

Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar



**Otimização de técnicas reprodutivas do ouriços-do-mar
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) em aquacultura**

Rodolfo Miguel de Moraes Ramos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

2017

Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar



**Otimização de técnicas reprodutivas do ouriços-do-mar
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) em aquacultura**

Rodolfo Miguel de Moraes Ramos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Susana Ferreira e da
Doutora Ana Pombo

2017

Título: Otimização de técnicas reprodutivas do ouriços-do-mar
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) em aquacultura

Copyright© Rodolfo Miguel de Moraes Ramos

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.

Resumo

Neste estudo avaliou-se a disponibilidade de ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) reprodutores selvagens, na região de Peniche (Portugal), de outubro/2016 a junho/2017. Mostrou-se ser possível obter gâmetas, mesmo fora da época reprodutiva desta espécie. No entanto, a época mais favorável para uma produção de larvas será em março, abril e maio, quando se obteve uma maior percentagem de indivíduos reprodutores e uma maior produção de gâmetas por indivíduo.

O presente trabalho avaliou também algumas técnicas para otimizar a reprodução de *P. lividus* em cativeiro, de forma desenvolver protocolos que possam ser úteis à sua produção em aquacultura, ou mesmo em ensaios de investigação científica. Procurou-se estabelecer uma proporção adequada entre espermatozoides e oócitos, sendo que 500:1 será o mínimo recomendável. Com esta proporção de gâmetas obteve-se uma taxa de fecundação mais eficaz (97%), com um reduzido número de oócitos não fecundados e maior abundância de embriões mais desenvolvidos. Por outro lado, a remoção dos embriões do meio onde se efetuou a fecundação, produziu uma maior quantidade de *P. lividus* ao fim de 12 horas, após a introdução dos gâmetas, do que às 24 horas. A crivagem de embriões e larvas não causou mortalidade diferencial, comparativamente à decantação da água dos meios de cultivo. Pelo que a filtração, com recurso ao uso de crivos, será adequada e eficaz para processos de rotina em aquacultura, auxiliando nos procedimentos de renovação de água e na manutenção da sua qualidade. O cultivo de embriões e larvas *P. lividus*, até ao estágio de larva pluteus com 4 braços, foi bem-sucedido com uma temperatura de 18 °C e salinidade 35,0. Todavia, o desenvolvimento de *P. lividus* foi mais rápido a 23 °C × 35,0, apesar de se ter verificado uma maior mortalidade, provavelmente em consequência da falta de fornecimento de alimentação exógena. A fecundação e desenvolvimento embrionário de *P. lividus* foram inibidos a salinidade 25,0, em ambas as temperaturas de 18 e 23 °C.

Palavras-chave: Equinoderme; Equinocultura; Otimização de cultivo; Proporção sexual; Indução de reprodução; Gâmetas; Maneio; Temperatura; Salinidade.

Abstract

In this study, the availability of reproducing sea urchins *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) from wild broodstocks was assessed, in the region of Peniche (Portugal), from October/2016 to June/2017. It was possible to obtain gametes outside the reproductive season of this species. Notwithstanding, the most favorable periods to produce larvae would be March, April and May, when a larger percentage of reproducers was obtained and a larger production of gametes per individual.

The present work also evaluated some techniques to optimize the reproduction of *P. lividus* in captivity, in order to develop protocols, which can be useful to its production in aquaculture, or even in scientific research assays. It was tested a way to establish an adequate sperm:oocyte *ratio*, being 500:1 the minimum proportion recommended. With this gametal ratio, it was obtained a more effective fecundation rate (97%), with a reduced number of non-fecundated eggs and a major quantity of more developed embryos. On the other hand, the removal of embryos from the mean where fecundation occurred, produced a larger quantity of *P. lividus* after 12 hours, post gametes introduction, than after 24 hours. The filtration of the embryos and larvae did not caused differential mortality, comparing with decantation of the rearing water. Therefore, filtration using a sieve would be adequate and effective for routine processes in aquaculture, aiding in water exchange and maintenance of water quality. Rearing of *P. lividus* embryo and larvae, until the 4 arm pluteus larvae stage, was successful with a temperature of 18 °C and salinity 35,0. However, the development of *P. lividus* was faster with 23 °C × 35,0, even though there was a larger mortality, probably due the lack of exogenous feeding. The fecundity and embryonic development were inhibited at a salinity 25,0, on both temperatures of 18 °C and 23 °C.

Keywords: Echinoderm; Echinoculture; Rearing optimization; Sexual ratio; Reproduction induction; Gametes; Handling; Temperature; Salinity.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. A importância dos ouriços-do-mar, enquanto recurso alimentar	1
1.2. Aquacultura de ouriços-do-mar.....	2
1.3. O ouriço-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	4
1.4. O ciclo de vida do ouriço-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	7
1.5. Objetivos	9
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Amostragem, reprodução e sobrevivência de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816) ...	13
2.1.1. Colheita de Indivíduos	13
2.1.2. Indução de reprodução.....	13
2.1.3. Quantificação de gâmetas.....	13
2.1.4. Avaliação de sobrevivência	14
2.2. Ensaio de otimização da fecundação de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816) relativamente à proporção entre gâmetas	15
2.3. Avaliação do impacto de procedimentos associados ao manuseio, no desenvolvimento embrionário de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	16
2.4. Avaliação da temperatura e salinidade no desenvolvimento embrionário de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	17
2.5. Análise de dados	18
3.1. Amostragem, reprodução e sobrevivência, de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816) ..	23
3.2. Ensaio de otimização da fecundação de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816) relativamente à proporção entre gâmetas	28
3.3. Avaliação do impacto de procedimentos associados ao manuseio, no desenvolvimento embrionário de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	29
3.4. Avaliação da temperatura e salinidade no desenvolvimento embrionário de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	34
4. Discussão.....	39
5. Conclusão.....	47
Referências Bibliográficas	49

Índice de Figuras

Figura 1: Variação de diâmetro da carapaça (A); do peso húmido individual (B); frequência relativa de indivíduos que libertaram (ou não) gâmetas, após a indução de reprodução com cloreto de potássio 0,5 M, bem como a respectiva proporção sexual de indivíduos reprodutores *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (C), da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), de Outubro de 2016 a Junho de 2017. 25

Figura 2: Variação da abundância de gâmetas libertados por machos (A) e fêmeas (B) *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), relacionados com a temperatura média da água do mar e o número de horas de luz diárias, da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), após a indução de reprodução com cloreto de potássio 0,5 M, de Outubro de 2016 a Junho de 2017. 26

Figura 2: Variação da frequência relativa de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), que sobreviveram após a indução de reprodução com cloreto de sódio 0,5 M, de Outubro de 2016 a Junho de 2017. 27

Figura 3: A- Taxa de fecundação dos oócitos para as diferentes proporções utilizadas. B- Densidade de oócitos não fecundados e embriões *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, obtidos 2 horas após a fecundação dos oócitos com diferentes concentrações de espermatozóides. 29

Figura 5: Desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (A) oócito fecundado; (B) blástula; (C) gástrula; (D) Pré-larva; (E) Larva; (BO) boca; (BR) braço (barra = 100 µm). 32

Figura 6: Densidade de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), ao longo de 72 horas, sujeitos a diferentes formas de manejo (decantados ou filtrados) 12 ou 24 horas após a fecundação. 32

Figura 7: Densidade dos diversos estádios de desenvolvimento embrionário no tratamento de decantação após 12 horas de fertilização (A), crivagem após 12 horas de fertilização (B), decantação após 24 horas de fertilização (C) e crivagem após 24 horas de fertilização (D), ao longo de 72 horas. 33

Figura 8: Concentração de amónia, nitrito, nitrato e fosfato na água de cultivo de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), sujeitos a diferentes formas de manejo

(decantados ou filtrados) 12 ou 24 horas após a fecundação, até 72 horas após a fecundação. 34

Figura 9: Densidade de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), sujeitos a diferentes combinações de temperatura e salinidade, ao longo de 72 horas após a fecundação. 35

Figura 10: Densidade dos diversos estádios de desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), sujeitos a temperatura 23 °C e salinidade 35 (A), temperatura 23 °C e salinidade 25 (B), temperatura 18 °C e salinidade 35 (C) e temperatura 18 °C salinidade 25 (D), ao longo de 72 horas, após a fecundação. . 37

Índice de Tabelas

Tabela I: Parâmetros de controlo da qualidade da água, no sistema de recirculação utilizado para o recobro de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816), após a indução de reprodução com cloreto de potássio.	15
--	----

1. Introdução

1.1. A importância dos ouriços-do-mar, enquanto recurso alimentar

Durante muito tempo, o mar foi considerado como uma fonte de recursos inesgotável, como postulou Hugo Grotius, na sua obra *Mare liberum*, em 1609 (Caminos, 2016). No entanto, o crescimento da população humana representa um desafio para sustentabilidade global, principalmente no que se refere à questão da alimentação. Em consequência, vários recursos encontram-se atualmente sobre explorados, ou mesmo esgotados (Worm *et al.*, 2009). No sector das pescas, tem ocorrido um inevitável aumento da pressão sobre os mananciais naturais dos mais diversos organismos marinhos e a consequente diminuição dos mesmos (Matusse *et al.*, 2016). A aquacultura representa uma possível solução para reduzir a pressão sobre alguns desses recursos, ou mesmo para evitar a degradação, ou destruição, dos ecossistemas marinhos. Esta tem como objetivo a produção em cativeiro de peixes, moluscos, crustáceos, algas e equinodermes para que estes sejam depois consumidos pelo Homem (Henriques, 1998; Neto, 2011). Esta prática surge nos mais diversos locais e nas mais diferentes quantidades de produção e vem em resposta à necessidade de alimento, trazendo consigo a produção de produtos de excelente qualidade nutricional (Mestre, 2008; D'Anna e Murray, 2015; Garza-Gil, *et al.*, 2016).

As gónadas de ouriço-do-mar são uma iguaria, muito apreciada nos mais diversos locais do mundo. O seu consumo tem aumentado bastante desde os últimos anos, tornando estes organismos um alvo de pesca (Bertocci *et al.*, 2014; Sartori *et al.*, 2016). A pesca de ouriços-do-mar tem sido bastante intensificada, devido à elevada procura por parte de diversos mercados, mais especificamente Japão e França, que são os principais consumidores (Saito, 1992; Grosjean, *et al.*, 1998; McBride, 2005). Atualmente estima-se que se capturem, mundialmente, cerca 80000 toneladas ano⁻¹, sendo o Chile o principal responsável por este valor, contribuindo com 60% deste valor, exportando grande parte para países como o Japão (Ásbjörnsson, 2011).

Em Portugal, a espécie de ouriço-do-mar mais procurada é *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), cuja captura é realizada por toda a costa, em larga escala, com o principal objetivo de exportar o produto, para satisfazer as necessidades dos mercados Espanhol e Francês (Boudouresque e Verlaque, 2007; Bertocci *et al.*, 2014). Como consequência da sobrepesca destes organismos, existem vários desequilíbrios ambientais nos ecossistemas costeiros. Por exemplo, a densidade e

biomassa das populações endógenas destes recursos têm sofrido reduções acentuadas. Inclusivamente, a sua estrutura populacional tem sofrido alterações, como a escassez de indivíduos mais velhos e de maiores dimensões. Em última instância, estas alterações poderão repercutir-se na perda de biodiversidade, que afetará o estado dos ecossistemas marinhos, bem como dos bens e serviços providenciados por estes (Gianguzza *et al.*, 2006; Ceccherelli *et al.*, 2011; Pais *et al.*, 2012; Bertocci *et al.*, 2014).

1.2. Aquacultura de ouriços-do-mar

A aquacultura de equinodermes é uma prática ainda muito recente, estando ainda longe de se conseguir uma produção eficiente (Grosjean, *et al.*, 1998; Sun e Chiang, 2015). Uma das principais dificuldades reside ainda na falta de informação relativamente à nutrição ideal para o crescimento somático destes organismos, quer para a maturação das suas gónadas, sobre a melhor forma de completar o ciclo de vida e condições gerais de cultivo destas espécies em aquacultura (Fernández, 1996; Grosjean, *et al.*, 1998; McBride, 2005; Sartori *et al.*, 2016). Ainda assim, existem alguns países que já produzem ouriços-do-mar em cativeiro: Japão, República Popular da China, Chile e Noruega.

O Japão é o maior consumidor de ouriços-do-mar do mundo (Sun e Chiang, 2015). Os seus mananciais naturais esgotaram-se em 1960's, levando à necessidade da implementação de aquacultura destes organismos, quer para fins comerciais, quer para fins de repovoamento (Unuma *et al.*, 2015). A produção de várias espécies de ouriço-do-mar - *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1863), *Strongylocentrotus nudus* (Agassiz, 1864), *Pseudocentrotus depressus* (Agassiz, 1864), *Hemicentrotus pulcherrimus* (Agassiz, 1864) e *Anthocidaris crassispina* (Agassiz, 1864) - tem aumentado desde 1989. O ciclo de vida destas espécies é conseguido inteiramente em cativeiro, após produção de larvas é feita a sua engorda, até ao recrutamento e posterior engorda até à comercialização (Sun e Chiang, 2015).

Na República Popular da China (RCP), a maioria de ouriços-do-mar comercializados provêm de produções em aquacultura, nomeadamente de *S. nudus* (Agassiz, 1864) e *S. intermedius* (Agassiz, 1863). Estima-se que a produção anual na RPC seja de 10 milhões de juvenis e 6000 toneladas de indivíduos adultos para consumo (Liu e Chang, 2015).

No Chile, *Loxechinus albus* (Molina, 1782) é produzido com sucesso, em instalações governamentais e privadas. A reprodução é induzida com cloreto de potássio para a obtenção de gâmetas e as larvas são alimentadas com uma mistura de três microalgas [*Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959), *Chaeteoceros gracilis* (Schütt, 1895) e *Isochrysis galbana* (Parke, 1949)]. Depois o recrutamento e a engorda são executados em tanques retangulares de fibra de vidro, inoculados com diatomáceas. Ao atingirem os 5 cm de diâmetro de carapaça, os ouriços-do-mar são transferidos para sistemas de jaula e *long-line* (Mcbride, 2005).

Nos Estados Unidos da América, investiu-se na investigação da produção de ouriços-do-mar em aquacultura, em resposta à sua crescente procura nos mercados internacionais. Atualmente, ainda se procura aperfeiçoar os protocolos de cultivo, desde a produção em maternidades até à engorda de indivíduos adultos. Entretanto, foram implementadas três maternidades para a produção de juvenis, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776), havendo produção para consumo a decorrer em paralelo (Mcbride, 2005; Eddy *et al.*, 2015).

Na Austrália, a aquacultura é uma das atividades comerciais com maior crescimento. No entanto, a produção de ouriços-do-mar ainda está muito subdesenvolvida, apesar de haver um historial de capturas destes organismos com mais de 30 anos (Williamson, 2015). Atualmente, existe investigação a ser feita no sentido de criar protocolos de produção de ouriços-do-mar, sendo as espécies alvo: *Centrostephanus rogersii* (Agassiz, 1863), *Heliocidaris erythrogramma* (Valenciennes 1846) e *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) (Williamson, 2015).

Na Europa, tem vindo a ser desenvolvida a produção de ouriços-do-mar, desde o colapso dos mananciais de ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), em França, na década de 70 (Southward e Southward, 1975). A Noruega tem investido muito trabalho experimental, no que respeita à aquacultura de ouriço-do-mar da espécie *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776), para fins de produção a uma escala industrial (Mcbride, 2005). Recentemente, foi posta em prática toda a investigação feita, no sentido de melhorar os processos de produção de ouriços-do-mar, resultando na produção elevada e boas perspetivas futuras (Siikavuopio e Mortensen, 2015). Igualmente, na Escócia existe a produção de *Psammenechinus miliaris* (Müller, 1771), com protocolos adaptados da produção de *P. lividus* (Kelly *et al.*, 2000). No entanto, ainda é necessário mais trabalho para o melhoramento da produção destes indivíduos (Kelly *et al.*, 2015). Na Irlanda existe produção de larvas de *P. lividus* em cativeiro, recorrendo à

indução da postura dos ouriços-do-mar adultos e ao cultivo larvar em tanques cilindro-cónicos (Mcbride, 2005).

Embora se tenha vindo a investir muita na investigação e produção das mais diversas espécies de ouriços-do-mar, tem havido pouco sucesso na sua produção, desde a fecundação até os indivíduos atingirem um tamanho comercializável. A reprodução para repovoamento tem-se mostrado uma opção alternativa. Porém, tem-se deparado também com algumas barreiras para o sucesso total. O crescimento lento destes organismos torna-se um grande obstáculo para a realização de todo o ciclo de vida em cativeiro, uma vez que implica recursos e despesas elevadas até que uma empresa possa obter receitas (Kelly *et al.*, 2015).

Atualmente o valor de desembarques de *P. lividus* são muito superiores aos valores de produção deste organismo em aquacultura na Europa (FAO, 2012). Isto mostra a necessidade existente para que se comece a produzir *P. lividus* em aquacultura, quer se produzam exclusivamente juvenis para repovoamento, quer se recorra ao melhoramento da gónada dos indivíduos selvagens. A implementação destas estratégias podem ser decisivas para implementação de um novo recurso alimentar nos mercados e criação de novos postos de emprego, para a mão-de-obra qualificada. *P. lividus* é muito apreciado e pode tornar-se num recurso extremamente valioso, uma vez que existe mercado para esta espécie, nos mais variados locais do mundo, o que torna a sua produção em cativeiro imperativa.

1.3. O ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816), é um equinoderme que apresenta uma distribuição geográfica considerada vasta. Este ouriço-do-mar pode encontrar-se a Este do Oceano Atlântico, estendendo-se ao longo da costa Europeia, desde o Norte de França até ao Sul de Marrocos, incluindo as zonas costeiras das Ilhas Britânicas (entre a Escócia e a Irlanda), dos arquipélagos dos Açores e da Madeira, bem como das Ilhas Canárias (Bertocci, *et al.*, 2014; Fabbrocini *et al.*, 2016), onde as águas são temperadas (Fernandez, 1996). Mas também se distribui no Mar Mediterrâneo, encontrando-se com mais frequência na zona ocidental (Hereu *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2006; Lawrence, 2013). Porém, este ouriço-do-mar ocorre também nos mares das Ilhas Baleares (Haya de la Sierra, 1990; Catoira, 1995; Hereu *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2006; Ouréns *et al.*, 2013; Lawrence, 2013), Tirreno, Jónico (Guidetti *et al.*, 2004; Pais *et al.*, 2007; Pais *et al.*,

2012), Adriático e Egeu (Warnau *et al.*, 1995; Boudouresque and Verlaque, 2007; Pais *et al.*, 2007; Tomšić *et al.*, 2010).

