



IPL

escola superior de turismo
e tecnologia do mar
instituto politécnico de leiria

Estágio Curricular na empresa Riasearch, Lda.

Mariana Ribeiro Cristino Roque Martins

2019

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Estágio Curricular na empresa Riasearch, Lda.

Mariana Ribeiro Cristino Roque Martins

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação da Professora Especialista
Teresa Maria Coelho Baptista e da Licenciada (Pré-Bolonha) Renata
Serradeiro

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Título: Estágio curricular na empresa Riasearch,Lda.

Copyright © Mariana Ribeiro Cristino Roque Martins

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2019

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 este relatório de estágio 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.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Agradecimentos

Agradeço, a toda a equipa da empresa Riasearch, nomeadamente à Adriana, Bruna e André por todo o apoio prestado, pelos conhecimentos partilhados e boa disposição. Um agradecimento especial, à Dra. Renata Serradeiro, por me ter dado a oportunidade de estagiar na Riasearch, por todos os conselhos e conhecimentos que me transmitiu ao longo do meu percurso na empresa.

Agradeço, à minha orientadora, Professora Dra. Teresa Baptista, pela oportunidade que me proporcionou, por todos os ensinamentos e por todo o apoio dado durante o estágio.

Agradeço, à Professora Dra. Susana Mendes e à Professora Dra. Marta Neves, por toda a ajuda prestada na análise estatística, um muito obrigada.

Agradeço, à Beatriz Trindade e ao André Horta, por toda a ajuda e tempo dispensado na realização das análises histológicas e bioquímicas.

Agradeço, a todos os meus amigos, pela amizade e por todo o carinho que me dão, são sem dúvida uma parte indispensável da minha vida, muito obrigada.

Agradeço, ao meu namorado, por todo o companheirismo, partilha e paciência nesta etapa da minha vida.

Agradeço, ainda, à minha família, nomeadamente ao meu pai, por me possibilitar a realização desta etapa da minha vida (assim como todas as outras), por me apoiar, incentivar a atingir os meus objetivos e por acreditar sempre em mim. Um muito obrigada, aos meus irmãos, avó, tia e primos por me apoiarem incondicionalmente e por me ensinarem o significado da palavra união, são todos muito importantes para mim.

E, por último, um agradecimento saudosos, à pessoa mais especial, à minha querida mãe de quem eu amo muito, saudades eternas.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Resumo

A aquacultura tem vindo a adquirir uma crescente importância mundial, de modo a compensar a progressiva redução das populações naturais de diversas espécies, bem como a necessidade de produção de recursos que satisfaçam as necessidades alimentares da população humana, consequência do aumento exponencial da mesma.

A empresa Riasearch, pioneira em Portugal, dedica-se fundamentalmente à investigação aplicada e desenvolvimento experimental na área da aquacultura, através da realização de ensaios nutricionais, fornecendo um serviço inovador para o setor da aquacultura. Tem como principal objetivo a validação de dietas destinadas a diferentes organismos aquáticos, através da realização de ensaios de digestibilidade e crescimento destes mesmos organismos.

O estágio curricular na empresa teve como principal objetivo o contacto com a realidade empresarial na área da aquacultura, integrando as mais diversas rotinas da instalação.

A Riasearch pretende implementar um sistema de aquacultura multitrófica integrada (IMTA), associando o seu sistema de recirculação de água (RAS) a um sistema inovador de cultivo de holotúrias, tendo optado por escolher uma espécie, *Holothuria forskali*, com potencial para desempenhar um papel importante na economia da própria empresa e das empresas aquícolas nacionais.

Ainda pouco se sabe sobre quais as dietas artificiais capazes de induzir um rápido crescimento, suprir as exigências nutricionais e obter um crescimento proporcionado e saudável das holotúrias, garantindo resultados na produção de pepinos-do-mar comercialmente importantes.

O presente estudo teve como principal objetivo verificar se os produtos derivados de um efluente proveniente de camarões da espécie, *Litopenaeus vannamei*, constituído essencialmente por fezes e alimento não consumido (Tratamento 1), é uma dieta viável para a espécie *Holothuria forskali*, capaz de substituir uma dieta à base de uma conjugação de três microalgas *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis sp.* e *Phaeodactylum triconutum* (Tratamento 2), em termos de crescimento, sobrevivência e valor nutricional.

