay, J.; Turpin, V. & Decottignies, P. (2018). Optimising microalgae diets in sea urchin *Paracentrotus lividus* larviculture to promote aquaculture diversification. Aquaculture, 490, 251-259. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.20.003
- Castro, J. J. (2004). Predação humana no litoral rochoso alentejano: caracterização, impacte ecológico e conservação. Tese de Doutoramento. Universidade de Évora, Portugal.
- Carboni, S.; Kelly, M. S.; Hughes, A. D.; Vignier, J.; Attack, T. & Migaud, H. (2012). Evaluation of flow through culture technique for commercial production of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larvae. Aquaculture Research, 1, 5. doi: 10.1111/are.12019
- Cellario, C. & Fenaux, L. (1990). *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): parameters of growth observed during two years following metamorphosis. Aquaculture, 84(2), 173-188.
- George, S. B., Cellario, C., & Fenaux, L. (1990). Population differences in egg quality of *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea): proximate composition of eggs and larval development. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 141(2-3), 107-118.
- DGRM. (2014). PLANO estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014-2020. Direção Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos. Ministério da Agricultura e do Mar, Portugal.
- Dorey, N. (2013). Trans-life cycle impacts of ocean acidification on the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Tese de Doutoramento. Universidade de Gothenburg, Suécia. ISBN: 91-89677-59-5
- Fabbrocini, A. & D'Adamo, R. (2010). Gamete maturation and gonad growth in fed and starved sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Journal of Shellfish Research, 29(4), 1051-1059. doi:10.2983/035.029.0407
- Fernández, R. D. (2013). Caracterização do habitat preferencial do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) nas poças do intertidal rochoso da costa norte

- portuguesa com técnicas de análise multivariada. Tese de Mestrado. Universidade do Porto, Portugal.
- Ferreira, P. M. P. (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Instituto Nacional de Recursos Biológicos IP, 235. ISBN: 978-972-9372-37-7
- Gago, J.; Range, P. & Luís, O. J. (2003). Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. Echinoderm research, 269-276. ISBN 90 5809 528 2
- Gago, J. & Luís, O. J. (2011). Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock. Aquaculture international, 19(1), 181-191. doi: 10.1007/s10499-010-9351-6
- Ghisaura, S., Loi, B., Biosa, G., Baroli, M., Pagnozzi, D., Roggio, T., Uzzau, S., Anedda, R. & Addis, M. F. (2016). Proteomic changes occurring along gonad maturation in the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*. Journal of Proteomics, 144, 63-72.
- Guidetti, P.; Terlizzi, A. & Boero, F. (2004). Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). Fisheries Research, 66(2-3), 287-297.
- Harris, L. G.; Eddy, S. D., n.d. in: Brown, N., & Eddy, S. (2015). Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-96038-7
- Kabeya, N.; Sanz-Jorquera, A.; Carboni, S.; Davie, A.; Oboh, A. & Monroig, O. (2017). Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Sea Urchins: Molecular and Functional Characterisation of Three Fatty Acyl Desaturases from *Paracentrotus lividus* (Lamark 1816). PloS one, 12(1), e0169374. doi: 10.1371/journal.pone.0169374
- Kelly, M. S.; Hunter, A. J.; Scholfield, C. L. & McKenzie, J. D. (2000). Morphology and survivorship of larval *Psammechinus miliaris* (Gmelin)(Echinodermata: Echinoidea) in response to varying food quantity and quality. Aquaculture, 183(3-4), 223-240.
- Lawrence, J. M. (Ed.). (2001). Edible sea urchins: biology and ecology. 2nd edition, (Vol. 32). Elsevier. ISBN-13: 978-0-444-52940-4
- Liu, H.; Kelly, M. S.; Cook, E. J.; Black, K.; Orr, H.; Zhu, J. X. & Dong, S. L. (2007). The effect of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin

- larvae, I. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). Aquaculture, 1(264), 247-262. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12021
- Lozano, J.; Galera, J.; López, S.; Turon, X.; Palacin, C. & Morera, G. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. Marine Ecology Progress Series, 179-191.
- McBride, S. C. (2005). Sea urchin aquaculture. In American Fisheries Society Symposium (Vol. 46, p. 179). American Fisheries Society.
- McEdward, L. R. & Miner, B. G. (2007). Echinoid larval ecology. In Developments in aquaculture and fisheries science (Vol. 37, pp. 71-93). Elsevier. doi: 10.1016/S0167-9309(07)80069-X
- Pawson, D. L. (2007). Phylum echinodermata. Zootaxa, 1668(1), 749-764. ISSN: 1175-5334
- Pinsino, A., & Matranga, V. (2015). Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. Developmental & Comparative Immunology, 49(1), 198-205. doi: 10.10016/j.dci.2014.11.013
- Purcell, S.W.; Samyn, Y.; Conand C. (2012). Commercially Important Sea Cucumbers of The World. Species Catalogue for fishery purposes nº 6. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISSN: 1020-8682
- Rahman, M. A.; Arshad, A. & Yusoff, F. M. (2014). Sea urchins (Echinodermata: Echinoidea): Their Biology, Culture and Bioactive Compounds. In Proceedings of the International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS'14) (pp. 39-48).
- Ramos, R. M. D. M. (2017). Otimização de técnicas reprodutivas do ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) em aquacultura. Tese de Mestrado. Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar de Peniche, Portugal.
- Raposo, A. I. G. (2017). Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e o efeito de três dietas no desenvolvimento das suas gónadas. Tese de Mestrado. Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar de Peniche, Portugal.

- Saldanha, L. & Sacarrão, G. F. (2003). Fauna Submarina Atlântica: Portugal continental, Açores e Madeira. Publicações Europa-América. Portugal. 4ª edição. pp. 361, 232.
- Spirlet, C.; Grosjean, P. & Jangoux, M. (1998). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. Invertebrate reproduction & development, 34(1), 69-81.
- Stefánsson, G.; Kristinsson, H.; Ziemer, N.; Hannon, C. & James, P. (2017). Markets for sea urchins: a review of global supply and markets. Internal Matis report: Skýrsla Mátis, 10-17. ISSN: 1670-7192
- Subasinghe, R.P.; Bondad-Reantaso, M.G.; McGladdery, S.E. (2001). Aquaculture development, health and wealth. In Subasinghe, R.P.; Bueno, P.; Phillips, M.J.; Hough, C.; McGladdery, S.E. & Arthur, J.R. (2000). eds. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February. pp. 167-191. NACA, Bangkok and FAO, Rome.
- Sun, J. & Chiang, F. S. (n.d.) in: Brown, N., & Eddy, S. (2015). Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-96038-7
- Unuma, T.; Sakai, Y.; Agatsuma, Y. & Kayaba, T., (n.d.) in: Brown, N., & Eddy, S. (2015). Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-96038-7
- Walker, C. W.; Unuma, T. & Lesser, M. P. (2007). Gametogenesis and reproduction of sea urchins. In Developments in Aquaculture and Fisheries Science (Vol. 37, pp. 11-33). Elsevier. doi: 10.1016/S0167-9309(07)80066-4
- Walker, C. W.; Unuma, T.; McGinn, N. A.; Harrington, F. E. & Lesser, M. P. (2001). Reproduction of sea urchins. In: Lawrence JM (ed.). The Edible Sea Urchin, Elsevier, Amsterdam, 5-26.

Anexos

1.

Tabela V: Espécies de ouriços-do-mar inicialmente produzidas em cativeiro no Japão. (Adaptado de: Unuma et al. n.d.)

Species	Local price in 2008*, JPY/kg whole weight	Size at maturity	Years to maturity	Distribution
<i>Tripneustes gratilla</i>	744	6–7 cm	1 yr	Okinawa and Kagoshima
<i>Pseudocentrotus depressus</i>	1250	2.4 cm	2 yr	west to Shimane in the Sea of Japan, west to Kanagawa in the Pacific
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	912	2.5 cm	2 yr	Nagasaki to Toyama
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	1849	3 cm	2 yr	Hokkaido, Aomori, Iwate
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	866	4–5 cm	2 yr	North to Toyama in Sea of Japan, north to Ibaraki in Pacific

*Local price was calculated from the average price in 2008 landed in a prefecture where catches each species dominantly.

2.