O ouriço-do-mar *P. lividus* é a espécie mais abundante no andar mediolitoral, nomeadamente em poças, das costas rochosas temperadas. Ainda assim, esta espécie ocorre tipicamente no andar infralitoral, habitando zonas pouco profundas da costa até aos 20 m de profundidade (Girard *et al.*, 2012). Quando esta espécie se encontra em mar aberto, está associada a superfícies rochosas, ou a florestas de *kelp* (Prado *et al.*, 2009).

No que diz respeito à alimentação, *P. lividus* é considerado herbívoro (Boudouresque e Verlaque, 2013). Outras espécies de ouriço-do-mar apresentam comportamentos alimentares omnívoros, ou até mesmo carnívoros (Prado *et al.*, 2009; Wangensteen *et al.*, 2011). *P. lividus* apresenta uma preferência alimentar muito generalista, o que lhes possibilita uma dieta alimentar oportunista, baseada no alimento que se encontra imediatamente disponível no meio natural (Barnes *et al.*, 2002). Esta estratégia alimentar caracteriza os ouriços-do-mar como importantes agentes reguladores de diversidade e biomassa de algas. Na ausência de predadores, as populações de ouriços-do-mar aumentam, sendo comum observar a diminuição de inúmeras espécies de algas, algumas das vezes até à desertificação dos fundos marinhos (Guidetti, 2004; Hereu, 2005; Sala *et al.*, 2012).

Quando se fala em nutrição e hábitos alimentares dos ouriços-do-mar é importante também referir as suas migrações ao longo da costa. Estes movimentos ocorrem para que os indivíduos possam procurar alimento - saindo de uma zona onde já não encontram algas suficientes para satisfazer as suas necessidades, para outros lugares onde podem encontrar novo alimento (Pinna *et al.*, 2012). Existem várias diferenças entre populações distintas de ouriços-do-mar, no que toca aos seus comportamentos migratórios. As populações de *P. lividus* do Atlântico e do Mediterrâneo apresentam movimentos migratórios noturnos, que são bastante comuns em equinodermes (Hereu, 2005). No entanto, é comum observar uma migração diurna noutros locais onde exista uma maior abundância de crustáceos ou peixes teleósteos que sejam predadores noturnos (Barnes e Crook, 2001; Guidetti, 2004; Hereu, 2005).

Os ouriços-do-mar *P. lividus* podem atingir um máximo de 7,5 cm de diâmetro de carapaça (Byrne, 1990; Catoira, 1995), tendo uma forma esférica, ligeiramente achatada aboral-oralmente, com simetria penta radiada – ouriços regulares (Lozano *et al.*, 1995). Estes animais apresentam coloração variada, sendo mais comum a cor roxa. No entanto, ainda existem indivíduos de cor verde e diferentes tonalidades de castanho. Na parte

externa do corpo, os ouriços-do-mar apresentam um revestimento de variados espinhos móveis. que assentam num encaixe articulado na carapaça (Mcbride, 2005). Estes animais possuem pés ambulacrários - estruturas extensíveis, dotadas de ventosas nas extremidades, que são emitidas para o exterior da carapaça, através de poros em duas filas de placas esqueléticas (placas ambulacrárias). Estas placas encontram-se unidas por uma matriz de colagénio e interdigitações de calcite, que lhes confere rigidez. Elas alternam com outras duas filas de placas sem poros (placas interambulacrárias). Ao todo, a carapaça dos ouriços-do-mar é um endosqueleto composto por cinco zonas ambulacrárias que alternam com outras 5 zonas interambulacrárias (Ebert, 2013). Os pés ambulacrários são responsáveis pela locomoção e fixação dos ouriços-do-mar ao substrato (Brusca e Brusca, 2003), captura de alimento em suspensão na coluna de água, trocas gasosas e ainda apresentam perceção sensorial química, fornecendo assim informação ao ouriço-do-mar sobre as condições do espaço em que este se encontra (Mcbride, 2005). Estes animais possuem ainda umas estruturas únicas, em forma de pinças – os pedicelários, que agarram e seguram objetos para camuflagem e proteção. Os pedicelários removem corpos/organismos estranhos, que possam incrustar-se na pele que reveste a carapaça destes animais (Brusca & Brusca, 2003; Boudouresque e Verlaque, 2007). Os espinhos móveis e os pedicelários contêm músculos, componentes neuromusculares e outros tecidos, que respondem de forma autónoma a estímulos externos (Brusca & Brusca, 2003; Burke, *et al.*, 2006). Estes localizam-se externamente à carapaça, que é na realidade um endoesqueleto (Hickman *et al.*, 2014).

Na parte inferior do corpo dos ouriços-do-mar regulares (face oral), encontra-se a boca - também conhecida por lanterna de Aristóteles. Esta é constituída por 30 peças esqueléticas, terminando em cinco dentes, cujos movimentos são controlados por vários músculos, e que têm a função de cortar o alimento em porções consumíveis (Ziegler *et al.*, 2012). O sistema digestivo destes animais é de forma tubular, sendo constituído por boca, faringe, esófago, estômago, intestino e ânus. Este último permite a emissão de fezes para a água, no centro do topo da carapaça (face aboral), estando protegido por pequenas peças esqueléticas calcificadas – o periprocto (Smith e Kroh, 2013).

1.4. O ciclo de vida do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

O ciclo de vida de *P. lividus* é bastante complexo, começando com uma fase pelágica planctónica e terminando numa metamorfose que resulta na mudança para uma fase bentónica (McEdward e Miner, 2007; Carboni, 2013,).

A gametogénese nos ouriços-do-mar (ou seja, a formação e maturação das células sexuais na gónada) ocorrem naturalmente, através da atividade de dois grupos de células - as células germinativas e os fagócitos nutritivos (Walker *et al.* 2005). Os fagócitos nutritivos têm várias funções de alto-relevância na gametogénese dos ouriços-do-mar. Quando a gónada está em fase de maturação, estes fagócitos são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes necessários à maturação dos gâmetas. Após a reprodução dos ouriços-do-mar, os fagócitos nutritivos apresentam outra função: a de reabsorver todos os nutrientes existentes na gónada, para que depois se possa recomeçar um novo ciclo de produção de células sexuais (Walker *et al.*, 2005).

Os gâmetas são libertados na coluna de água. Os espermatozoides migram na direção dos oócitos atraídos por quimiotaxia (Gilbert, 2003) ocorrendo fecundação externa (união dos gâmetas exteriormente ao corpo do organismo). O acrossoma do espermatozoide liberta enzimas que digerem a camada de glicoproteínas que protege os oócitos. Posteriormente, existe um reconhecimento espécie-específico do espermatozoide pela membrana vitelina do oócito, com lise parcial de ambas as zonas em contacto, seguida pela fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a do oócito. A superfície deste apresenta microvilosidades, que sofrem uma extensão do seu comprimento, graças à polimerização de actina. Esta é ativada pela presença do espermatozoide, formando-se o cone de fecundação, que permite a penetração do espermatozoide no oócito. Simultaneamente, o oócito inicia dois mecanismos para evitar a ocorrência de polispermia, ou seja, a fecundação por mais do que um espermatozoide (Giudice, 1973; Gilbert, 2003; Walker *et al.*, 2013): 1) uma reação rápida transitória de despolarização elétrica da membrana plasmática, que age com uma barreira seletiva entre os meios interior e exterior ao citoplasma 2) uma reação lenta que permite a remoção dos demais espermatozoides. Esta envolve a exocitose de grânulos corticais, os quais são acionados pelo aumento da concentração de cálcio no citoplasma. Ao fundirem-se com a membrana plasmática do oócito, libertam várias substâncias entre esta e a membrana vitelina. Entre essas substâncias encontram-se: 1) proteases, que destroem as proteínas que mantêm a ligação entre a membrana plasmática e a membrana vitelina; 2) polissacarídeos, que produzem um gradiente osmótico, para

promover a entrada de água entre a membrana plasmática e a membrana vitelina, permitindo a expansão desta última (membrana de fecundação); peroxidase, que atua para endurecer a membrana vitelina; 3) hialina, que forma uma camada transparente em redor do oócito, à qual se ligam as microvilosidades extensivas da superfície do ovo. Esta última serve de suporte aos blastómeros, durante a segmentação.

No caso dos ouriços-do-mar, os oócitos são oligolécitos (com pouca quantidade de vitelo), o que permite um desenvolvimento embrionário mais acelerado (Gilbert, 2003). O zigoto destes animais entra num processo de multiplicação celular – segmentação, que se caracteriza como holoblástica (ocorrendo em todo o ovo) e radial (em que os sulcos entre células são perpendiculares e paralelos eixo polo animal - polo vegetativo). Na primeira divisão celular, a citocinese ocorre meridionalmente, ou seja, paralela ao eixo polo animal - polo vegetativo, resultando em 2 células. A segunda divisão sucede-se também num plano meridional, mas num ângulo de 90°, relativamente à primeira. Ao passo que a terceira mitose efetua-se num plano equatorial, perpendicularmente ao eixo polo animal - polo vegetativo, obtendo-se 8 células de tamanho idêntico (blastómeros). À quarta mitose, as 4 células no polo animal dividem-se meridional e equitativamente (mesómeros). Por seu lado, as 4 células do polo vegetativo sofrem uma divisão equatorial desigual. Desta forma, resultam 4 células maiores, mais próximas da região equatorial do embrião (macrómeros), e 4 mais pequenas, na extremidade do polo vegetativo (micrómeros). Depois, os 8 mesómeros sofrem divisão equatorial, os 8 macrómeros e os 8 micrómeros dividem-se meridionalmente. Seguem-se uma sexta divisão, no plano equatorial e uma sétima divisão meridional, para todas as células. A partir das 128 células inicia-se a formação da blástula - estágio em que o embrião é uma esfera oca, com células de idêntico tamanho, a rodearem a cavidade central (blastocélio). As células da blástula desenvolvem cílios orientados para o meio exterior, que permite movimentos de rotação da blástula, no interior da membrana de fecundação. Logo a seguir, as células produzem enzimas que digerem esta membrana, libertando a blástula. Esta passa a ter vida livre, na coluna de água, graças à capacidade natatória conferida pelos cílios (Giudice, 1973; Gilbert, 2003;). De seguida, dá-se origem à gastrulação. Neste momento, a região do polo vegetativo começa a espessar e a sofrer um achatamento. No centro desta placa vegetativa, células resultantes dos micrómeros começam a diferenciar-se, estendendo e contraindo pequenos processos (filipódios) que lhes conferem movimentos vibratórios. Estas células destacam-se da placa vegetativa para o blastocélio, formando um anel na base do embrião (mesênquima primário). Nesse local, as células derivadas dos macrómeros proliferam e ocorre uma invaginação, em direção ao polo animal,

formando o folheto germinativo endoderme. Este delimita um tubo digestivo primitivo (arquêntero) e uma abertura com o exterior, que constitui a boca primitiva do embrião (blastóporo). Em dois pontos laterais do topo da endoderme proliferam células mesenquimatosas secundárias, que conduzem o desenvolvimento do arquêntero até ao polo animal do embrião, onde se funde com a ectoderme (células derivadas dos mesómeros), formando a boca definitiva do ouriço-do-mar. As células mesenquimatosas destacam-se para o blastocélio, onde vão proliferar, originar e desenvolver os órgãos mesodérmicos e a cavidade do corpo (celoma enterocélico). O arquêntero originará o sistema digestivo e o blastóporo constituirá o ânus. Esta é característica dos seres deuterostómios (Gilbert, 2003). As células embrionárias dos ouriços-do-mar não perdem a capacidade de totipotência no estágio de mórula com 32 células, pelo que são organismos de desenvolvimento indeterminado, contrariamente aos restantes invertebrados. Estes animais também possuem desenvolvimento indireto, passando várias metamorfoses e fases larvares, até adquirem o aspeto de um organismo adulto. Após a gastrulação, dá-se origem à larva prismática, ou pré-larva, (com 2 braços), que ao longo do tempo vai sofrendo várias metamorfoses, originando as fases larvares pluteus de quatro braços, depois de seis braços, posteriormente a fase larvar de oito braços, seguido depois para o recrutamento. Neste estágio, a larva pluteus transita do sistema pelágico para o sistema bentónico. Nesta altura, assume a forma de um ouriço-do-mar adulto, mas com um tamanho bastante reduzido, ou seja, um juvenil (Brundu *et al.*, 2016).

1.5. Objetivos

Desde 1800, o desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar tem servido como um modelo de investigação para sistemas biológicos básicos, a nível da fisiologia, bioquímica e biologia do desenvolvimento (Guidice, 1973; Dinnel *et al.*, 1987). Posteriormente, o seu estudo alargou-se à ecotoxicologia e à monitorização da qualidade da água em ecossistemas costeiros (Lera e Pellegrini, 2006; Lera *et al.* 2006), inclusivamente em estudos para avaliar possíveis consequências de eventuais alterações climáticas (Girard *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011; Moulin *et al.*, 2011; Privitera *et al.*, 2011; Catarino *et al.*, 2012). Atualmente, existe investigação a ser feita, no sentido de melhorar os processos de produção de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), em cativeiro. Essa investigação estende-se desde os processos iniciais do ciclo de vida da espécie, como o uso de gâmetas ou mesmo embriões criopreservados e na qualidade e desenvolvimento de larvas (Bellas e Paredes, 2011; Paredes *et al.*, 2015). Paredes *et al.* (2015) determinaram que a criopreservação dos gâmetas de *P. lividus* era capaz de gerar

larvas saudáveis, capazes de se desenvolver normalmente. Estes autores desenvolveram um protocolo, que provaram ser possível, para ser empregue em explorações aquícolas e, ainda assim, conseguir excelentes resultados quanto à produção de juvenis. Bellas e Paredes (2011) também usaram protocolos de criopreservação em blástulas de *P. lividus*. Constataram que estas apresentavam um desenvolvimento sem diferenças estatisticamente significativas, quando comparando com embriões não criopreservados. Referenciaram ainda a importância dos embriões de ouriço-do-mar como material vivo para o estudo dos níveis de poluição em águas marinhas.

Apesar de haver vários estudos para melhorar os protocolos de cultivo de *P. lividus* realizados até esta data, poucos se debruçam sobre o manejo eficiente das fases iniciais do ciclo de vida desta espécie tão importante economicamente - gâmetas, embriões e larvas. Face a isto, o objetivo geral deste trabalho foi otimizar os processos de fecundação e obtenção de larvas *P. lividus* (gâmetas, embriões e larvas). Para tal, estudou-se a disponibilidade de indivíduos reprodutores ao longo do ano, capazes de emitirem gâmetas, quando induzidos a reproduzirem-se, mediante injeção de cloreto de potássio a 0,5 M na cavidade do corpo – o procedimento mais comum. Assim, avaliou-se: 1) a abundância de indivíduos reprodutores disponíveis em cada mês; 2) a respetiva proporção sexual; 3) a variação da abundância de gâmetas (oócitos e espermatozoides) libertados por indivíduo; e 4) a percentagem de ouriços-do-mar que sobreviveram ao procedimento.

Posteriormente, avaliou-se qual a proporção de gâmetas mais eficiente, para obter uma maior abundância de oócitos fecundados, sem ocorrência de polispermia que origine em embriões inviáveis. Assim, determinou-se: 1) a taxa de fecundação e 2) a densidade de oócitos não fecundados e embriões obtidos para cinco proporções de gâmetas distintas, para um mesmo número de oócitos.

Estudou-se o impacto do manejo dos ovos, embriões e larvas no desenvolvimento dos mesmos. Com vista a estabelecer qual a melhor maneira para se efetuar trocas de água, sem prejudicar os organismos *P. lividus* em desenvolvimento, comparou-se: 1) a densidade de embriões obtidos em tempos distintos para ocorrência de fecundação e tipo de manejo empregue para eliminar espermatozoides, oócitos não fecundados e efetuar renovações de água (decantação *versus* fertilização); 2) a qualidade da água de cada sistema de cultivo dos embriões e 3) a densidade e evolução dos estádios de desenvolvimento embrionário e larvares de *P. lividus*, sujeitos aos diferentes tipos de manejo.

Por fim, avaliou-se os efeitos de temperatura e salinidade para 1) o sucesso de fecundação; 2) a densidade de embriões e 3) desenvolvimento embrionário de *P. lividus*. Esta apreciação permitiu contribuir para uma melhor compreensão das condições para cultivo das fases iniciais do ciclo de vida de *P. lividus*. Nomeadamente, quanto à possibilidade de se tentar usufruir dos vários recursos dos sistemas costeiros de águas de transição, geralmente com melhores condições para a implantação e funcionamento de instalações aquícolas para a produção de *P. lividus*.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem, reprodução e sobrevivência de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

2.1.1. Colheita de Indivíduos

Foram recolhidos 30 ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) por mês, desde outubro/2016 até junho/2017. O local de recolha foi a Praia do Abalo (39°22'12.69"N; 009°23'7.07"W), em Peniche, Portugal. Os indivíduos foram recolhidos manualmente e ao acaso, em várias poças na zona intertidal. Tendo em conta que os ouriços-do-mar desta espécie são adultos a partir dos 3 cm (Ouréns *et al.*, 2011), foram só recolhidos indivíduos a partir deste diâmetro de carapaça.