Os resultados sugerem que a inclusão alimentar deste efluente, proporciona o crescimento das holotúrias, com valores para a taxa de crescimento específico (SGR) de $0,37 \pm 0,26\%/dia$ e $0,62 \pm 0,05\%/dia$ para as microalgas. Foram obtidas taxas de sobrevivência de 52% em ambos os tratamentos, em aproximadamente 6 semanas.

No que diz respeito ao valor nutricional, esta dieta ainda é deficitária, comparativamente ao perfil de ácidos gordos das holotúrias selvagens, que apresentam valores mais elevados destes mesmos ácidos gordos, mais importantes para a nutrição e saúde humana.

Palavras-chave: *Holothuria forskali*; IMTA; Fezes; Crescimento; Composição nutricional; Ácidos gordos.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Abstract

Aquaculture has grown in global importance, to offset the gradual reduction in natural populations of several species and produce resources capable of feeding exponentially increasing human populations.

Riaserch, a pioneer company in Portugal, operates mainly in aquaculture applied research and experimental development, carrying out nutritional trials and supplying an innovative service to the sector. It sets out to validate diets for different aquatic organisms, through digestibility and growth trials.

The main goal of the curricular internship in the company was the contact with the business reality in the aquaculture area, integrating the most diverse routines of the installation.

Riasearch aims to implement an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) system, coupling its recirculating aquaculture system (RAS) with an innovative holothurian rearing system. It chose a species, *Holothuria forskali*, potentially able to play an important economic role for itself and other national aquaculture companies.

Little is still known about artificial diets capable of (i) inducing rapid growth; (ii) meeting nutritional requirements; (iii) resulting in proportionate and healthy rearing of holothuria; and (iv) ensuring commercially relevant results in the production of sea cucumbers.

The present study purports to check whether the products derived from an effluent from *Litopenaeus vannamei* shrimp, mainly composed of feces and uneaten foodstuffs (Treatment 1), is a viable diet for *Holothuria forskali*, capable of replacing a diet based on three microalgae *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis sp.* and *Phaeodactylum triconutum* (Treatment 2) for growth, survival and nutritional value.

Results suggest that including this effluent in their diet supports holothurian growth, with specific growth rate (SGR) values of $0,37 \pm 0,26\%/day$ and $0,62 \pm 0,05\%/day$ for microalgae. The survival rates of *Holothuria forskali* in both treatments were 52% in approximately 6 weeks.

Regarding nutritional value this diet falls short of the fatty acids profile of wild holothuria, which have higher values of said fatty acids more relevant for human nutrition and health.

Keywords: *Holothuria forskali*; IMTA; Feces; Growth; Nutritional composition; Fatty acids.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice

I.	Introdução.....	1
1.	Aquacultura no mundo	1
2.	Aquacultura em Portugal.....	3
3.	Aquacultura multitrófica integrada (IMTA)	4
4.	Crustáceos- Camarões	5
4.1	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931).....	5
4.2	Vantagens do cultivo da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	7
4.3	O valor da nutrição e alimentação nos camarões.....	8
4.4	Digestibilidade das rações e ensaios de crescimento	10
5.	Pepinos-do-mar.....	11
5.1	Sobre-exploração e aquacultura de pepinos-do-mar.....	11
5.2	<i>Holothuria forskali</i> (Delle Chiaje, 1823)	13
II.	Relatório de estágio na empresa Riasearch	17
1.	A empresa.....	17
2.	Objetivos	18
3.	Instalações.....	18
4.	Circuito hidráulico e equipamentos.....	20
4.1	Tratamento de água.....	20
4.2	Filtração da água no sistema	22
5.	Rotinas.....	23
6.	Transporte e aclimação das pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	26
7.	Cultivos auxiliares	29
III.	Ensaio experimental com a espécie <i>Holothuria forskali</i>	31
1.	Introdução	31
2.	Objetivos	33
IV.	Ensaio 1- Influência e tolerância à salinidade da água do furo da empresa da espécie <i>Holothuria forskali</i>	34
3.	Materiais e métodos.....	34