Figura 20: Gónadas de *Paracentrotus lividus* a secar em papel para obtenção de P_h = constante. O tracejado compreende o sectionamento do terço central da gónada para a análise histológica. (Fonte: fotografia pessoal, 2017)

3. Processamento de tecidos

Desidratação e inclusão em parafina

- Formol - 1 hora
- Etanol 70% - 30 minutos
- Etanol 70% - 30 minutos
- Etanol 96% - 30 minutos
- Etanol 96% - 30 minutos
- Etanol 100% - 1 hora
- Etanol 100% - 1 hora
- Etanol 100% - 1 hora
- Xilol I – 1 hora
- Xilol II – 1 hora
- Xilol III – 1 hora
- Xilol (50%) + Parafina (50%) – 1 hora
- Parafina – 1 hora

3.1. Protocolo de tempos para coloração PAS

Desparafinação e reidratação I

- Xilol I – 5 minutos
- Xilol II – 5 minutos
- Álcool a 100% - 5 minutos
- Álcool a 100% - 5 minutos
- Álcool a 90% - 5 minutos
- Álcool a 70% - 5 minutos
- Álcool a 50% - 5 minutos

Coloração

- Oxidar em ácido periódico 0.5% – 5 minutos
- Lavar em água corrente – 5 minutos
- Enxaguar em água destilada 3 vezes – 1 minuto
- Corar em reativo de Schiff – 15 minutos
- Lavar em água corrente – 5 minutos
- Contra corar em hematoxilina nº 3 Gill – 90 segundos
- Lavar em água corrente – 5 minutos

Desidratação II

- Álcool a 70% - 1 minuto
- Álcool a 90% - 1 minuto
- Álcool a 100% - 1 minuto
- Álcool a 100% - 1 minuto
- Xilol I – 5 minutos
- Xilol II – 5 minutos

4.

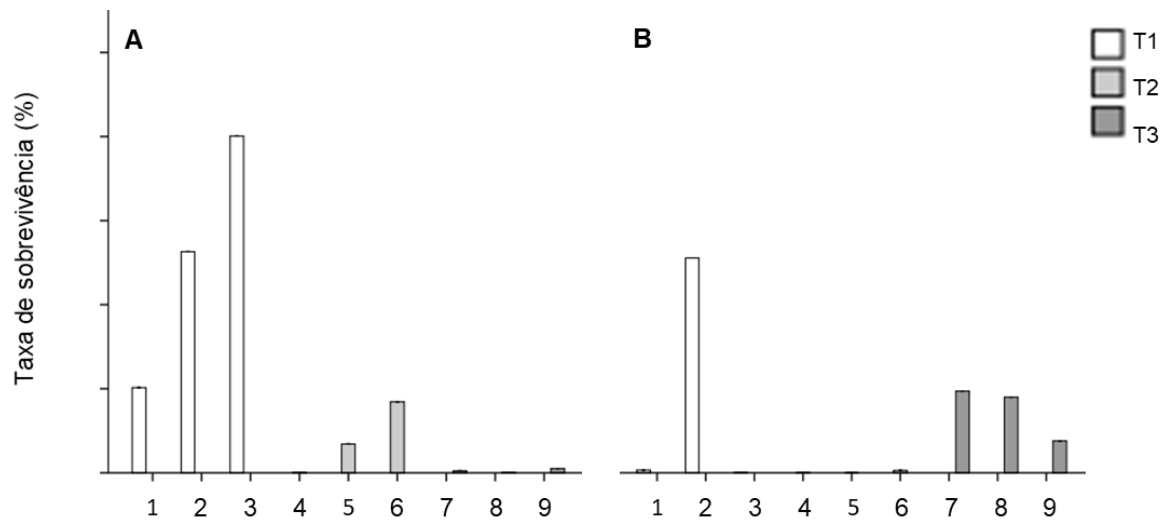


Figura 21: Taxas de sobrevivência larvar de *Paracentrotus lividus* por incubadoras cilindro-cónicas. **A:** Ensaio de alimentação com *Rhodomonas marina*; **B:** Ensaio de alimentação com *Dunaliella tertiolecta*. Tratamento **T1**: Incubadoras 1, 2 e 3; Tratamento **T2**: Incubadoras 4, 5 e 6; Tratamento **T3**: Incubadoras 7, 8 e 9. (Fonte: fotografia pessoal, 2017)