2.1.2. Indução de reprodução

Após a recolha dos ouriços-do-mar, estes foram transportados para o laboratório de Aquacultura do MARE - Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, do Instituto Politécnico de Leiria. Os animais foram lavados em água salgada, para se retirar todo o tipo de algas e outros organismos marinhos, que pudessem estar na superfície dos mesmos. Depois da limpeza, o diâmetro da carapaça dos indivíduos foi determinado com o uso de um paquímetro. Em seguida, foram pesados numa balança analítica (ADAM Equipment PGL 3002 (Adam Equipment Inc., Oxford, Estados Unidos da América)). A postura foi induzida com uma injeção de 1mL de cloreto de potássio a 0,5M, através da membrana peristomial (Liu *et al.*, 2007; Gago e Luís, 2011). Esperou-se 30 minutos até que ocorresse a libertação de gâmetas. Após esse tempo, se não ocorresse a libertação dos gâmetas, os organismos eram designados como não reprodutores (Repolho *et al.*, 2011). Quando se verificava a libertação dos gâmetas, era então registado o género dos indivíduos.

2.1.3. Quantificação de gâmetas

Após a libertação dos gâmetas, estes eram retirados do ouriço-do-mar para um gobelé com 250mL de água salgada autoclavada a 121°C, durante 20 minutos (AJC uniclave 77; A. J. Costa (Irmãos), Lda., Agualva-Cacém, Portugal). Procedeu-se à avaliação da quantidade de gâmetas libertada por cada reprodutor. Os espermatozoides

foram contados com uma câmara de Neubauer a uma ampliação de 400x, e os oócitos contados numa câmara de Sedgewick, com uma ampliação de 50x, ao microscópio ótico composto Zeiss, AXIO Lab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha). Antes de cada contagem, cada solução era homogeneizada por agitação suave, efetuando-se 3 contagens para cada indivíduo. Após todo o esse processo, era então determinada a quantidade total de gâmetas libertados por cada ouriço-do-mar.

2.1.4. Avaliação de sobrevivência

A seguir à indução da reprodução e remoção dos gâmetas, os ouriços-do-mar foram colocados em cada um de três aquários de 60 L, num sistema com recirculação de água. Neste sistema, a água era filtrada fisicamente por intermédio de esponjas e lã de vidro, numa *sump* de 96 L; filtração biológica, e toda a matéria orgânica dissolvida era retirada por parte de um escumador de proteínas Bubble-magus SP1000 (300 h⁻¹, Jiyang Aquarium Equipment Co., Ltd., Guangdong, China). A temperatura da água era regulada para 18 °C, mediante o uso de um refrigerador FRIMAR® F500 (Fernando Ribeiro Lda., Barcarena, Portugal) e uma bomba de recirculação de água Hailea Hx-6530 1750 L h⁻¹, (HAILEA Group Co., Ltd., Guangdong, China). Os ouriços-do-mar foram alimentados com a macroalga *Codium tomentosum* (Stackhouse, 1797) e monitorizados durante 15 dias. Diariamente procedeu-se à medição dos parâmetros físico-químicos da água. Nomeadamente da temperatura, salinidade, pH e oxigénio dissolvido, usando uma sonda multiparamétrica YSI Professional Plus (YSI Incorporated, Yellow Springs, Estados Unidos da América). Os ouriços-do-mar mortos foram removidos (caso existissem) e, nessas circunstâncias, procedia-se a uma troca quase de ²/₃ da água, para evitar a degradação da qualidade da água. No final, realizava-se uma medição dos compostos azotados, com o uso de um fotómetro Hanna Instruments HI 83203 (HANNA Instruments, Póvoa de Varzim, Portugal), de modo a saber-se a concentração exata de amónia, nitrito, nitrato e fosfato. Os ouriços-do-mar estiveram sujeitos às condições especificadas na Tabela I. Posteriormente, calculou-se a taxa de sobrevivência de *P. lividus*, após serem sujeitos a choque osmótico com 1 mL de cloreto de potássio a 0,5 M, como sendo: taxa de sobrevivência (%) = número de sobreviventes ÷ 30 indivíduos × 100.

Tabela I: Parâmetros de controlo da qualidade da água, no sistema de recirculação utilizado para o recobro de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), após a indução de reprodução com cloreto de potássio.

Temperatura	18,4 ± 0,80 ° C
Salinidade	35,0 ± 0,70
Oxigénio dissolvido	7,12 ± 0,38 mg L ⁻¹
pH	8,16 ± 0,12
Amónia	0,68 ± 0,00 mg L ⁻¹
Nitrito	0,02 ± 0,00 mg L ⁻¹
Nitrato	1,50 ± 1,50 mg L ⁻¹
Fosfato	6,25 ± 0,25 mg L ⁻¹

2.2. Ensaio de otimização da fecundação de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) relativamente à proporção entre gâmetas

Em março/2017, capturaram-se alguns indivíduos *P. lividus*, de acordo com os procedimentos e localização descritas em “2.1.1. Colheita de Indivíduos”. Induziu-se a reprodução dos ouriços-do-mar, de acordo com a metodologia descrita em “2.1.2. Indução de reprodução”. Os espermatozoides de três machos (diâmetro de carapaça 3,43 ± 0,11 cm e peso húmido individual 16,14 ± 2,07 g), bem como os oócitos de três fêmeas (diâmetro de carapaça 3,4 ± 0,15 cm e peso húmido individual de 17,58 ± 1,46 g), foram removidos com água marinha autoclavada, de acordo com os procedimentos usados em “2.1.3. Quantificação de gâmetas”, para dois balões Erlenmeyer separados. Determinou-se a concentração das soluções-mãe de gâmetas masculinos e femininos. Para tal, recorreu-se à contagem de espermatozoides numa câmara de Neubauer e de oócitos numa câmara de Sedgewick, observados ao microscópio ótico composto Zeiss, AXIO Lab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha), com ampliações de 400x e 50x, respetivamente.

Prepararam-se 30 balões Erlenmeyer de 100 mL, onde foram adicionados 75 mL de água salgada autoclavada, durante 20 minutos a 121°C AJC uniclave 77; (A. J. Costa (Irmãos), Lda., Agualva-Cacém, Portugal). Em cada balão Erlenmeyer, adicionou-se um volume da solução-mãe de oócitos de forma a ser obtida uma densidade de 200 oócitos mL⁻¹. Posteriormente, adicionou-se um volume adequado da solução-mãe de

espermatozoides, de forma a obter-se 6 réplicas para cinco proporções distintas de gâmetas (espermatozoides: oócitos): 100:1, 200:1, 300:1, 400:1 e 500:1.

Após a mistura de gametas, os balões Erlenmeyer foram colocados numa orbital IKA KS 4000 ic Control (IKA® Works, Inc., Wilmington, Estados Unidos da América), a 145 rotações por minuto, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Depois, as réplicas foram preservadas com formaldeído, a uma concentração final de 4 %.

No final, quantificaram-se os embriões obtidos e avaliou-se o seu estágio de desenvolvimento embrionário. Para cada réplica foram feitas 3 contagens, usando uma câmara de Sedgewick, ao microscópio ótico composto Zeiss AXIO Lab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha), com uma ampliação de 50x. A taxa de fecundação para cada proporção de gâmetas foi calculada com: taxa de fecundação (%) = n° de embriões ÷ total de oócitos × 100.

2.3. Avaliação do impacto de procedimentos associados ao manejo, no desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Em maio/2017, indivíduos *P. lividus* foram recolhidos de acordo com os procedimentos e localização descritas em "2.1.1. Colheita de Indivíduos". Estes foram induzidos a reproduzir-se de acordo com a metodologia descrita em "2.1.3. Quantificação de gâmetas". Os espermatozoides de três machos (diâmetro de carapaça $3,78 \pm 0,16$ cm e peso húmido individual $21,25 \pm 2,37$ g) e os oócitos de três fêmeas (diâmetro de carapaça $3,42 \pm 0,21$ cm e peso húmido individual $18,15 \pm 2,77$ g), foram utilizados para estabelecer 2 soluções-mãe, de concentrações conhecidas, à semelhança dos procedimentos descritos em "Ensaio de otimização da fecundação de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) relativamente à proporção entre gametas".

Em seguida, adicionaram-se os gâmetas a 12 recipientes cilindro-cônicos de plástico, com 1 litro de água autoclavada. Usou-se uma densidade 100 oócitos mL^{-1} e uma proporção de 500:1. Os recipientes eram equipados com arejamento de fraca intensidade.

Esperou-se 12 horas, após a junção dos gâmetas, para selecionar 6 recipientes aleatórios, a fim de se efetuar a eliminação de oócitos não fecundados. Os embriões nestes recipientes foram sujeitos as duas técnicas de manejo distintas: decantação e filtração.

Em 3 dos recipientes optou-se por um processo de troca de água, por meios de decantação. Os oócitos não fecundados apresentam flutuabilidade negativa, ao passo que os embriões movem-se na coluna de água, graças aos cílios desenvolvidos na superfície externa durante a fase de blástula (Gilbert, 2003). Assim sendo, retirou-se o arejamento, de forma a deixar assentar os oócitos não fecundados no fundo dos recipientes. Ao fim de 15 minutos, a água superficial foi transferida para outro recipiente, juntamente com os embriões que nela se encontravam. Seguidamente, acrescentou-se água salgada autoclavada até se perfazer 1 L.

Nas restantes 3 garrafas, a água foi filtrada através de um crivo com uma malha de 80 µm, onde os embriões ficavam retidos. Estes foram transferidos para um outro recipiente contendo 1 L de água salgada autoclavada prístina.

Os restantes 6 recipientes foram sujeitos aos mesmos procedimentos, mas apenas ao fim de 24 horas após a fecundação.

A partir das 24 horas após a fecundação dos oócitos, foram feitas recolhas de 15 mL de cada recipiente, com uma periodicidade de 12 horas, até às 72 horas. Estas amostras foram fixadas com formaldeído, para uma concentração final de 4%.

Posteriormente, avaliou-se a densidade de indivíduos e os respetivos estádios de desenvolvimento embrionário/larvar. Para cada amostra, foram feitas 3 contagens de indivíduos, usando uma câmara de Sedgewick, ao microscópio ótico composto Zeiss, AXIO Lab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha), com a uma ampliação de 50x. Foram contadas e identificadas as blástulas, gástrulas, pré-larvas e larvas de 4 braços

No final do ensaio, foram recolhidas amostras de água dos recipientes usados, para respetiva análise de amónia, nitrito, nitrato e fosfato, sendo utilizado os respetivos testes para o fotómetro Hanna Instruments HI 83203 (HANNA Instruments, Póvoa de Varzim, Portugal).

2.4. Avaliação da temperatura e salinidade no desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Em maio/2017, indivíduos *P. lividus* foram recolhidos de acordo com os procedimentos e localização descritas em "2.1.1. Colheita de Indivíduos". Estes foram induzidos a reproduzir-se de acordo com a metodologia descrita em "2.1.3. Quantificação

de gâmetas”. Os espermatozoides de três ouriços machos (diâmetro de carapaça $3,66 \pm 0,24$ cm e peso húmido individual $16,88 \pm 2,01$ g) e os oócitos de três fêmeas (diâmetro de carapaça $3,97 \pm 0,43$ cm e peso húmido individual $19,64 \pm 4,36$ g) foram utilizados para estabelecer 2 soluções-mãe, de concentrações conhecidas, à semelhança dos procedimentos descritos em “Ensaio de otimização da fecundação de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) relativamente à proporção entre gâmetas”.

Seis recipientes cilindro-cônicos de plástico foram colocados numa sala com a temperatura de $23,2 \pm 0,2$ °C. Os recipientes continham 1 L de água autoclavada, metade com salinidade 35,0 e a outra metade com salinidade 25,0. Outros seis recipientes idênticos, com os mesmos conteúdos foram inseridos noutra sala, com temperatura de $18,7 \pm 0,3$ °C. Arejamento de fraca intensidade foi fornecido em todos os recipientes. Em seguida, adicionaram-se os gâmetas. Usou-se uma densidade 200 oócitos mL⁻¹ e uma proporção de 500:1.

Posteriormente, avaliou-se a densidade de indivíduos e os respetivos estádios de desenvolvimento embrionário/larvar, de acordo com os procedimentos descritos em “2.3. Avaliação do impacto de procedimentos associados ao maneo, no desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)”.

2.5. Análise de dados

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão, excetuando os valores de peso, diâmetro e temperaturas (que foram expressos sob a forma de média \pm desvio padrão). Os dados foram processados com a utilização do programa *Microsoft Office Professional Plus Excel 2016* (Microsoft Corporation, Albuquerque, Estados Unidos da América). Os gráficos de colunas agrupadas, de colunas empilhadas a 100%, de linhas com marcadores e combinações destes tipos foram elaborados com recurso ao mesmo programa. Os gráficos de *boxplot* foram executados com o programa *IBM SPSS Statistics 23* (IBM Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos da América). A caixa de *boxplot* representa o intervalo interquartil (do limite inferior da caixa - 1º quartil ao limite superior da caixa - 3º quartil) que contém o meio 50% dos registos. As linhas que se estendem desde o limite superior e inferior da caixa até aos valores mais altos e mais baixos, que são inferiores 1,5 vezes à gama do intervalo interquartil. A linha preta na caixa indica a mediana. Os círculos são *Outliers* - casos com valores de 1,5 e 3 vezes a gama do intervalo interquartil. As cruces são

extremos - casos com valores mais de 3 vezes superiores ao intervalo interquartil. A média é indicada por um x, mostrado logo acima da mediana.

A análise estatística dos dados foi feita com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics 23* (IBM Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos da América). O nível de significância foi estipulado como sendo $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados relativamente à sua distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Se esses pressupostos se cumprissem, realizaram-se testes paramétricos, caso contrário, usaram-se testes não paramétricos correspondentes (Zar, 2010).

Procurou-se estabelecer uma relação entre os parâmetros ambientais e as observações obtidas na indução da reprodução de *P. lividus*. Os dados de temperatura média da água do mar foram disponibilizados pelo Instituto Hidrográfico da Marinha de Portugal, ao passo que os de fotoperíodo foram adaptados da publicação do Centro Nacional de Previsão Ambiental, pertencente ao Serviço Meteorológico Nacional dos Estados Unidos da América (www.wunderground.com). Correlações de *Pearson* foram executadas para medir a força e direção da associação entre as seguintes variáveis: 1) diâmetro da carapaça e peso húmido individual de *P. lividus*; 2) diâmetro da carapaça e a quantidade de espermatozoides produzida pelos machos; 3) diâmetro da carapaça e a quantidade de oócitos produzida pelas fêmeas; 4) peso húmido individual e a quantidade de espermatozoides produzida pelos machos; 5) peso húmido individual e a quantidade de oócitos produzida pelas fêmeas; 6) a temperatura média mensal da água do mar e o número de *P. lividus* reprodutores; 7) a temperatura média mensal da água do mar e o número de machos; 8) a temperatura média mensal da água do mar e o número de fêmeas; 9) a temperatura média mensal da água do mar e a quantidade de espermatozoides produzida pelos machos; 10) a temperatura média mensal da água do mar e a quantidade de oócitos produzida pelas fêmeas; 11) a temperatura média mensal da água do mar e o número de *P. lividus* sobreviventes ao processo de indução de reprodução; 12) o número de horas de luz diárias e o número de *P. lividus* reprodutores; 13) o número de horas de luz diárias e o número de machos; 14) o número de horas de luz diárias e o número de fêmeas; 15) o número de horas de luz diárias e a quantidade de espermatozoides produzida pelos machos; 16) o número de horas de luz diárias e a quantidade de oócitos produzida pelas fêmeas; e 17) o número de horas de luz diárias e o número de sobreviventes. Os resultados foram apresentados como: r = valor da correlação; valor de significância p .

ANOVA de 1 fator foi usada para comparar 1) a produção total de espermatozoides por macho e 2) a produção total de oócitos por fêmea, ao longo dos

vários meses em que se induziu a reprodução de ouriços-do-mar *P. lividus*. Os resultados foram apresentados como: $F_{\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos}} = \text{valor do teste}$; valor de significância p . Quando se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos, realizaram-se testes *post-hoc* de comparação múltipla (teste de *Bonferroni*) para identificar quais os grupos que diferiam entre si, com base no resultado do valor- $p < 0,05$.

ANOVA de 2 fatores foram empregues para comparar: 1) o diâmetro da carapaça e 2) o peso húmido individual de *P. lividus* induzidos a reproduzir-se ao longo do tempo, relativamente ao facto de serem machos, fêmeas ou não reprodutores; 3) a abundância de *P. lividus* obtidos relativamente à proporção de gâmetas utilizada para realizar a fecundação e o estágio de desenvolvimento embrionário em que se encontravam; 4) densidade de embriões obtidos ao fim de 24 horas após a fecundação, relativamente ao tempo usado para que ocorresse a fecundação, mais o tipo de manejo empregue para eliminar oócitos não fecundados e efetuar renovações de água; 5) a qualidade da água em termos de compostos azotados e fosfatados, relativamente ao tempo usado para que ocorresse a fecundação e o tipo de manejo empregue; 6) densidade de *P. lividus* ao fim de 24 horas após a fecundação, relativamente à temperatura e salinidade da água de cultivo. Os resultados foram apresentados de forma semelhante aos de ANOVA de 1 fator, assim como os testes *post-hoc* de comparação múltipla, sendo o teste de *Tukey* utilizado no ponto 4.