3.1	Captura, transporte e manutenção	34
4.	Resultados	35
4.1	Influência e tolerância à salinidade.....	35
5.	Discussão de resultados	37
5.1	Tolerância e influência da espécie <i>Holothuria forskali</i> à salinidade	37
V.	Ensaio 2- Avaliar a influência de duas dietas na taxa de crescimento e sobrevivência da espécie <i>Holothuria forskali</i>	38
6.	Materiais e métodos	38
6.1	Captura, transporte e manutenção	38
6.2	Constituição das dietas	40
6.3	Desenho experimental	41
6.4	Taxa de crescimento específico (SGR), Taxa de sobrevivência (SR), Ganho de peso médio (WG), Taxa de crescimento e Ganho de peso relativo (RWG).....	43
6.5	Caracterização bioquímica	44
6.5.1	Quantificação da gordura total.....	44
6.5.2	Caracterização do perfil lípidos.....	45
6.6	Caracterização histológica	46
6.6.1	Amostragem biológica e determinação do Índice Gonadosomático.....	46
6.6.2	Análise histológica.....	46
7.	Análise estatística	47
8.	Resultados	47
8.1	Crescimento, taxa de crescimento específico e sobrevivência	47
8.2	Teor de gordura e perfil lipídico	52
8.3	Determinação do Índice Gonadosomático	55
9.	Discussão de resultados	58
9.1	Crescimento, taxa de crescimento específico e sobrevivência	58
9.2	Teor de gordura total e caracterização do perfil de ácidos gordos.....	63

9.3	Análise histológica e avaliação do estado de maturação das gónadas dos indivíduos da espécie <i>Holothuria forskali</i>	68
10.	Considerações finais	71
VI.	Referências bibliográficas	73
VII.	Anexos	81

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Produção total de pescado para consumo (aquacultura e capturas) (Adaptado: FAO, 2018).....	2
Figura 2- Utilização e provisão de pescado a nível Mundial (Adaptado: FAO, 2018).	2
Figura 3- Produção de Aquacultura Nacional (Fonte: DGRM, 2017).	4
Figura 4- Ciclo de vida do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> (Adaptado: Treece, 2000).	6
Figura 5- Localização da empresa Riasearch (Adaptado: Google maps).	17
Figura 6- Biotério da empresa, tanques retangulares (à direita) e tanques circulares (à esquerda) (Fonte: www.riasearch.pt).	19
Figura 7- Ensaios experimentais realizados nos 12 tanques retangulares (50 L) (Fonte: www.riasearch.pt).	20
Figura 8- Esquema do circuito hidráulico da empresa (Fonte: Adaptado www.riasearch.pt).	22
Figura 9- Limpeza dos permutadores (Fonte: Própria).	26
Figura 10- Processo de embalamento de pós-larvas de camarões para o transporte (Fonte: Adaptado, Riasearch).	27
Figura 11- Desenho experimental do ensaio de crescimento (Fonte: Própria).	42
Figura 12- Desenho experimental para o ensaio de crescimento. Número 1- Refere-se ao depósito 1; Número 2- Refere-se ao tanque de cabeça (Fonte: Própria).	43
Figura 13- Exemplares de <i>Holothuria forskali</i> dissecados após o final do ensaio experimental (Fonte: Própria).	44
Figura 14- Coloração dos cortes histológicos (Fonte: Própria).	47
Figura 15- Representação gráfica da ocorrência de mortalidade, em cada tanque experimental ao longo do ensaio.	48
Figura 16- Mortalidade diária ao longo do ensaio, em cada tanque experimental.	49
Figura 17- Comparação das taxas de crescimento específico (SGR) entre os tratamentos. Os valores são expressos na forma (média±DP).....	50
Figura 18- Comparação dos pesos húmidos finais (a) e iniciais (b) médios entre os tratamentos. Os valores são expressos na forma (média±DP).....	52
Figura 19- Observação do estágio de oogénese nas fêmeas de <i>Holothuria forskali</i> . Foto A e A1- Ovário com oócitos em crescimento.....	56
Figura 20- Observação dos estádios de espermatogénese nos machos de <i>Holothuria forskali</i> . Foto B- Estádio em crescimento; C- Estádio maturo.....	57

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Peso húmido inicial e peso médio total (g) das holotúrias (média±DP). 36	36
Tabela 2- Resumo de mortalidades e eviscerações ao longo do ensaio. 37	37
Tabela 3- Parâmetros de qualidade da água ao longo de todo o ensaio (média±DP)..... 40	40
Tabela 4- Composição geral da dieta A, constituída por uma conjugação de três microalgas (Fonte: Necton, S.A.). 40	40
Tabela 5- Composição da ração WINFLAT (Fonte: SPAROS)..... 41	41
Tabela 6- Pesos húmidos iniciais e finais e biomassa da espécie <i>H.forskali</i> nos dois tratamentos experimentais. 48	48
Tabela 7- Taxa de crescimento específico (SGR) e taxa de sobrevivência (SR) nos dois tratamentos experimentais para o ensaio de crescimento de <i>H. forskali</i> (1). 49	49
Tabela 8- Ganho de peso médio (WG), taxa de crescimento (GR) e ganho de peso relativo (RWG) dos exemplares relativamente ao ensaio de crescimento com a espécie <i>H. forskali</i> 51	51
Tabela 9- Teor de gordura total (%) presente no músculo das holotúrias nos tratamentos experimentais, com os respetivos valores de média ± DP. 52	52
Tabela 10- Teor de ácidos gordos no músculo (%) das holotúrias nos dois tratamentos e nos selvagens, com os respetivos valores de média ± DP. 53	53
Tabela 11- Composição de ácidos gordos no músculo (%) das holotúrias nos dois tratamentos e nos selvagens, com os respetivos valores de média±DP. 54	54
Tabela 12- Índice Gonadossomático (GI) calculado para os exemplares submetidos ao ensaio experimental de crescimento para o Tratamento 1 e para o Tratamento 2. 56	56

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de Abreviaturas

- ALA** – *Alpha-linolenic acid* (Ácido alfa-linolénico)
- ARA** – *Arachidonic acid* (Ácido araquidónico)
- CV**- *Coefficient of variation* (Coeficiente de variação)
- DHA** – *Docosahexaenoic acid* (Ácido docosahexanóico)
- EPA** – *Eicosapentaenoic acid* (Ácido eicosapentaenóico)
- FAO** - *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)
- FCR**- *Feed Conversion Ratio* (Rácio de conversão alimentar)
- F+ANC**- *Feces and uneaten foodstuffs* (Fezes + alimento não consumido)
- GC** – (*Gas chromatography*) Cromatografia gasosa
- GI** - *Gonadosomatic index* (Índice Gonadossomático)
- GR**- *Growth Rate* (Taxa de crescimento)
- IMTA** - *Integrated Multi-Trophic Aquaculture* (Aquacultura multitrófica integrada)
- INE/DGRM** – Instituto Nacional de Estatística/Direção Geral dos Recursos Marinhos
- LA** – *Linoleic acid* (Ácido linoleico)
- M**- *Microalgae* (Microalgas)
- MUFA** - *Monounsaturated Fatty Acids* (Ácidos gordos monoinsaturados)
- O₃**– *Ozone* (Ozono)
- PUFA** - *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos gordos polinsaturados)
- RAS** – *Recirculating aquaculture system* (Sistema de recirculação de água)
- RWG** – *Relative weight gain* (Ganho de peso relativo)
- SFA** - *Saturated Fatty Acids* (Ácidos gordos saturados)
- SGR** - *Specific growth rate* (Taxa de crescimento específico)
- SPF** - *Specific Pathogen Free* (Animais livres de agentes patogénicos)
- SPR**- *Specific pathogen resistant* (Animais resistentes a agentes patogénicos específicos)
- SR**- *Survival rate* (Taxa de sobrevivência)
- TCM**- Tecido conjuntivo mutável
- UV** – *Ultraviolet* (Ultravioleta)
- WG**- *Mean weight gain* (Ganho de peso médio)
- WHO**- *World Health Organization* (Organização mundial de saúde)
- ω3** – *Omega-3 fatty acids* (Ómega-3)
- ω6** – *Omega-6 fatty acids* (Ómega-6)

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

I. Introdução

1. Aquacultura no mundo

A aquacultura tem vindo a adquirir uma crescente importância mundial, de modo a compensar a progressiva redução das populações naturais de diversas espécies, bem como a necessidade de produção de recursos que satisfaçam as necessidades alimentares, consequência do aumento exponencial da população humana.