Análises de variância de medições repetidas mistas (ANOVA Mista) foram utilizadas para avaliar: 1) a densidade total de novos indivíduos *P. lividus* relativamente às variáveis “tempo usado para que ocorresse a fecundação” e “tipo de manejo empregue para eliminar oócitos não fecundados e efetuar renovações de água” como fatores entre-sujeitos, assim como a variável “tempo de amostragem” como fator intra-sujeitos (com um *design* fatorial $2 \times 2 \times 5$); 2) a densidade de total de novos indivíduos *P. lividus* relativamente às variáveis “tempo usado para que ocorresse a fecundação”, “tipo de manejo empregue para eliminar oócitos não fecundados e efetuar renovações de água” e “estádio de desenvolvimento embrionário” como fatores entre-sujeitos, assim como a variável “tempo de amostragem” como fator intra-sujeitos (com um *design* fatorial $2 \times 2 \times 5 \times 5$); 3) a densidade de total de novos indivíduos *P. lividus* relativamente às variáveis “temperatura” e “salinidade” como fatores entre-sujeitos, assim como a variável “tempo de amostragem” como fator intra-sujeitos (com um *design* fatorial $2 \times 2 \times 6$); 4) a densidade de total de novos indivíduos *P. lividus* relativamente às variáveis “temperatura”, “salinidade” e “estádio de desenvolvimento embrionário” como fatores

entre-sujeitos, assim como a variável “tempo de amostragem” como fator intra-sujeitos (com um *design* fatorial $2 \times 2 \times 5 \times 6$). Quando se verificava violação do pressuposto de esfericidade (teste de Mauchly), os testes de efeitos intra sujeitos eram analisados segundo Greenhouse-Geisser (Field, 2005). Tal ocorreu para as ANOVA Mistas nº 2, 3 e 4. Por uma questão de simplificação da apresentação dos resultados, optou-se por apresentar apenas os resultados com diferenças estatisticamente significativas dos testes de efeitos intra-sujeitos. Os resultados foram apresentados de forma semelhante aos de ANOVA de um fator, assim como os testes *post-hoc* de comparação múltipla. Executaram-se testes qui-quadrado de *Pearson* para independência, com o objetivo de verificar a relação entre: 1) a quantidade de indivíduos reprodutores e a altura do ano em que foram induzidos a reproduzir-se; 2) o sexo dos indivíduos reprodutores e a altura do ano em que foram induzidos a reproduzir-se; 3) a abundância de ouriços-do-mar sobreviventes relativamente aos momentos de amostragem. Os resultados foram apresentados como $\chi^2_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor do teste, valor de significância } p$.

3. Resultados

3.1. Amostragem, reprodução e sobrevivência, de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

O diâmetro da carapaça dos ouriços-do-mar, recolhidos para indução de reprodução, variou entre 3 cm (macho, não reprodutor) e 4,34 cm (macho) (Fig.1A). O diâmetro da carapaça dos ouriços-do-mar apresentou diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo (ANOVA de 2 fatores: $F_{8;246} = 5,571$; $p = 0,000 < 0,05$), mas não entre o seu gênero (ANOVA de 2 fatores: $F_{2;246} = 1,753$; $p = 0,175 > 0,05$), nem interação entre ambos os fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{13;246} = 1,212$; $p = 0,271 > 0,05$). Os ouriços-do-mar apresentaram maior diâmetro de carapaça no mês de novembro/2016 ($3,70 \pm 0,70$ cm), sendo distintos relativamente a dezembro/2016, março, abril, maio e junho/2017 (testes de *Bonferroni*: $p < 0,05$). Os indivíduos foram menores em maio/2017 ($3,22 \pm 0,61$ cm), distinguindo-se comparativamente a outubro, novembro/2016, janeiro e fevereiro/2017 (testes de *Bonferroni*: $p < 0,05$). Assim como houve uma distinção entre os meses de janeiro ($3,56 \pm 0,05$ cm) e abril/2017 ($3,32 \pm 0,05$ cm) (testes de *Bonferroni*: $p < 0,05$).

O peso húmido individual de *P. lividus*, recolhidos para a indução de reprodução, variou entre 8,52 g, (indivíduo não reprodutor) e 34,46 g (macho) (Fig. 1B). O peso húmido individual apresentou diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo (ANOVA de 2 fatores: $F_{8;246} = 5,737$; $p = 0,000 < 0,05$), mas não entre o gênero (ANOVA de 2 fatores: $F_{2;246} = 3,000$; $p = 0,052 > 0,05$), nem interação entre ambos os fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{13;246} = 1,483$; $p = 0,124 > 0,05$). Os ouriços-do-mar apresentaram maior peso húmido individual em novembro/2016 ($21,64 \pm 1,11$ g) diferente de outubro, dezembro/2016 e abril, maio e junho/2017 (testes de *Bonferroni*: $p < 0,05$). Seguindo-se os observados no mês de janeiro/2017, com valores de peso húmido individual ($20,70 \pm 0,80$ g) superiores e distintos relativamente a outubro e dezembro/2016 e abril, maio e junho/2017 (testes de *Bonferroni*: $p < 0,05$). Os menores valores de peso húmido individual ($14,29 \pm 0,96$ g) foram obtidos em maio/2017, distinguindo-se dos de fevereiro e março/2017 (testes de *Bonferroni*: $p < 0,05$).

Ao longo do tempo, verificou-se uma dependência entre a quantidade de indivíduos reprodutores e a altura do ano em que foram induzidos a reproduzir-se (Fig.1C; teste de qui-quadrado de *Pearson* para independência: $\chi^2_8 = 52,637$; $p = 0,000 < 0,05$). Verificou-se uma menor quantidade de ouriços-do-mar a

libertar gâmetas em dezembro/2016 e janeiro/2017, ocorrendo um valor mínimo na primeira data (23,3%). Por outro lado, a maior porcentagem de *P. lividus* reprodutores ocorreu entre março, abril e maio/2017, atingindo o valor máximo nesta última data (90%).

Observou-se uma dependência entre o sexo dos indivíduos reprodutores e a altura do ano em que foram induzidos a reproduzir-se (Fig.1C; teste de qui-quadrado de *Pearson* para independência: $\chi^2_8 = 75,129$; $p = 0,000 < 0,05$). Entre os indivíduos que libertaram gâmetas, houve um desvio da proporção sexual a favor dos machos ao longo dos meses de outono, atingindo o valor máximo de 5, em novembro/2016. Em dezembro/2016, janeiro e fevereiro/2017 nenhum indivíduo libertou oócitos. Fêmeas reprodutoras somente voltaram a ser encontradas partir de março/2017, sendo que a proporção sexual aumentou até maio/2017 (1,7). Verificou-se uma maior quantidade de fêmeas, relativamente ao número de machos, apenas em junho/2017, em que a proporção sexual diminuiu para 0,6.

No que respeita à quantidade de gâmetas produzidos por *P. lividus* (Fig.2), os machos libertam um maior número de espermatozoides comparativamente aos oócitos produzidos pelas fêmeas. A quantidade de espermatozoides produzidos por macho (Fig.2A) variou ao longo do tempo, apresentando diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de 1 fator: $F_{8,89} = 1,810$; $p = 0,087 > 0,05$). Houve maior produção de gâmetas masculinos em maio/2017 ($3,48 \times 10^9 \pm 1,68 \times 10^9$) e houve menor produção em janeiro/2017 ($1,24 \times 10^9 \pm 3,31 \times 10^9$). Desde outubro/2016, o número total de espermatozoides produzidos diminuiu até janeiro/2017. Posteriormente, verificou-se uma tendência de aumento da libertação de espermatozoides por parte dos machos reprodutores, embora se tenha notado valores inferiores nos meses de março e junho/2017. As diferenças verificaram-se estatisticamente significativas entre os meses de novembro, dezembro/2016 e janeiro/2017 relativamente a abril e maio/2017 (*Bonferroni* $< 0,05$), assim como entre março e maio/2017 (*Bonferroni* $< 0,05$).

No caso dos gâmetas femininos (Fig.2B), a menor quantidade libertada por indivíduo foi de $1,38 \times 10^5 \pm 4,11 \times 10^4$, em outubro/2016. Em dezembro/2016, janeiro, e fevereiro/2017, não se observou qualquer produção de oócitos. No entanto, registou-se novamente libertação de oócitos a partir de março/2017, com a maior produção de $6,42 \times 10^5 \pm 1,81 \times 10^5$ oócitos indivíduo⁻¹ em abril/2017, data a partir da qual se voltou a verificar uma diminuição. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas relativamente à quantidade de oócitos produzidos ao longo do tempo (ANOVA de 1 fator: $F_{5,48} = 2,264$; $p = 0,065 > 0,05$).

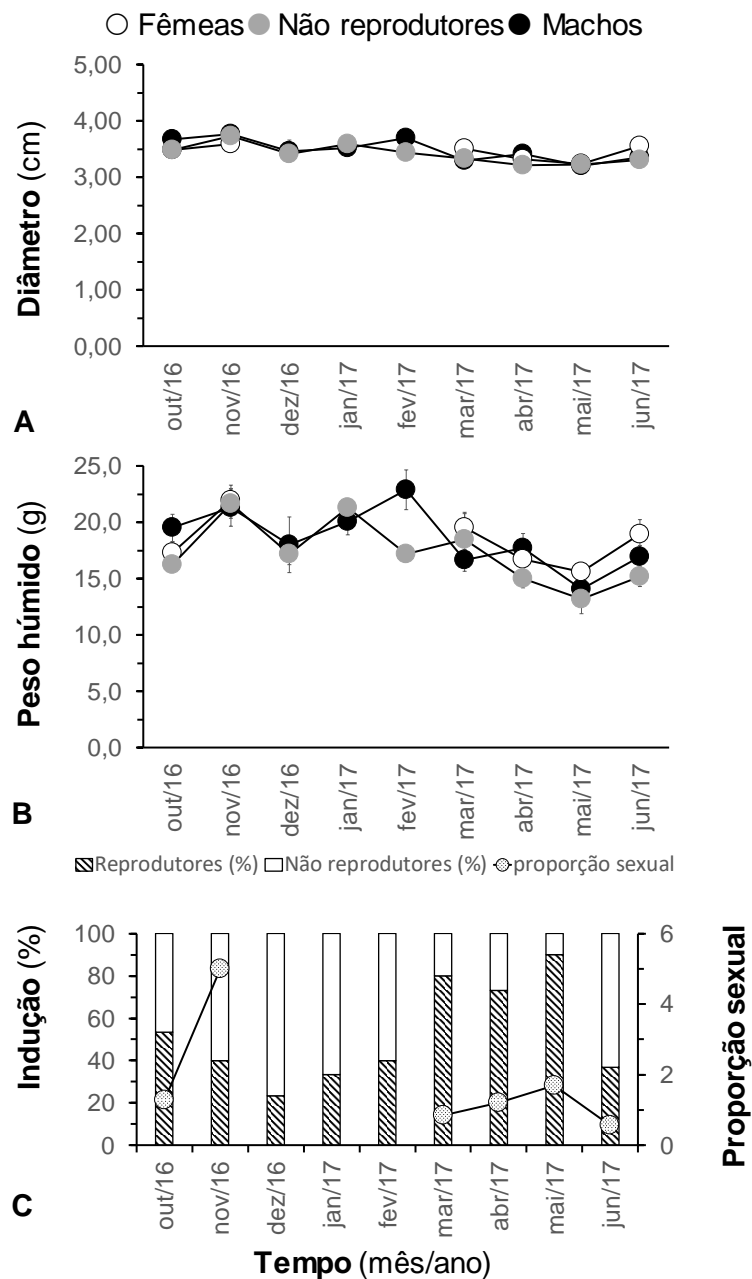


Figura 1: Variação de diâmetro da carapaça (A); do peso húmido individual (B); frequência relativa de indivíduos que libertaram (ou não) gâmetas, após a indução de reprodução com cloreto de potássio 0,5 M, bem como a respectiva proporção sexual de indivíduos reprodutores *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (C), da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), de Outubro de 2016 a Junho de 2017.

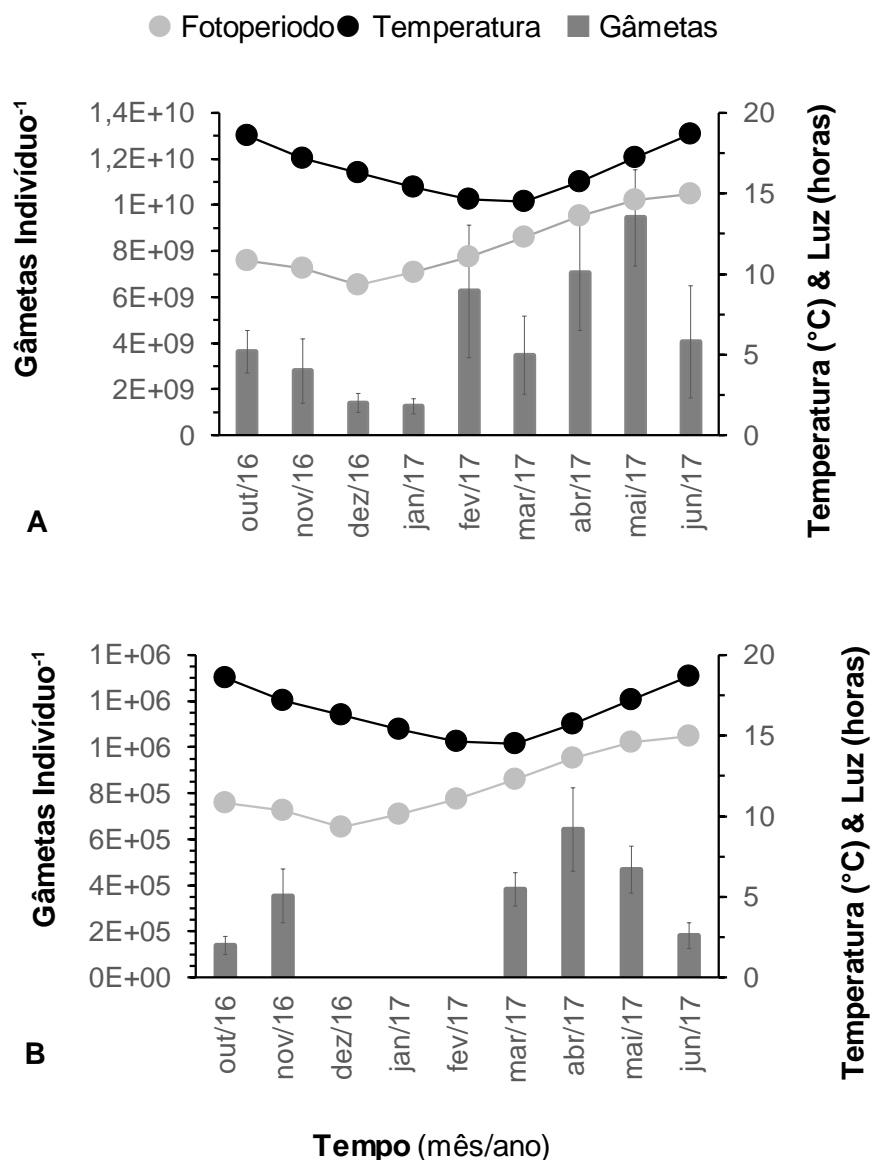


Figura 2: Variação da abundância de gâmetas libertados por machos (A) e fêmeas (B) *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), relacionados com a temperatura média da água do mar e o número de horas de luz diárias, da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), após a indução de reprodução com cloreto de potássio 0,5 M, de Outubro de 2016 a Junho de 2017.

A sobrevivência de *P. lividus*, ao processo de indução de reprodução, foi geralmente inferior a 20 % (Fig.3). Verificou-se uma dependência da abundância de ouriços-do-mar sobreviventes relativamente aos momentos de amostragem (teste de qui-quadrado de *Pearson* para independência: $\chi^2_8 = 82,054$; $p = 0,000 < 0,05$). Os meses de outubro/2016 e fevereiro/2017, demonstraram um desvio relativamente aos valores expectáveis, com reduzido número de sobreviventes (3,33 % e 0,00 %, respetivamente). Ao passo que junho/2016 se destacou, pelo facto de ter sido o mês com maior número de ouriços-do-mar sobreviventes (73,33 %).

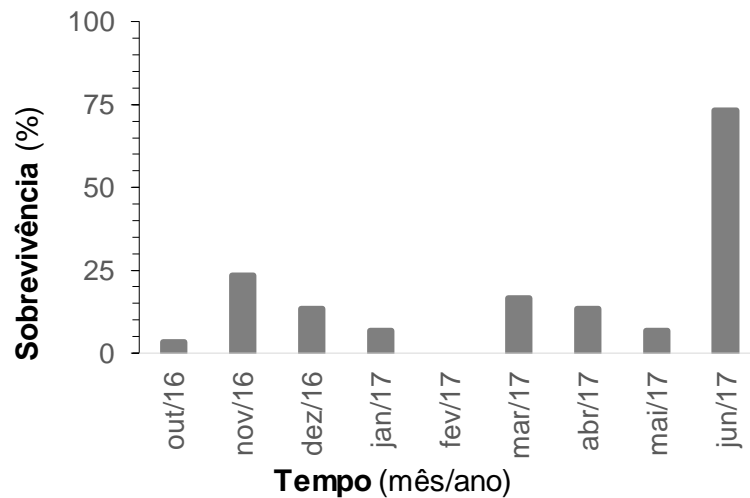


Figura 3: Variação da frequência relativa de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), que sobreviveram após a indução de reprodução com cloreto de sódio 0,5 M, de Outubro de 2016 a Junho de 2017.

A temperatura média da água do mar diminuiu de 18,5 °C de outubro/2016 até 14,5 °C em março/2017, para voltar a aumentar até ao fim de junho/2017 (18,7 °C). O fotoperíodo diminuiu até dezembro, com 9 horas de luz por dia, em dezembro/2016, aumentando progressivamente até 15 horas em junho/2017 (Fig.2). Não se verificou qualquer relação entre o diâmetro e o peso húmido dos indivíduos capturados ao longo dos diferentes momentos de amostragem. Nem mesmo entre cada um destes parâmetros e a produção de gâmetas. Da mesma forma, em que não se verificou qualquer relação entre a temperatura média da água do mar e a abundância de indivíduos reprodutores, machos, fêmeas, espermatozoides ind⁻¹, oócitos ind⁻¹ ou sobreviventes. Ou ainda entre o número de horas diárias e a abundância de indivíduos reprodutores, machos, oócitos ind⁻¹ ou sobreviventes. Verificou-se apenas fortes relações positivas e significativas entre o número de horas de luz diárias e o número de fêmeas que libertaram oócitos (correlação de *Pearson*: $r = 0,715$; $p = 0,030 < 0,05$); bem como entre a quantidade de espermatozoides produzida pelos machos (correlação de *Pearson*: $r = 0,710$; $p = 0,032 < 0,05$).