No início do século XXI, a sociedade enfrenta o enorme desafio de fornecer alimentos e meios de subsistência, a uma população que excede os 9 biliões de pessoas, ao mesmo tempo que está cada vez mais exposta a enfermidades, derivadas de alterações climáticas, deterioração ambiental, escassez de recursos, entre outros (FAO, 2018).

Deste modo, a aquacultura, é um dos setores que representa um crescimento considerável nos últimos anos, suprimindo a disponibilidade limitada dos stocks pesqueiros que se encontram sobre explorados. Este setor representa ainda, um complemento, para colmatar parte da dependência externa da balança comercial, referente aos produtos da pesca, ajudando a estabilizar o preço de determinadas espécies e, acrescentando ainda valor nutricional aos produtos, através do fornecimento de proteína de qualidade, em quantidades consideráveis e a preços acessíveis (DGRM, 2013).

Em 2016, a produção mundial de pescado atingiu cerca de 171 milhões de toneladas, sendo 47% do total deste valor proveniente da aquacultura, correspondendo a 53% quando excluídos os seus subprodutos (incluindo farinha de peixe e óleo de peixe). Estima-se um valor total de produção de pescado (aquacultura e capturas) de 316,19 biliões de euros, dos quais 203,11 biliões de euros são provenientes da produção em aquacultura (FAO, 2018).

Com a captura de pescado, relativamente estática, desde o final da década de 80, a aquacultura tem sido responsável pelo incrível crescimento no fornecimento de pescado para consumo humano (Figura 1) (FAO, 2018).

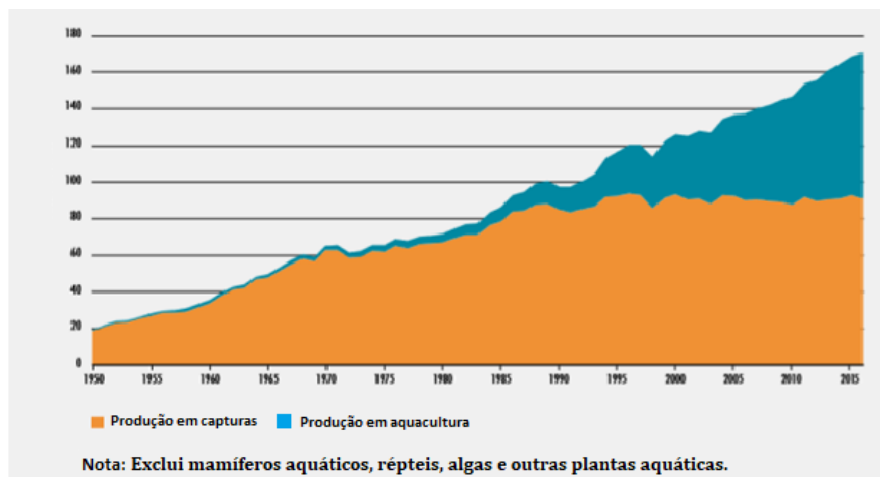


Figura 1- Produção total de pescado para consumo (aquacultura e capturas) (Adaptado: FAO, 2018).

Como é possível observar na Figura 2, o crescimento da oferta mundial de pescado para consumo humano, tem vindo a sobrepor-se ao crescimento populacional. Entre 1961 e 2016, o aumento médio anual do consumo mundial de peixe (3,2%) superou o crescimento da população (1,6%) e, até mesmo, o consumo de carne (2,8%). Em termos *per capita*, o consumo de pescado aumentou de 9,0 kg em 1961 para 20,2 kg em 2015, a uma taxa média de 1,5% ao ano (FAO, 2018).