3.2. Ensaio de otimização da fecundação de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) relativamente à proporção entre gâmetas

Verificou-se uma diminuição da taxa de fecundação (Fig.4A) com o aumento da quantidade de espermatozoides de 100:1 para 200:1, atingindo-se assim o valor mínimo da taxa de fecundação (68 %). No entanto, a taxa de fecundação aumentou com o aumento da quantidade de espermatozoides, a partir da densidade de 300:1, obtendo-se uma taxa de fecundação máxima de 97% com uma proporção de gâmetas de 500:1. Existiu uma associação entre a abundância de oócitos de *P. lividus* fecundados relativamente à proporção de gâmetas utilizada na fecundação (teste de qui-quadrado de *Pearson* para associação: $\chi^2_4 = 471,199$; $p = 0,000 < 0,05$). Sendo que a proporção 500:1 se distinguiu estatisticamente das restantes. Assim como, as proporções 400:1 e 300:1 se distinguiram das 200:1 e 100:1 (testes de *Bonferroni*, $p < 0,05$). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as várias concentrações de gâmetas utilizadas para obter fecundação dos oócitos (ANOVA de dois fatores: $F_{4;75} = 0,15$; $p = 0,961 > 0,05$), nem uma interação significativa entre este fator e o estágio de desenvolvimento embrionário em que se encontravam os oócitos que foram fecundados (ANOVA de dois fatores: $F_{8;75} = 2,59$; $p = 0,15 < 0,05$) (Fig.4B). No entanto, houve diferenças estatisticamente significativas entre os vários estádios de desenvolvimento embrionário (ANOVA de dois fatores: $F_{2;75} = 87,48$; $p = 0,000 < 0,05$). O número de oócitos não fecundados, diminuiu com o aumento da proporção de espermatozoides: oócitos. A proporção de gâmetas que produziu mais oócitos não fecundados foi a proporção de 100: 1 ($66,3 \pm 30,1$ oócitos), sendo que a proporção de 500:1 apresentou menor valor de oócitos não fecundados ($7,4 \pm 1,7$ oócitos). O número de ovos e embriões até ao estágio de 4 células foi idêntico entre as várias concentrações de gâmetas. Os embriões com 8 ou mais células foram distintos dos restantes (Testes de *Tukey*: $p = 0,000 < 0,05$), tendo sido os estádios de desenvolvimento embrionários mais frequentes.

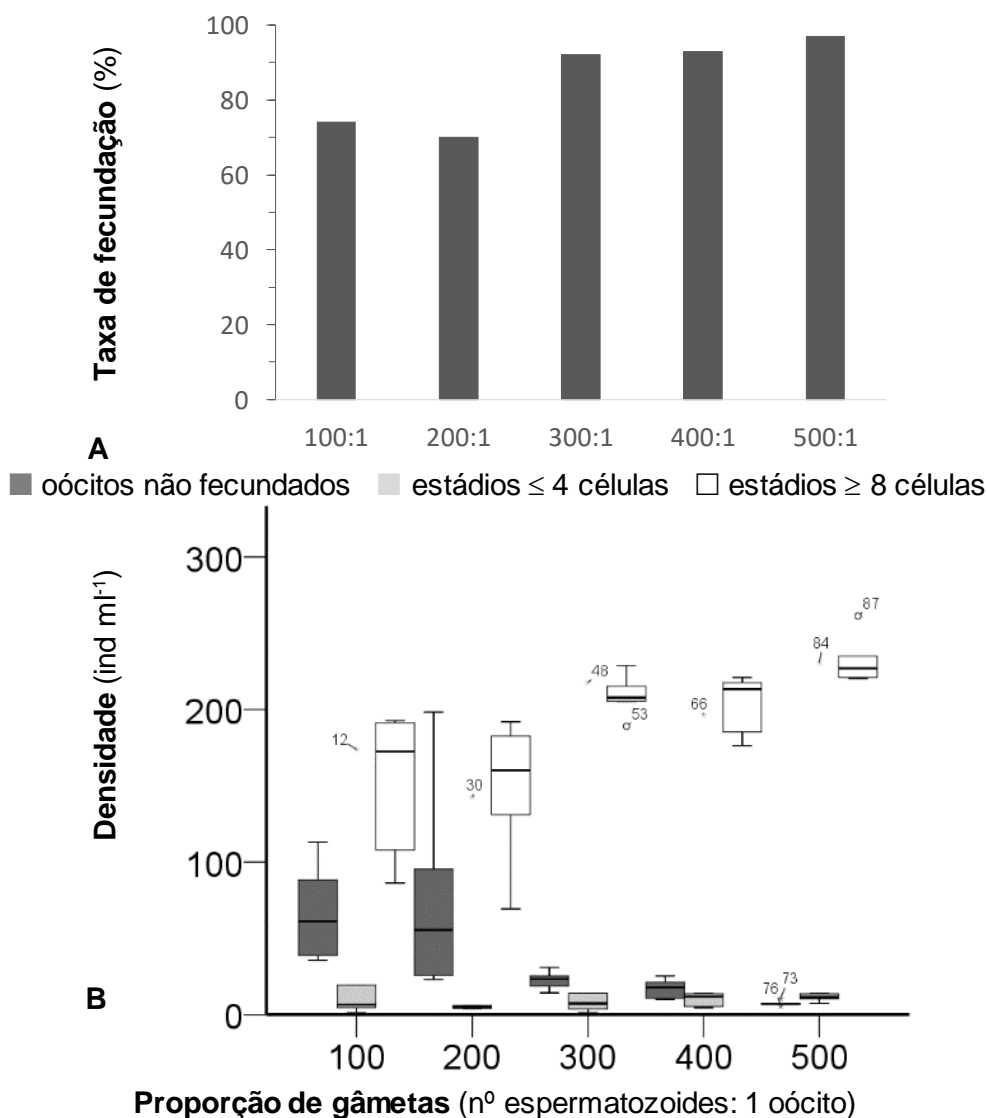


Figura 4: A- Taxa de fecundação dos oócitos para as diferentes proporções utilizadas. B- Densidade de oócitos não fecundados e embriões *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, obtidos 2 horas após a fecundação dos oócitos com diferentes concentrações de espermatozoides.

3.3. Avaliação do impacto de procedimentos associados ao manio, no desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

O desenvolvimento embrionário de *P. lividus* encontra-se ilustrado com os estádios de desenvolvimento analisados no decorrer dos ensaios (Fig.5). A densidade total de embriões *P. lividus* ao final de 24 horas, após a fecundação dos oócitos (Fig.6), não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dois tempos usados para que ocorresse fecundação (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 3,827$; $p = 0,086 > 0,05$), nem entre os tipos de manio utilizados para efetuar renovação de água de cultivo (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 1,784$; $p = 0,218 > 0,05$), ou interação entre os dois fatores

(ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,033$; $p = 0,859 > 0,05$), No entanto, as densidades foram tendencialmente superiores quando se permitiu que a fecundação dos oócitos decorresse durante apenas 12 horas, em vez de 24 horas. Ao passo que, o método de filtração, com recurso ao uso de crivos, também permitiu obter cultivos como maior abundância de indivíduos do que o método por decantação. O tratamento de filtração, ao fim 12 horas, após a fecundação, foi o que produziu maior densidade no primeiro momento de amostragem ($78,6 \pm 5,9$ ind mL⁻¹). Por seu turno, o tratamento de decantação, 24 horas após a fecundação, produziu menor densidade no primeiro momento de amostragem ($45,6 \pm 6,6$ ind mL⁻¹).

A densidade total de novos indivíduos *P. lividus* diminuiu ao longo do tempo (Fig.6), sendo que se obtiveram diferenças significativas ao longo dos diferentes momentos de amostragem [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{4;32} = 9,424$; $p = 0,000 < 0,05$], especialmente depois das 60 horas de ensaio. Testes de comparação múltipla revelaram que a densidade de embriões e larvas apresentou diferenças estatisticamente significativas às 72 horas após fertilização dos oócitos, relativamente aos períodos de amostragem anteriores (Testes de *Bonferroni*: $p < 0,01$), com exceção do tempo de recolha inicial às 24 horas (Teste de *Bonferroni*: $p = 0,57 > 0,05$). No final de 3 dias de ensaio, o tratamento que apresentou maior densidade de indivíduos foi o método de decantação com 12 horas para que ocorresse fecundação ($42,3 \pm 8,9$ ind mL⁻¹), sendo o tratamento de decantação, com 24 horas após a fecundação, o método que produziu menor densidade de novos indivíduos ($29,6 \pm 5$ ind mL⁻¹). No entanto, não se verificou qualquer efeito estatisticamente significativo do tempo usado para que ocorresse fecundação [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1;8} = 0,047$; $p = 0,834 > 0,059$, do tipo de maneo para efetuar renovações de água [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1;8} = 0,052$; $p = 0,826 > 0,05$], ou interação de ambos os fatores [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1;8} = 0,537$; $p = 0,485 > 0,05$], na densidade total de larvas e embriões, ao longo do tempo.

No que respeita às densidades de *P. lividus* em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário/larvar (Fig.6), estas variaram significativamente ao longo dos momentos de amostragem [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,4;56,7} = 4,404$; $p = 0,028 < 0,05$], sendo que se verificou também uma interação momento de amostragem \times estádio de desenvolvimento embrionário/larvar [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{5,7;56,7} = 45,172$; $p = 0,000 < 0,05$]. Por outro lado, não se verificou qualquer efeito estatisticamente significativo do tempo para que

ocorresse fecundação ([ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1;40} = 0,096$; $p = 0,758 > 0,05$], do tipo de manejo para se efetuar renovações de água [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1;40} = 0,055$; $p = 0,816 > 0,05$], ou interação entre os fatores tempo para fecundação \times tipo de manejo [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1;40} = 0,700$; $p = 0,408 > 0,05$], tempo para fecundação \times estágio de desenvolvimento embrionário/larvar [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{4;40} = 0,172$; $p = 0,951 > 0,05$], tipo de manejo \times estágio de desenvolvimento embrionário/larvar [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{4;40} = 0,025$; $p = 0,999 > 0,05$] e tempo para fecundação \times tipo de manejo \times estágio de desenvolvimento embrionário/larvar [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{4;40} = 0,654$; $p = 0,627 > 0,05$]. No entanto, houve diferenças estatisticamente significativas entre as densidades dos novos *P. lividus*, em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário/larvar, onde a densidade de larvas foi significativamente distinta das dos restantes estágios (Teste de *Bonferroni*, $p < 0,05$). Os primeiros estágios de desenvolvimento (blástula, gástrula, pré-larva) foram apenas observados às 24 horas de amostragem, pós fecundação. As larvas *P. lividus* surgiram a partir das 36 horas, em todos os tipos de cultivos. Ainda assim, observou-se um pequeno atraso no desenvolvimento embrionário de *P. lividus*, quando se interferiu com o seu cultivo às 12 horas pós-fecundação. Neste procedimento (Fig.7 A e B), as densidades de gástrulas foram superiores às de pré-larvas, relativamente ao procedimento de renovação de água às 24 horas (Fig.7 C e D), independentemente do tipo de manejo empregue. Oócitos não fecundados foram observados apenas às 24 horas de amostragem, no procedimento em que se efetuou renovação de água às 12 horas, por meio de decantação (Fig.7A).

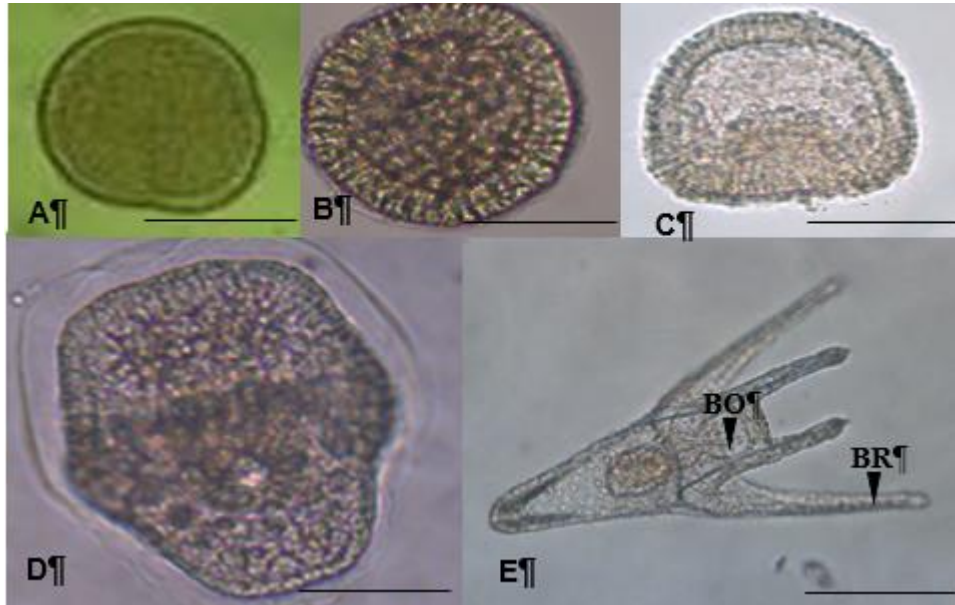


Figura 5: Desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (A) oócito fecundado; (B) blástula; (C) gástrula; (D) Pré-larva; (E) Larva; (BO) boca; (BR) braço (barra = 100 μm).

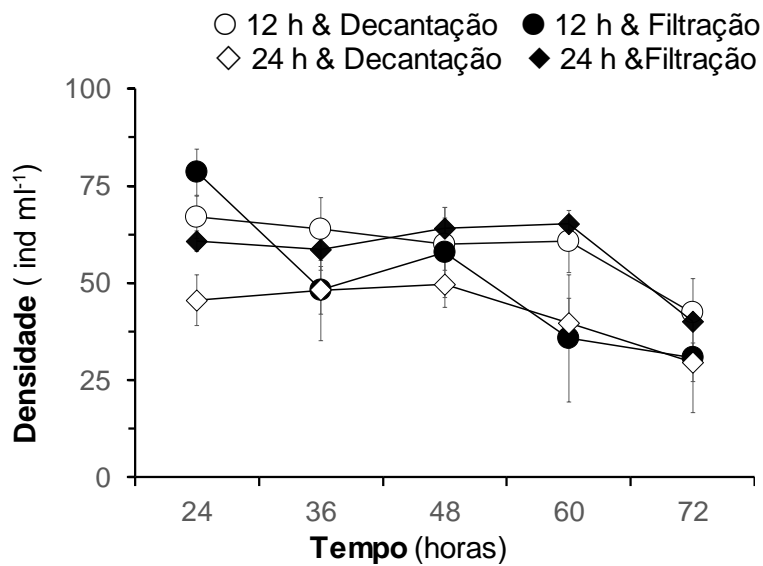


Figura 6: Densidade de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), ao longo de 72 horas, sujeitos a diferentes formas de manejo (decantados ou filtrados) 12 ou 24 horas após a fecundação.

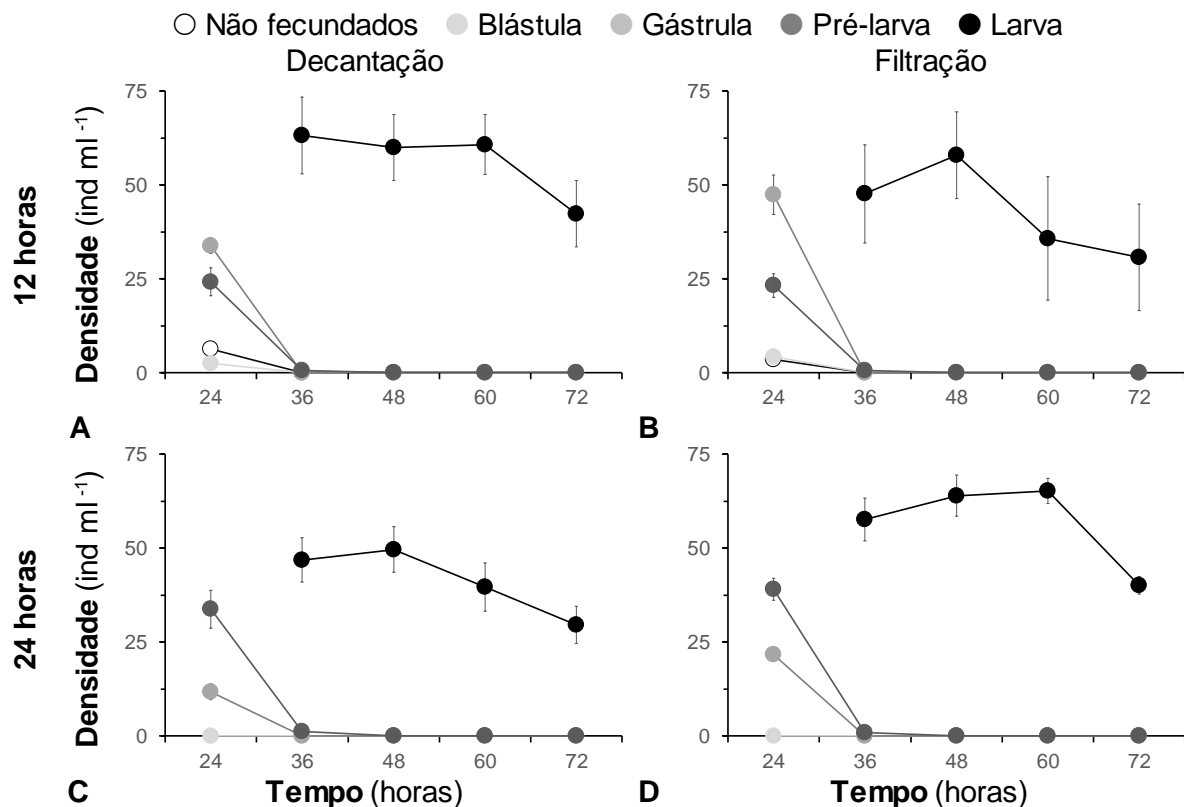


Figura 7: Densidade dos diversos estádios de desenvolvimento embrionário no tratamento de decantação após 12 horas de fertilização (A), crivagem após 12 horas de fertilização (B), decantação após 24 horas de fertilização (C) e crivagem após 24 horas de fertilização (D), ao longo de 72 horas.

Relativamente à qualidade da água dos cultivos (Fig.8), o nitrato foi o único composto cuja concentração diferiu significativamente, no final do ensaio, quanto ao tipo de manejo empregue para a renovação de água (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 5,949$; $p = 0,041 > 0,05$). Nos recipientes, onde foi aplicado o método de crivagem das larvas, existiu menor quantidade de nitratos. Apresentou valores mínimos de 0 mg L^{-1} e $0,70 \pm 0,39 \text{ mg L}^{-1}$ para os cultivos sujeitos a filtração a 12 e 24 horas de tempo para fecundação, respetivamente; e valores máximos de $3,30 \pm 1,34 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,03 \pm 1,27 \text{ mg L}^{-1}$ para os que foram decantados. No entanto, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre o tempo fornecido para que ocorresse fecundação (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,035$; $p = 0,856 > 0,05$), ou interação entre os dois fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,175$; $p = 0,687 > 0,05$). A quantidade de amónia dissolvida não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre o tempo para que ocorresse fecundação (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 4,905$; $p = 0,058 > 0,05$), nem no tipo de manejo empregue (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,530$; $p = 0,487 > 0,05$), ou interação entre os dois fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 1,042$; $p = 0,337 > 0,05$) na água dos

cultivos, no final do ensaio. Ainda assim, os seus valores foram mais elevados no tratamento 24 horas × decantação, com $6,56 \pm 1,19 \text{ mg L}^{-1}$. Também, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre o tempo para fecundação (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 1,392$; $p = 0,272 > 0,05$), nem no tipo de manejo empregue (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 1,624$; $p = 0,238 > 0,05$), ou interação entre os dois fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,020$; $p = 0,891 > 0,05$) na concentração de nitrito dissolvido nas águas de cultivo. O nitrito apresentou maiores concentrações que os restantes compostos, tendo sido registado o maior valor de $14,67 \pm 4,77 \text{ mg L}^{-1}$ para o tratamento 24 horas × decantação. De igual modo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o tempo para fecundação (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 1,063$; $p = 0,333 > 0,05$), nem no tipo de manejo empregue (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,283$; $p = 0,609 > 0,05$), ou interação entre os dois fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 1,497$; $p = 0,256 > 0,05$) na quantidade de fosfato dissolvido nas águas de cultivo, no final do ensaio.

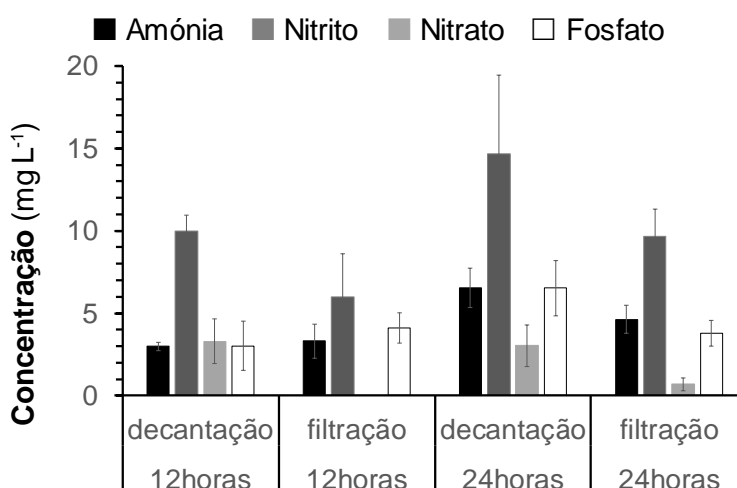


Figura 8: Concentração de amónia, nitrito, nitrato e fosfato na água de cultivo de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), sujeitos a diferentes formas de manejo (decantados ou filtrados) 12 ou 24 horas após a fecundação, até 72 horas após a fecundação.

3.4. Avaliação da temperatura e salinidade no desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Em termos gerais, a densidade total de *P. lividus* denotou diferenças estatisticamente significativas no primeiro momento de amostragem, ao fim de 12 horas após a fertilização. O número de embriões obtido foi estatisticamente distinto entre as duas salinidades utilizadas na água de cultivo (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 51,593$; $p = 0,000 < 0,05$). A salinidade de 35,0 resultou num maior número de

novos indivíduos do que a salinidade de 25,0, para ambas as temperaturas a que os embriões foram sujeitos. Não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as temperaturas utilizadas (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 0,303$; $p = 0,597 > 0,05$), nem interação entre fatores (ANOVA de 2 fatores: $F_{1;8} = 2,919$; $p = 0,126 > 0,05$). A combinação temperatura 23 °C × salinidade 35,0 resultou num maior número inicial de novos indivíduos ($153,2 \pm 11,1$ ind mL⁻¹).

A variação da densidade total de *P. lividus* foi distinta ao longo dos vários momentos de amostragem [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,9;15,1} = 3,991$; $p = 0,042 < 0,05$], bem como interação entre momentos de amostragem × temperatura da água [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,9;15,1} = 5,682$; $p = 0,016 < 0,05$] e momentos de amostragem × temperatura × salinidade [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,9;15,1} = 8,726$; $p = 0,003 < 0,05$]. Ao longo do tempo, verificam-se diferenças estatisticamente significativas relacionadas com a temperatura [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1;8} = 12,639$; $p = 0,007 < 0,05$], salinidade [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1;8} = 282,654$; $p = 0,000 < 0,05$] e interação entre os fatores [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1;8} = 9,957$; $p = 0,013 < 0,05$] na densidade de *P. lividus*. Todos os embriões da salinidade 25,0 desapareceram ao fim de 24 horas, após a fecundação, em ambas as temperaturas. A densidade de *P. lividus* na salinidade 35,0 diferiu entre as duas temperaturas testadas. A densidade aumentou progressivamente a 18 °C, até às 48 horas após a fertilização, alcançando o valor máximo de $179,6 \pm 2,0$ ind mL⁻¹. Ao passo que, a densidade a 23 °C diminuiu até ao valor mínimo de $58,0 \pm 11,7$ ind mL⁻¹ às 60 horas.

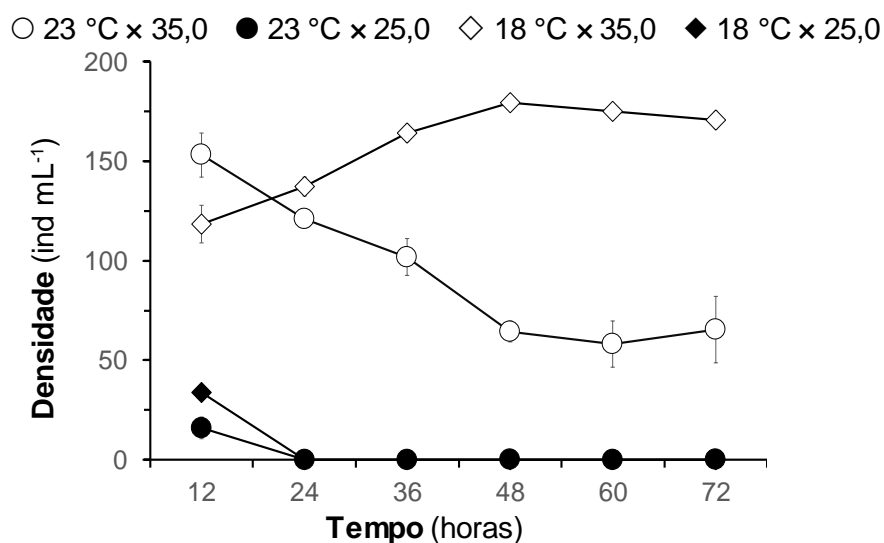


Figura 9: Densidade de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), sujeitos a diferentes combinações de temperatura e salinidade, ao longo de 72 horas após a fecundação.

A variação da densidade dos diversos estádios de desenvolvimento embrionário/larvar não apresentou diferenças estatisticamente significativas apenas ao longo dos momentos de amostragem [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,8; 72,3} = 2,932$; $p = 0,065 > 0,05$]. No entanto, todas as interações foram significativas: 1) momentos de amostragem \times temperatura [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,8; 72,3} = 9,280$; $p = 0,000 < 0,05$]; 2) momentos de amostragem \times estágio de desenvolvimento embrionário [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,8; 72,3} = 113,67$; $p = 0,000 < 0,05$]; 3) momentos de amostragem \times temperatura \times salinidade [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,8; 72,3} = 13,021$; $p = 0,000 < 0,05$]; 4) momentos de amostragem \times temperatura \times estágio de desenvolvimento [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{7,223; 72,331} = 53,673$; $p = 0,000 < 0,05$]; 5) momentos de amostragem \times salinidade \times estágio de desenvolvimento [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,8; 72,3} = 105,541$; $p = 0,000 < 0,05$]; 6) momentos de amostragem, temperatura \times salinidade \times estágio de desenvolvimento [ANOVA Mista (teste de efeitos intra-sujeitos): $F_{1,8; 72,3} = 56,081$; $p = 0,000 < 0,05$].

Ainda assim, em termos globais as densidades dos indivíduos em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário/larvar foram significativamente influenciadas pela temperatura [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 17,771$; $p = 0,000 < 0,05$], salinidade das águas de cultivo [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 249,011$; $p = 0,000 < 0,05$] e estágio de desenvolvimento [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 52,249$; $p = 0,000 < 0,05$], assim como pelas interações: 1) temperatura \times salinidade [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 14,643$; $p = 0,000 < 0,05$]; 2) temperatura \times estágio de desenvolvimento [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 5,882$; $p = 0,001 < 0,05$]; 3) salinidade \times estágio de desenvolvimento [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 58,781$; $p = 0,000 < 0,05$] e 4) entre todos os fatores [ANOVA Mista (teste de efeitos entre-sujeitos): $F_{1,40} = 6,492$; $p = 0,000 < 0,05$]. O desenvolvimento embrionário/larvar foi mais acelerado com água à temperatura de 23°C e salinidade de 35,0 (Fig.10A). Às 12 horas, já se podia observar uma maior quantidade de gástrulas ($22,7 \pm 3,0$ ind mL⁻¹). As pré-larvas já eram observáveis às 24 horas ($103,1 \pm 4,5$ ind mL⁻¹) e desapareceram às 36 horas. As larvas surgiram a partir das 36 horas ($101,9 \pm 9,4$ ind mL⁻¹) e obteve-se uma densidade de ($65,4 \pm 16,7$ ind mL⁻¹) no final do ensaio. Enquanto que, no tratamento com água à temperatura de 18 °C e salinidade de 35,0 (Fig.10 C), o número de gástrulas às 12 horas foi muito reduzido, atingindo o

4. Discussão

O tamanho dos ouriços-do-mar encontrados no andar mediolitoral foi superior aos 3 cm de diâmetro de carapaça, indiciado como sendo o tamanho mínimo a partir do qual se obtém organismos *P. lividus* adultos (Ouréns *et al.*, 2013). Porém, não se encontraram animais maiores que 4,4 cm, provavelmente devido a um comportamento migratório. Os ouriços-do-mar *P. lividus* são capazes de deslocar-se até cerca de 2 m por dia, para encontrar alimento e abrigo. As distâncias percorridas por estes organismos são maiores na presença de uma comunidade em que os seus predadores são mais abundantes (Hereu, 2005). Entre os seus predadores encontra-se várias espécies de peixes, onde se destacam os sargos *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758) e *Diplodus vulgaris* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817), mas também invertebrados, como a estrela-do-mar *Marthasterias glacialis* (Linnaeus, 1758) (Guidetti, 2004; Hereu, 2005; Bonaviri *et al.*, 2009). Da mesma forma que estes animais apresentam também um comportamento mais ativo durante o dia ou a noite, consoante os seus predadores mais abundantes na comunidade biológica sejam noturnos ou diurnos, respetivamente (Guidetti, 2004; Hereu, 2005). De acordo com o estipulado, no andar mediolitoral encontram-se maioritariamente os indivíduos de menores dimensões, geralmente sujeitos a maior predação por parte de um maior número de outras espécies (Hereu, 2005). Ao passo que os maiores se deslocam para zona mais profundas (Ouréns *et al.*, 2013). Para além deste padrão migratório, também a captura destes animais é mais frequente no andar mediolitoral, em função da maior acessibilidade, facilidade de localização e recolha deste recurso alimentar. Estes fatos combinados impossibilitaram a obtenção de um elevado espetro de diâmetros destes organismos. Nomeadamente, a menor dimensão de *P. lividus* em maio/2017, poderá ter sido consequência de uma maior pressão e seletividade de captura destes organismos, pela ocorrência da tradição da “ouriçada” pascoal e do 3º Festival do ouriço-do-mar da Ericeira no mês anterior (Raposo, 2017; autor, observação pessoal). Estas festividades resultam da qualidade das gónadas e na sua palatibilidade nessa altura do ano, coincidente com valores mais elevados do índice gonadossomático desta população e de maturação das suas gónadas (Raposo, 2017).

A indução de postura, com libertação de gâmetas, foi possível em todos os meses de amostragem, no que respeita a *P. lividus* machos. No entanto, não houve libertação de oócitos, por parte das fêmeas, nos meses de dezembro/2016 a fevereiro/2017. Raposo (2017) analisou a maturação das gónadas de *P. lividus* da Praia do Abalo (Peniche, Portugal), através de métodos histológicos. Esta investigadora observou que a maioria dos indivíduos se encontrava numa fase inicial do desenvolvimento

gametogénico, no final do ano de 2015. Por conseguinte, os resultados deste trabalho corroboram as descobertas da investigadora. Pois, em dezembro/2016 obteve-se uma quantidade muito reduzida de espermatozoides e não foi possível a obtenção de oócitos. Os ouriços-do-mar apresentaram uma maior dificuldade para libertar gâmetas, em épocas sazonais em que *P. lividus* apresenta baixos índices gonadossomáticos (Raposo, 2017), especialmente no caso das fêmeas. Pelo que nestas alturas do ano, será inútil procurar obter indivíduos das populações naturais endógenas de *P. lividus*, que pudessem servir como reprodutores para uma produção aquícola destes organismos. Perante este facto, será necessário optar por outras vias para obter *P. lividus* reprodutores, como estabelecer uma metodologia que permita a maturação destes ouriços-do-mar em cativeiro, sob condições controladas.

Por sua vez, Raposo (2017), observou que a maioria dos indivíduos *P. lividus* possuíam as gónadas completamente maduras em abril e maio/2016. Também neste aspeto, os resultados obtidos neste estudo são concordantes, pois verificou-se uma maior percentagem de indivíduos, em que a indução de reprodução resultou em emissão de gâmetas, nos meses de março a maio/2017. Também a obtenção de espermatozoides e oócitos para a produção de *P. lividus* em cativeiro, foi maior nestes meses. Consequentemente, obter indivíduos *P. lividus* reprodutores a partir de mananciais naturais, com gónadas maduras, será ideal a partir do início da Primavera.

Também outros investigadores observaram, mediante estudos histológicos, que a maturação das gónadas ocorre nos meses em que as temperaturas da água são mais baixas (González-Irusta *et al.* 2010; Pérez *et al.*, 2010; Arafa *et al.* 2012). Pelo que, a temperatura é um fator imprescindível na reprodução de ouriços-do-mar (Byrne, 1990; Pearse e Cameron, 1991; Spirlet *et al.*, 1998; Himmelman, 2008; Pérez *et al.*, 2010), mesmo para outras espécies que não *P. lividus* (Pearse e Cameron, 1991). Apesar de neste estudo não se ter comprovado uma relação estatisticamente significativa entre os vários parâmetros avaliados e este fator, o fotoperíodo demonstrou ser relevante, à semelhança de outras populações de *P. lividus* (Spirlet *et al.*, 2000; Shpigel *et al.*, 2004; McCarron *et al.*, 2010) e de outras espécies, como *Strongylocentrotus purpuratos* (Pearse *et al.*, 1986), *Strongylocentrotus droebachiensis* (Walker and Lesser, 1998) *Loxechinu albus* (Pérez *et al.*, 2010). Quando a temperatura da água e o fotoperíodo decrescem, à medida que se avança para o Inverno, os ouriços-do-mar iniciam o seu ciclo gametogénico. Estes encontram-se prontos a iniciar a época de reprodução, quando a temperatura começa a aumentar, juntamente com o aumento do número de horas diárias (Arafa *et al.* 2012). Embora a época reprodutiva de *P. lividus*, ocorra entre maio e

setembro (Byrne, 1990; Pedrotti, 1993; Spirlet *et al.*, 1998; González-Irusta *et al.*, 2010; Martínez-Pita *et al.*, 2010; Siliani *et al.*, 2016), existem dois momentos cruciais em que a maior parte dos indivíduos iniciam a sua postura naturalmente. Um primeiro, quando a temperatura da água atinge os valores anuais mais elevados e, novamente quando começam a decrescer (Allain, 1975; Régis, 1979; Luis *et al.*, 2005; Arafa *et al.* 2012; Raposo, 2017). Neste trabalho, foi possível induzir a reprodução e obter gâmetas naturais fora da época reprodutiva, embora com resultados limitados. Sendo que, a não obtenção de oócitos nos meses de Inverno muito provavelmente possível.

Análises histológicas são importantes para a compreensão do estado de maturação das gónadas e do ciclo reprodutivo de ouriços-do-mar. Ainda assim, a análise física da quantidade total de gâmetas, torna-se um exercício igualmente importante. Embora, as conclusões de um estudo histológico indiquem que um indivíduo se encontra maturo para se reproduzir, não é garantido que o faça, mesmo quando induzido para isso. Mais ainda, este estudo demonstrou que, mesmo quando os indivíduos se encontram em estágio intermédios de maturação (fora da época de reprodução), foi possível obter gâmetas, para se realizar fecundação e produzir larvas em cativeiro. A análise da possibilidade de produção de larvas, recorrendo exclusivamente a ouriços selvagens, torna-se importante para o desenvolvimento de uma maternidade de *P. lividus*, uma vez que o uso de indivíduos selvagens pode reduzir as despesas de custo de produção (na manutenção de reprodutores em cativeiro, alimentação, energia elétrica, água e resíduos).

No decorrer das amostragens mensais, recorreu-se sempre ao uso de 1 mL de cloreto de potássio 0,5 M, para induzir os ouriços-do-mar a libertar gâmetas. Este método mostrou-se muito eficaz para esse fim, mas a sobrevivência dos indivíduos foi variável. A sobrevivência registou-se entre 0 e 23 %, excetuando o mês de junho/2017, com valores mais elevados (73 %). Gago e Luís (2011) obtiveram uma sobrevivência semelhante de 15 %, em ouriços-do-mar *P. lividus* injetados com a mesma quantidade de cloreto de potássio, à mesma concentração. Os investigadores Luís *et al.* (2005) remetem para a importância para se adequar a quantidade e concentração de cloreto de potássio injetado ao tamanho dos ouriços-do-mar, de modo a que se consiga obter uma quantidade elevada de gâmetas libertados, sem mortalidade dos organismos reprodutores.