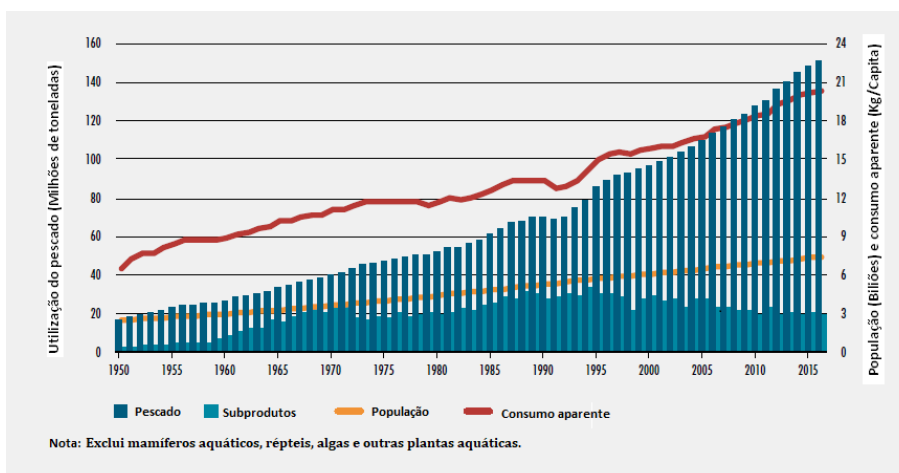


Figura 2- Utilização e provisão de pescado a nível Mundial (Adaptado: FAO, 2018).

As estimativas preliminares para o ano 2016 e 2017 apontam para um crescimento adicional de cerca de 20,3 e 20,5 kg, respetivamente. A expansão do consumo foi impulsionada, não apenas pelo aumento da produção, mas também por outros fatores, incluindo a redução do desperdício e a sua gestão adequada (FAO, 2018). O comércio internacional desempenhou também um papel importante no fornecimento de vastas

opções aos consumidores (FAO, 2016). A China, de longe o maior produtor mundial, desempenha um papel importante no crescimento deste setor, mantendo o total de capturas marinhas estáveis em 2016. Os outros grandes produtores em 2016 foram a Índia, Indonésia, o Vietname, o Bangladesh, o Egito e a Noruega (FAO, 2018).

Em 2016, o pescado proveniente da aquacultura a nível global totalizou 17,1 milhões de toneladas de moluscos (25,65 bilhões de euros), 7,9 milhões de toneladas de crustáceos (25,56 bilhões de euros) e 938 500 toneladas de outros animais aquáticos (5,95 bilhões de euros) - tartarugas, pepinos-do-mar, ouriços-do-mar, sapos e medusas comestíveis.(FAO, 2018).

Cerca de 600 espécies diferentes (Troell *et al.*, 2014) são produzidas em aquacultura, sendo os peixes, o grupo mais produzido, seguindo-se os moluscos bivalves e, por último os crustáceos, excluindo as plantas aquáticas (FAO, 2018).

Em 2016, a aquacultura praticada em águas interiores foi fonte de 51,4 milhões de toneladas de peixes alimentícios, constituindo 64,2% da produção mundial de peixes de aquacultura, comparativamente aos 57,9% no ano 2000. A produção de peixes continua a dominar a aquacultura interior, representando cerca de 92,5% (47,5 milhões de toneladas) da produção total desta prática. No entanto, em 2000 esta proporção teve uma queda acentuada de 97,2%, refletindo-se numa crescente produção de outros grupos de espécies, particularmente crustáceos em águas interiores da Ásia, incluindo camarões, lagostins e caranguejos. No interior, a produção em aquacultura inclui cada vez mais algumas espécies de camarões marinhos, nomeadamente a espécie *Litopenaeus vannamei*, camarão-branco-do-Pacífico, que tem como particularidade a adaptabilidade a águas doces e/ou águas salinas alcalinas, depois de serem aclimatados (FAO, 2018).

2. Aquacultura em Portugal

Em Portugal, a aquacultura representa um importante setor estratégico por parte do governo português, sendo uma importante alternativa às tradicionais formas de abastecimento de pescado. Consequentemente, a aquacultura portuguesa encontra-se bem posicionada para tirar partido de um mercado nacional grande consumidor de peixe, dado o elevado consumo de peixe *per capita* existente, condições geográficas e climatéricas, como também de um mercado comunitário altamente deficitário em produtos de pesca (DGRM, 2017).

Em 2016, a produção aquícola nacional atingiu as 11 259 toneladas, o que se traduziu numa receita de 75,2 milhões de euros, revelando um aumento no valor obtido

de 17,8% e um acréscimo na quantidade de 38,9%, relativamente ao ano anterior (Figura 3) (DGRM, 2017).