Relativamente à sobrevivência de *P. lividus* em junho/2017, esta revelou uma tendência concomitante nos meses seguintes de Verão (autor, observação pessoal). A razão dessa tendência, poderá dever-se ao facto do aumento dos tecidos reprodutores no interior do corpo, auxiliarem na diluição do efeito do cloreto de potássio. Nos períodos

em que a massa gonadal seja mínima, o choque osmótico sobre as células somáticas terá maior impacto sobre a fisiologia do animal, pelo que poucos conseguirão suportar. Mais ainda, quando há um investimento das reservas energéticas para a produção gonadal. No entanto, não existe qualquer confirmação para a explicação oferecida, pelo que será um aspeto passível de investigação futura.

Para que se possa implementar uma maternidade de *P. lividus*, será necessário conhecer todos os fatores que possam influenciar o processo de fecundação e a forma como o otimizar (Levitan *et al.*, 1991). Um dos primeiros procedimentos que mais pode influenciar a fecundação dos oócitos é a proporção de gâmetas. Ou seja, estipular a quantidade de espermatozoides que são necessários adicionar a uma solução com oócitos em suspensão, para que haja uma elevada taxa de fecundação, mas não polispermia. Uma baixa proporção entre gâmetas pode resultar em baixa fecundidade e levar a níveis baixos de produtividade. Por outro lado, se se utilizar uma proporção demasiado elevada, pode acontecer a polispermia. Neste caso, a fecundação dos oócitos, por mais do que um espermatozoide, irá inviabilizar os embriões. Na eventualidade de acontecer, esta ocorrência representa um prejuízo económico para uma maternidade de uma exploração aquícola, assim como desperdício de ouriços-do-mar reprodutores, com maior impacto sobre os ecossistemas de onde são oriundos (Dong *et al.*, 2011).

No presente trabalho, a partir da proporção 300 espermatozoides para 1 oócito existiu um maior número de embriões com mais de 8 células, sem diferenças estatisticamente significativas para as proporções 400:1 e 500:1. Pelo que esta proporção de 300:1 será o mínimo necessário para que se verifique níveis aceitáveis de fecundação. Este resultado é concordante com o de Repolho (2012), o qual defende que a concentração inicial de oócitos não influencia a taxa de fecundação, mas poderá repercutir-se posteriormente na sobrevivência larvar, em consequência das adversidades de uma elevada densidade populacional num cultivo. Nesta última proporção, registou-se a maior taxa de fecundação (97%), sem ocorrência de polispermia, e com um número de embriões mais desenvolvidos ligeiramente superior às restantes proporções. A quantidade de espermatozoides adicionada aos oócitos tem uma influência notória na taxa de fertilização (Casselman *et al.*, 2006; Butts *et al.*, 2009). Butts *et al.* (2009) mostraram que o aumento da quantidade de espermatozoides aumenta a fertilização dos ovos de bacalhau, *Gadus morhua*, mas só até determinado ponto, após o qual também não se verificam diferenças estatisticamente significativas. As proporções espermatozoides: oócitos ideais variam de espécie para espécie, dependendo do seu

comportamento reprodutivo e quantidade de gâmetas produzidos (Bekkevold *et al.*, 2002; Rowe *et al.*, 2004). Para a espécie *P. lividus* não existe muito trabalho desenvolvido nesta área, sendo que quando alguns autores necessitam de obter larvas para diferentes fins, usam proporções muito diferentes entre si (muitas das vezes, desconhecidas), não existindo um protocolo definido (Repolho *et al.*, 2011; García *et al.*, 2015; Sartori *et al.*, 2016).

Byrne *et al.* (2009) obtiveram uma taxa de fertilização de 85 %, para o equinóide *Heliocidaris erythrogramma* (Valenciennes, 1846), com uma proporção de 100 espermatozoides por cada oócito. Esta taxa foi um tanto reduzida, quando comparada com a utilizada por investigadores como Paredes *et al.* (2015) e Sartori *et al.* (2016). Estes preferiram utilizar soluções com uma taxa de fecundação ≥ 90 % Ainda assim, Byrne *et al.* (2009) realçam o fato do tamanho do oócito poder influenciar fortemente a fecundação, na medida em que ovos maiores requerem menor número de espermatozoides, sendo mais facilmente encontrados por um espermatozoide. Por conseguinte, oócitos menores requerem maior densidade de espermatozoides, para que se obtenham elevados níveis de fertilização. No seu trabalho Benzie e Dixon (1994) chegaram à conclusão que a taxa de fecundação da estrela-do-mar *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758) aumentava com o aumento da concentração de espermatozoides, apesar de não terem obtido diferenças estatisticamente significativas. Estes autores mostraram que, em época reprodutiva, *A. planci* necessitava de 100 espermatozoides para cada oócito. Fora de época reprodutiva, eram necessários 500 espermatozoides para cada oócito, para que se obtivessem taxas de fecundação elevadas.

No presente estudo, mostrou-se que a proporção de 500 espermatozoides para 1 oócito resulta num maior número de oócitos fecundados. Sendo assim esta proporção a aconselhável para proceder à fecundação de oócitos de *P. lividus*, em futuros protocolos de ensaios com esta espécie

O tipo de manuseio para se realizar renovações de água de cultivo não apresentou influências estatisticamente significativas sobre o sucesso da fecundação, a densidade de indivíduos, nem a velocidade de desenvolvimento embrionário. Este resultado faz com que um operador possa decidir qual o método preferencial para trocar a água de cultivo, consoante as suas necessidades e intentos. No entanto Chan e Gao (2004), referem que para o sucesso do cultivo larvar de ouriços-do-mar têm de se efetuar trocas de água de volumes elevados (nomeadamente trocas totais), para que fezes, restos de alimentos e até mesmo larvas mortas não deterioresem a qualidade da água de cultivo. Em tais

situações, resultam atrasos no desenvolvimento dos organismos, elevada mortalidade, ou mesmo perda do cultivo.

No presente trabalho, a qualidade da água de ambos os tipos de sistemas de cultivo experimentais foi bastante sofrível, com elevadas concentrações de amônia e nitrito. Os valores evidenciaram a resistência dos embriões e larvas *P. lividus* às alterações dos parâmetros ambientais da sua água de cultivo. Bem como, a necessidade de repensar um sistema de recirculação de água para estes organismos, durante o seu desenvolvimento embrionário e larvar. Segundo investigadores como: Kelly *et al.*; Liu e Chang; Siikavuopio e Mortensen; Williamson (2015), a renovação de água e consequente manejo larvar só devem ocorrer após o aparecimento das larvas, e não durante o desenvolvimento dos estádios embrionários. A partir desse momento, trocas parciais de água deverão ser realizadas diariamente. No caso do pepino-do-mar *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867), as trocas de água só são recomendadas a partir do terceiro dia como larvas (Katow *et al.*, 2015), sendo que dentro dos equinodermes, os pepinos-do-mar apresentam melhor resistência à deterioração da água (Katow *et al.*, 2015).

A qualidade da água é um fator fulcral para o sucesso de qualquer exploração aquícola. O método de troca de água por crivagem resultou em menor quantidade de amônia, nitrito e nitrato, quando comparado com método por decantação. Com este último método, o volume de água renovada é bastante reduzido. O método de crivagem torna-se mais eficaz para a sobrevivência larvar, a longo prazo, visto que promove melhor qualidade da água (Carboni *et al.*, 2012, 2013) uma vez que existe uma renovação total de água do cultivo. Por outro lado, este método não induziu mortalidade diferencial dos embriões e larvas, pelo que o seu uso será recomendável.

Um outro fator importante a considerar será o tempo que se utiliza, para que os espermatozoides fecundem os oócitos. De um modo geral, as 12 horas foram suficientes para se obter mais embriões mL⁻¹ do que 24 horas, independentemente do modo de renovação de água. A qualidade da água de cultivo deteriorou-se mais, devido à permanência de sémen, oócitos não fecundados, embriões mortos e metabolitos, durante mais tempo. Na bibliografia pouco se encontra sobre estas temáticas. Por essa razão, é importante que se comece a desenvolver trabalho, no sentido de otimizar esta tarefa rotineira em aquacultura.

A temperatura costuma ser o fator com principal influência no desenvolvimento larvar e fisiologia geral dos invertebrados (Byrne *et al.*, 2010). Embora não se tenha

comprovado estatisticamente que a temperatura tenha influenciado a fecundação de *P. lividus*, observou-se um maior número de embriões produzidos à temperatura de 23 °C, em comparação com 18 °C. Por outro lado, a salinidade foi um fator crucial, uma vez que a 25,0 resultou num menor número de embriões. Os embriões não se desenvolveram para além do estágio de blástula, a 23 °C, sendo que se obtiveram unicamente oócitos fecundados a 18 °C. Mais ainda, a salinidade 25,0 mostrou ser baixa demais para o cultivo larvar de *P. lividus*, uma vez que, ao fim de 24 horas de desenvolvimento embrionário, já não se encontravam embriões viáveis, correspondendo a uma mortalidade total do cultivo. Apesar de a gama de salinidade ótima para o correto desenvolvimento embrionário de *P. lividus* ser indicado como entre 32,0 e 34,0 (Carballeira *et al.*, 2011), este resultado foi indicativo que, o uso de águas de transição seria ineficaz para a produção de larvas de *P. lividus*. Por isso, será bastante difícil estabelecer unidades de produção aquícola de ouriços-do-mar, em ecossistemas com regime de águas de transição, apesar da maior facilidade de localização e dos benefícios da abundância de recursos disponíveis nestes ecossistemas. No entanto, desconhece-se qual a viabilidade destas mesmas zonas para a produção de indivíduos adultos, que podem apresentar maior resistência a *stress* osmótico.

Nos cultivos com 35,0 de salinidade, não se verificaram diferenças significativas entre as temperaturas utilizadas neste estudo. Apesar disso, o número de embriões obtidos a 23 °C foi superior aos sujeitos a 18 °C. Depois disso, a densidade de *P. lividus* diminuiu a 23 °C e aumentou a 18 °C, progressivamente até às 48-60 horas. Este aumento inicial a 18 °C poderá ter resultado de um artefacto da técnica de cultivo, erro de operador, ou ser derivado de uma menor atividade dos embriões a temperaturas inferiores, que tivesse induzido um erro de amostragem/contagem de indivíduos. Mas também, de uma menor velocidade de movimentação dos espermatozoides, que pudessem ter retardado a fecundação dos oócitos, bem como o seu respetivo desenvolvimento embrionário.

No final do ensaio, foi observável que o tratamento de água a 18 °C × 35,0 obteve um maior número de larvas que a 23 °C × 35,0. Isto pode ter-se devido ao fato de uma temperatura de 23 °C permitir um desenvolvimento mais rápido de *P. lividus*, que uma temperatura de 18 °C, como acontece com o ouriço-do-mar tropical *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (Sewell e Young, 1999). Efetivamente, os vários estádios embrionários e larvares de *P. lividus* surgiram com 12 horas de antecedência a 23 °C, relativamente aos que se encontravam a 18 °C. Este desenvolvimento mais acelerado implica maiores gastos metabólicos de recursos alimentares estruturais e

energéticos. Neste ensaio não foi fornecido alimento exógeno, pelo que as larvas do tratamento de água a 23 °C poderão ter morrido por falta de alimento. Este decréscimo mais brusco na densidade de *P. lividus*, também pode ter dependido da temperatura em si, ser demasiado elevada para a sobrevivência das larvas, causando deformações e a sua inviabilidade (Byrne *et al.*, 2009). No entanto, também outras espécies demonstraram um aceleração do desenvolvimento larvar a temperaturas mais elevadas, como no caso do ouriço-do-mar tropical *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) (Brennand *et al.*, 2010), para o qual a temperatura de 23 °C se encontra na gama ideal para o desenvolvimento rápido e saudável das larvas (Rahman *et al.*, 2009).

O uso de uma temperatura adequada é imperativo para uma produção aquícola, de modo a obter um desenvolvimento saudável e mais rápido dos organismos, de forma sustentável (Liu e Chang, 2015). O desenvolvimento embrionário e larvar até ao estágio de larva pluteus com 4 braços demonstrou-se fiável a 18 °C, com baixa mortalidade até ao momento em que será necessário fornecer alimento exógeno (Fenaux *et al.* 1994). Por outro lado, apresentou um desenvolvimento mais lento que a 23 °C, em que se verificou alguma mortalidade embrionária/larvar. Por conseguinte, será necessário que se realizem mais ensaios, com gamas de temperatura intermédias entre 18° e 23°C, para avaliar o comportamento dos embriões e larvas de *P. lividus* em diferentes estádios. Nomeadamente, incluir o fornecimento de alimento exógeno a partir das 24 horas após a fecundação, em que a 23 °C, as larvas pluteus já evidenciavam 4 braços, estágio a partir do qual o seu sistema digestivo se torna funcional (Fujisawa, 1989). A investigação científica nesta vertente será imperativa para se produzir eficientemente *P. lividus* em cativeiro, uma vez que os ouriços-do-mar são sensíveis à variação da temperatura da água. A influência desta sobre a sua sobrevivência, distribuição espacial, produção somática e gonadal, reprodução, desenvolvimento embrionário e larvar, bem como no seu recrutamento (Fujisawa, 1989; Sewell & Young, 1999; Rahman *et al.*, 2009; Brennand *et al.*, 2010), é distinta para cada espécie. Além, de que cada estágio de desenvolvimento embrionário e/ou larvar poderá apresentar uma tolerância específica para a variação da temperatura da água (Sewell & Young, 1999; Rahman *et al.*, 2009).

5. Conclusão

Este trabalho permitiu determinar quais os meses onde se pode utilizar ouriços-do-mar de mananciais naturais para reprodução em cativeiro, de modo a que se possa implementar uma maternidade destes organismos. Mostrou-se que é possível produzir gâmetas, mesmo fora da época reprodutiva de *P. lividus*. A altura mais favorável para uma maior produção de larvas será em março, abril e maio, porque se obteve uma maior percentagem de indivíduos reprodutores e uma maior produção de gâmetas por indivíduo. No entanto, é de ter em conta que a produção de gâmetas pode variar com a temperatura da água, fotoperíodo e disponibilidade de alimento. Nos meses de Inverno, uma produção aquícola terá de recorrer a outras metodologias para obter organismos reprodutores, nomeadamente recorrer ao acondicionamento, engorda e maturação de *P. lividus* em cativeiro.

Para que se consiga desenvolver uma maternidade de *P. lividus*, para produção deste organismo em aquacultura, ou mesmo em ensaios de investigação científica, será necessário que existam protocolos fixos para a fecundação de oócitos. Os resultados deste trabalho apontaram que 500 espermatozoides para 1 oócito será uma proporção mínima recomendável. Em plena época de reprodução desta população, quando os oócitos apresentam um tamanho máximo, foi esta a proporção que obteve uma taxa de fecundação mais eficaz (97%), com um reduzido número de oócitos não fecundados e maior abundância de embriões mais desenvolvidos.

Protocolos de manejo e renovação de água de cultivo para *P. lividus* terão de ser ponderados para uso futuro. De forma garantir a qualidade da água, o método de crivagem demonstrou-se adequado e eficaz, sem causar danos aos embriões e larvas *P. lividus*. O tempo usado para que ocorresse fecundação dos oócitos foi um outro fator relevante. Sendo que 12 horas serão recomendáveis, para um processo mais seguro e eficaz.

O cultivo de embriões e larvas *P. lividus*, até ao estágio de larva pluteus com 4 braços, foi bem-sucedido com uma temperatura de 18 °C e salinidade 35,0. Todavia, o desenvolvimento de *P. lividus* foi mais rápido a 23 °C × 35,0, apesar de se ter verificado uma maior mortalidade, muito provavelmente em função da ausência de alimentação exógena (algo que não foi contemplado no presente estudo). Por outro lado, águas de cultivo com baixa salinidade foram impeditivas para a fecundação e cultivo de fases iniciais do ciclo de vida de *P. lividus*. Por conseguinte, será ainda necessário pesquisar as

várias condições específicas necessárias ao cultivo desta espécie, nomeadamente no que se refere à qualidade da água e das suas necessidades alimentares.

Referências Bibliográficas

- Allain, Y. 1975. Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 39: 171- 212.
- Ásbjörnsson, H. 2011. Management and utilization of green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in Eyjafjörour, Northern Iceland. Dissertação de Mestrado em Ciências de Recursos Naturais. University of Akureyri School of Business and Science Faculty of Natural Resource Science.
- Arafa, S.; Chouaibi, M.; Sadok, S.; El Abed, A. 2012. The influence of season on the gonad index and biochemical composition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from the Gulf of Tunis. The Scientific World Journal.
- Barnes, A.; Crook, C. 2001. Implication of temporal and spatial variability in *Paracentrotus lividus* populations to the associated commercial coastal fishery. Hydrobiologia 465: 95–102.
- Barnes, A.; Verling, E.; Crook, A.; Davidson, I.; O'Mahoney, M. 2002. Local population disappearance follows (20 years after) cycle collapse in a pivotal ecological species. Marine Ecology Progress Series 226: 311–313.
- Bellas, J., Paredes, E., 2011. Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: potential application in marine water quality assessment. Cryobiology 62, 174–180.
- Bekkevold, D.; Hansen, M.; Loeschcke, V. 2002. Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*, L.). Marine Ecology 11, 91–102.
- Benzie, J.; Dixon, P. 1994. The effects of sperm concentration, sperm: egg ratio and gamete age on fertilization success in Crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) in the laboratory. Biology Bulletin 186: 139-152.
- Bertocci, I.; Dominguez, R.; Machado, I.; Freitas, C.; Godino, J.; Sousa-Pinto, I.; Gonçalves, M.; Gaspar, M. 2014. Multiple effects of harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. Fisheries Research 150: 60–65.
- Bonaviri, C.; Fernández, T.; Badalamenti, F.; Gianguzza, P.; Lorenzo, M.; Riggio, S. 2009. Fish versus starfish predation in controlling sea urchin populations in Mediterranean rocky shores. Marine ecology progress series 382: 129-138.

- Boudouresque, C.; Verlaque, M. 2007. Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 37, 243-285.
- Boudouresque, C.; Verlaque, M. 2013. Chapter 1: *Paracentrotus lividus*. em Lawrence. J. Sea urchins: Biology and ecology, Tampa, Florida, USA.
- Brennand, H.; Soars, N.; Dworjanyn, S.; Davis, A.; Byrne, M. 2010. Impact of Ocean Warming and Ocean Acidification on Larval Development and Calcification in the Sea Urchin *Tripneustes gratilla*. *PLoS One* 5: e 11372.
- Brundu, G.; Monleón, L.; Vallaine, 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.
- Brusca, C.; Brusca, J. 2003. Phylum Echinodermata. In *Invertebrates*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 836-871.
- Burke, D.; Angerer, M.; Elphick, R.; Humphrey, W.; Yaguchi, S.; Kiyama, T.; Liang, S.; Mu, X.; Agca, C.; Klein, H.; Brandhorst, P.; Rowe, M.; Wilson, K.; Churcher, M.; Taylor, S.; Chen, N.; Murray, G.; Wang, D.; Mellott, D.; Olinski, R.; Hallböök, F.; Thorndyke, C.; Brandhorst, P. 2006. A genomic view of the sea urchin nervous system. *Developmental Biology*, 300: 434-460.
- Butts, I.; Trippel, E.; Litvak, M. 2009. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture* 286: 89–94.
- 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: 275–289.
- Byrne, M.; Ho, M.; Selvakumaraswamy, P.; Nguyen, H.; Dworjanyn, S.; Davis, A. 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proceeding of Royal Society B* 276: 1883–1888.
- Caminos H (2016). *Law of the sea*. Routledge. Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- Carballeira, C.; Martín-Díaza, L.; DelVallsa, T. 2011. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *Marine Environmental Research* 72: 196-203.

- Carboni, S. 2013. Research and development of hatchery techniques to optimise juvenile production of the edible Sea Urchin, *Paracentrotus lividus*. Doutoramento em fisiologia. Universidade de Stirling, Escócia.
- Carboni, S.; Kelly, S.; Hughes, D.; Vignier, J.; Atack, T.; Migaud, H. 2013. Evaluation of flow through culture technique for sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larvae commercial production. *Aquaculture Research*.
- Carboni, S.; Vignier, J.; Chiantore, M.; Tocher, D.; Migaud, H. 2012. Effects of dietary microalgae on growth, survival and fatty acid composition of sea urchin *Paracentrotus lividus* throughout larval development. *Aquaculture* 324- 325: 250-258.
- Catarino, A.; Bauwens, M.; Dubois, P. 2012. Acid–base balance and metabolic response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different seawater pH and temperatures. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Casselman, J.; Schulte-Hostedde, I.; Montgomerie, R. 2006. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 2119–2125.
- Catoira, L. 1995. Spatial and temporal evolution of the gonad index of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in Galicia, Spain. *Echinoderm Research*, 295.
- Ceccherelli, G.; Pais, A.; Pinna, S.; Sechi, N.; Chessa, L. 2011. Human impact on *Paracentrotus lividus*: the result of harvest restrictions and accessibility of locations. *Marine biology* 158: 845-852.
- D'Anna, L.; Murray, G. 2015. Perceptions of shellfish aquaculture in British Columbia and Implications for well-being in marine social-ecological systems, *Ecology Society* 20: 57.
- Dinnel, P.; Link, J.; Stober, Q. 1987. Improved Methodology for a Sea Urchin Sperm Cell Bioassay for Marine Waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 6: 23-32.
- Dong, Y.; Yao, H.; Lin, Z.; Zhu, D, 2011. The effects of sperm-egg ratio on polyspermy in the blood clam *Tegillarca granosa*. *Aquaculture Research* 43: 44-52.
- Fabbrocini, A.; Maurizio, D.; D'Adamo, R. 2016. Sperm motility patterns as a tool for evaluating differences in sperm quality across gonad development stages in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture* 452: 115–119.

- FAO (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, Rome. ISBN 978-92-5-107225-7.
- Fernández, C. 1996. Croissance et nutrition de *Paracentrotus lividus* dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle = Growth and nutrition of *Paracentrotus lividus* as a part of a sea farming project with artificial diets. Tese de doutoramento Universidade de Corse, Corte França.
- Fernández, C.; Pasqualini, V.; Boudouresque, F.; Johnson, M.; Ferrat, L.; Caltagirone, A.; Mouillot, D. 2006. Effect of an exceptional rainfall event on the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) stock and seagrass distribution in a Mediterranean coastal lagoon. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 68: 259-270.
- Field, P. 2005. Discovering statistics using SPSS. Second Edition, Sage, London, United Kingdom.
- Eddy, S.; Brown, N.; Harris, L. 2015. Capítulo 8. Aquaculture of the Green Sea Urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in North America em Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Ebert, T. 2013. Capítulo 7 Growth and Survival of Postsettlement Sea Urchins em Lawrence. J. Sea urchins: Biology and ecology, Tampa, Florida, USA.
- Gago, J.; Luís, O. 2011. Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock. Aquaculture International 19: 181–191.
- Garza-Gil, M.; Vázquez-Rodríguez, X.; Varela-Lafuente, M. 2016. Marine aquaculture and environment quality as perceived by Spanish consumers. The case of shellfish demand. Marine Policy 74: 1–5.
- Gianguzza, P.; Chiantore, M.; Bonaviri, C.; Cattaneo-Vietti, R.; Vielmini, I.; Riggio, S. 2006. The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). Fisheries Research 81: 37–44.
- Gilbert, F. 2003. Developmental Biology. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, EUA, 918 pp.
- Girard, D.; Clemente, S.; Toledo-Guedes, K.; Brito, A.; Hernández, J. 2012. A mass mortality of subtropical intertidal populations of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: analysis of potential links with environmental conditions. Marine Ecology 33: 377–385.

- Giudice, G.; 1ª edição; 1973. Developmental biology of the Sea Urchin Embryo. Academic press, New York and London 1-389.
- González-Irusta, M.; Goñi de Cerio, P.; Canteras, J. 2010. Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (northern Spain): environmental effects. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 90: 699-709
- Grosjean, P.; Spirlet, C.; Gosselin, P.; Vaitilingon, D.; Jangoux, M. 1998. Land-based, closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): A long-term experiment at a pilot scale. Journal of Shellfish Research 17: 1523-1531.
- Guidetti, P. 2004. Consumers of sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, in shallow Mediterranean rocky reefs. Helgoland Marine Research 58:110–116.
- Haya, D. 1990. Biología y ecología de *Paracentrotus lividus* en la zona intertidal. Tese de doutoramento Universidad de Oviedo, Espanha.
- Henriques, M. 1998. Manual de aquacultura. Instituto de ciências Biomédicas de Abel Salazar, Porto, Portugal.
- Hereu, B. 2005. Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. Marine Ecology 26: 54–62.
- Hereu, B.; Zabala, M.; Linares, C.; Sala, E. 2004. Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. Marine Biology. 144: 1011-1018.
- Hickman, P.; Keen, L.; Larson, A.; l'Anson, H.; Einsenhour, J.; Roberts, S. 2014. Integrated Principles of Zoology. 16ª edição; McGraw-Hill Higher Education, New York, U.S.A.
- Himmelman J (2008) Spawning synchrony and aggregative behaviour of cold-water echinoderms during multi-species mass spawnings. Marine Ecology Progress Series. 168: 361-161.
- Katow,H.; Okumura, S.; Sakai, Y.; Shibuya, C. 2015. Capítulo 13: Sea Cucumber Farming in Japan em Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Kelly, M.; Carboni, S.; Cook, E.; Hughes, A. 2015. Capítulo 9: Sea Urchin Aquaculture in Scotland em Brown, P.; Eddy, D.. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

- Kelly, M.; Hunter, A.; Schofield, C.; McKenzie, J. 2000. Morphology and survivorship of larval (Gmelin) (Echinodermata:Echinoidea) in response to varying food quantity and quality. *Aquaculture* 183: 223–240.
- Lera, S.; Macchia, S.; Pellegrini, D. 2006. Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environmental Monitoring and Assessment*: 122: 101–109.
- Lera, S.; Pellegrini, D. 2006. Evaluation of the fertilization capability of *Paracentrotus lividus* sea urchin storage gametes by the exposure to different aqueous matrices. *Environmental Monitoring and Assessment*: 119: 1–13.
- Levitan, R.; Sewell, A.; Chia, S. 1991. Kinetics of Fertilization in the Sea Urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: Interaction of Gamete Dilution, Age, and Contact Time. *Biological Bulletin*, 181: 371-378.
- Liu, H.; Chang, Y. 2015. Capítulo 6 Sea Urchin Aquaculture in China em Brown, P.; Eddy, D. *Echinoderm Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Liu, H.; Kelly, M.; Cook, E.; Black, K.; Orr, H.; Zhu, J.; Dong, S. 2007. The effects of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin larvae, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Aquaculture* 264: 247-262.
- Lozano, J.; Galera, J.; López, S.; Turon, X.; Palacín, C.; Morera, G. 1995. Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series* 122: 179–191.
- Luis, O.; Delgado, F.; Gago, J. 2005. Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquatic Living Resources* 18, 45–54.
- Martin, S.; Richier, S.; Pedrotti, M.; Dupont, S.; Castejon, C.; Gerakis, Y.; Kerros, M.; Oberhänsli, F.; Teyssié, J.; Jeffree, R.; Gattuso, J. 2011. Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *The Journal of Experimental Biology* 214: 1357-1368.
- Martinez-Pita, I.; Garcia, J.; Pita, L. 2010. The effect of seasonality on gonad fatty acids of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata:Echinoidea). *Journal of Shellfish Research*. 29(2), 517-525.
- Matusse, N.; Pita, A.; Pérez, M.; Trucco, I.; Peleteiro, J.; Presa, P. 2016. First-generation genetic drift and inbreeding risk in hatchery stocks of the wreckfish *Polyprion americanus*. *Aquaculture* 451: 125–136.

- Mcbride, S. 2005. Sea urchin aquaculture. American Fisheries Society Symposium. 46: 179–208.
- McCarron, E.; Burnell, G.; Kerry, J.; Mouzakitis, G. 2010. An experimental assessment on the effects of photoperiod treatments on the somatic and gonadal growth of the juvenile European purple sea urchin *Paracentrotus lividus*. Aquaculture research 41: 1072-1081.
- McEdward, R.; Miner, G. 2007. Echinoid larval ecology. In: Lawrence, J.M. (Ed.), Edible Sea Urchins: Biology and Ecology, Elsevier Science, San Diego, 71–93.
- Mestre, P. 2008. Elaboração de um projeto de uma unidade de piscicultura. Mestrado integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal pp. 1-115.
- Moulin, L.; Catarino, A.; Claessens, T.; Dubois, P. 2011. Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). Marine Pollution Bulletin 62: 48–54.
- Neto, G. 2011. Avaliação do desempenho de sacos suspensos na coluna de água para o cultivo de bivalves na Ria de Aveiro, com ênfase para a ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) e a amêijoia-boa (*Ruditapes decussatus*). Dissertação de Mestrado em Aquacultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Instituto Politécnico de Leiria, Portugal.
- Ouréns, R.; Fernández, L.; Freire, J. 2011. Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Marine Biology, 158: 793- 804.
- Ouréns, R.; Flores, L.; Fernández, L.; Freire, J. 2013. Habitat and density dependent growth of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in Galicia (NW Spain). Journal of Sea Research, 76, 50–60.
- Pais, A.; Chessa, A.; Serra, S.; Ruiu, A.; Meloni, G.; Donno, Y. 2007. The impact of commercial and recreational harvesting for *Paracentrotus lividus* on shallow rocky reef sea urchin communities in North-western Sardinia, Italy. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 73: 589-597.
- Pais, A.; Serra, S.; Meloni, G.; Saba, S.; Ceccherelli, G. 2012. Harvesting effects on *Paracentrotus lividus* population structure: a case study from northwestern Sardinia, Italy, before and after the fishing season. Journal of Coastal Research, 28: 570-575.
- Paredes, E.; Bellas, J.; Costas, D. 2015. Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing - Culture from cryopreserved embryos. Aquaculture 437: 366-369.

- Pearse, S.; Cameron, A. 1991. Echinodermata: Echinoidea. In: Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B. Reproduction of Marine Invertebrates. Echinoderms and Lophophorates, vol. VI. The Boxwood Press, Pacific Grove, 514–662.
- Pearse, S.; Pearse, B.; Davis, K. 1986. Photoperiod regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology*, 237: 107-118.
- Pedrotti, M.; Fenaux, L. 1993. Effects of food diet on the survival, development and growth rates of two cultured echinoplutei (*Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*). *Invertebrate Reproduction and Development* 24: 59-70.
- Pérez, F.; Boy, C.; Morriconi, E.; Calvo, J. 2010. Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Polar Biology*, 33: 271-280.
- Pinna, S.; Pais, A.; Meloni, P. 2012. Habitat preferences of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Ecology Progress Series* 445: 173–180.
- Prado, P.; Romero, J.; Alcoverro, T. 2009. Welcome mats? The role of seagrass meadow structure in controlling post-settlement survival in a keystone sea-urchin species. *Estuarine, Coastal Shelf Science* 85: 472–478.
- Privitera, D.; Noli, M.; Falugi, C.; Chiantore, M. 2011. Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407: 6-11.
- Rahman, S.; Tsuchiya, M.; Uehara, T. 2009. Effects of temperature on hatching rate, embryonic development and early larval survival of the edible sea urchin, *Tripneustes gratilla*. *Biologia* 64: 768—775.
- Raposo, A. 2017. Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e o efeito de três dietas no desenvolvimento das suas gónadas. Dissertação de Mestrado em Aquacultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Instituto Politécnico de Leiria, Portugal.
- Régis, B. 1979. Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoides (*Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*) du Golfe de Marseille. *Tethys* 9: 167–181.
- Rowe, S.; Hutchings, A.; Bekkevold, D.; Rakitin, A. 2004. Depensation, probability of fertilization, and the mating system of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Science* 61, 1144–1150.

- Saito, K. 1992. Japan's sea urchin enhancement experience. pp. 1-38. In: C. M. Dewees, (ed.). The Management and Enhancement of Sea Urchins and Other Kelp Bed Resources: A Pacific Rim Perspective. California Sea Grant College, University of California, La Jolla, California, USA.
- Sala, E.; Ballesteros, E.; Dendrinis, P. 2012. The structure of Mediterranean rocky reef ecosystems across environmental and human gradients, and conservation implications. Plos One 7: e32742.
- Sartori, D.; Pellegrini, D.; Macchia, S.; Gaion, A. 2016. Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. Aquaculture 451: 39–46.
- Sewell, M.; Young, C. 1999. Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 236: 291–305.
- Shpigel, M.; McBride, S.; Marciano, S.; Lupatsch, I. 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. Aquaculture 232: 343 – 355.
- Siikavuopio, J.; Mortensen, S. 2015. Capítulo 7 Sea Urchin Aquaculture in Norway em Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Siliani, S.; Melis, R.; Loi, B.; Guala, I.; Baroli, M.; Sanna, R.; Uzzau, S.; Roggio, T.; Addis, M.; Anedda, R. 2016. Influence of seasonal and environmental patterns on the lipid content and fatty acid profiles in gonads of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* from Sardinia. Marine Environmental Research 113: 124-133.
- Smith, A.; Kroh, A. 2013. Capítulo 1 Phylogeny of Sea Urchins em Lawrence. J. Sea urchins: Biology and ecology, Tampa, Florida, USA.
- Southward, A.; Southward, E. 1975. Endangered sea urchins. New Scientist :70–72.
- Spirlet, C.; Grosjean P.; Jangoux M. 1998. Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of maturity index. Invertebrate Reproduction Development 34: 69-81.
- Spirlet, C.; Grosjean, P.; Jangoux, M. 2000. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echodermata). Aquaculture 185: 85–99.

- Sun, J.; Chiang, F. 2015. Capítulo 2- Use and exploitation of sea urchins em Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Tomšić, S.; Conides, A.; Dupčić, I.; Glamuzina, B. 2010. Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). Acta Adriatica 51: 67 -77.
- Unuma, T.; Sakai, Y.; Agatsuma, Y.; Kayaba, T. 2015. Capítulo 5 Sea Urchin Aquaculture in Japan em Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm aquaculture, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
- Walker, W.; Harrington, M.; Lesser, P.; Fagerberg, R. 2005. Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. The Biological Bulletin 209: 31–48.
- Walker, C.; Lesser, M.; Unuma, T. 2013. Capítulo 3 Sea Urchin Gametogenesis – Structural, Functional and Molecular/ Genomic Biology em Lawrence. J. Sea urchins: Biology and ecology, Tampa, Florida, USA.
- Wangensteen, S.; Turon, X.; García-Cisneros, A.; Recasens, M.; Romero, J.; Palacín, C. 2011. A wolf in sheep's clothing: carnivory in dominant sea urchins in the Mediterranean. Marine Ecology Progress Series 441, 117–128.
- Williamson, J. 2015. Capítulo 10 Sea Urchin Aquaculture in Australia em Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Worm, B.; Hilborn, R.; Baum, J.; Branch, T.; Collie, J.; Costello, C.; Fogarty, M.; Fulton, E.; Hutchings, J.; Jennings, S.; Jensen, O.; Lotze, H.; Mace, P.; McClanahan, T.; Minto, C.; Palumbi, S.; Parma, A.; Ricard, D.; Rosenberg, A.; Watson, R.; Zeller, D. 2009. Rebuilding Global Fisheries. Science 325: 578-632.
- Zar, H. (2010). Biostatistical analysis. 5ª edição. Practice Hall, New Jersey, 226-244.
- Ziegler, A.; Schröder, L.; Ogurreck, M.; Faber, C.; Stach, T. 2012. Evolution of a novel muscle design in sea urchins (Echinodermata: Echinoidea). Plos one 7: e37520.