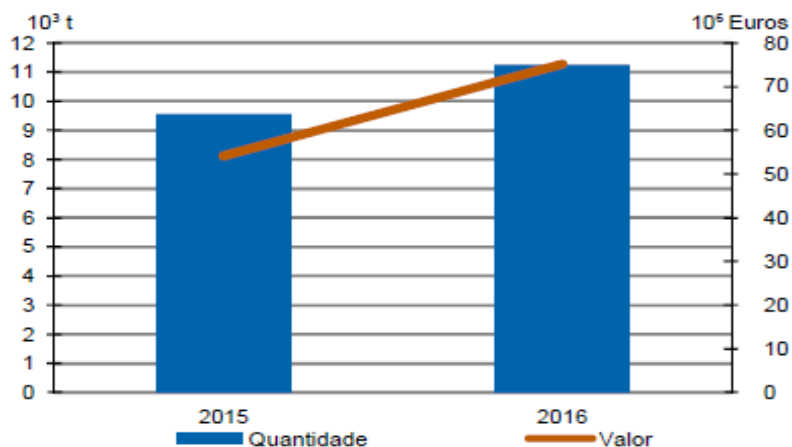


Figura 3- Produção de Aquacultura Nacional (Fonte: DGRM, 2017).

Este facto mais recente é justificado por um maior volume de produção de peixes marinhos (+8,7%) em relação ao ano de 2015, devendo-se a um incremento da produção das principais espécies produzidas, a dourada e o pregado. Com efeito, comparativamente ao ano anterior, o pregado (*Psetta maxima*) (2 388 toneladas), a dourada (*Sparus aurata*) (1 196 toneladas) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (427 toneladas) aumentaram 3,8%, 8,8% e 43,7%, respetivamente (DGRM, 2017).

A produção em águas salobras e marinhas continuou a ser a mais relevante, representando cerca de 94% da produção total em 2016. Sendo que, a produção de peixe nestas águas representou 37,6% da produção, do qual 84,7% foram representados pela dourada e pelo pregado (FAO, 2018).

Em 2016, a produção de moluscos e crustáceos atingiu os 56,4% da produção total, sofrendo um aumento significativo de 32,9% de 2015 para 2016, entre as espécies mais produzidas, mantêm-se as amêijoas como a espécie mais relevante (3 716 toneladas), seguindo-se os mexilhões (1 474 toneladas), que registaram aumentos de produção de 61,6% e 12,1%, respetivamente. Contudo, a produção de ostras não ultrapassou as 1014 toneladas, tendo diminuído cerca de 2% em 2016 (DGRM, 2017).

3. Aquacultura multitrófica integrada (IMTA)

O rápido desenvolvimento da produção aquícola, mais especificamente da aquacultura intensiva, está intrinsecamente associado a impactos ambientais negativos e

requer práticas sustentáveis (Chopin *et al.*, 2006; Troell *et al.*, 2003). Apenas 25% dos nutrientes que entram nos sistemas intensivos são absorvidos pelas espécies alimentadas, tornando-se de fulcral importância o manejo de resíduos em aquaculturas que utilizam dietas artificiais ao longo do processo produtivo (Buschmann *et al.*, 2008).

A aquacultura multitrófica integrada (IMTA) surge assim como uma forma de minimizar estes impactos associados a estas práticas. Como o próprio nome indica, o termo multi-trófico refere-se à incorporação de espécies de diferentes níveis tróficos ou níveis nutricionais no mesmo sistema. É uma prática através do qual, os resíduos obtidos através do processo de produção de uma determinada espécie são reciclados e convertidos em recursos para outras espécies (Barrington *et al.*, 2009). Desta forma, é possível eliminar desperdícios, aumentar a produtividade de uma exploração aquícola e criar um sistema que não é apenas ambientalmente sustentável, como também o mais autossustentável possível, através da recriação do que acontece no meio natural (Hunghe e Black, 2016).

Como exemplo, num sistema IMTA, os bivalves filtram as partículas em suspensão, incluindo os produtos metabólicos dos peixes e, por sua vez, as algas absorvem nutrientes provenientes do metabolismo dos produtos gerados pelos bivalves e peixes, fornecendo-lhes oxigénio dissolvido (Ning *et al.*, 2016). De um modo geral, estes sistemas inovadores combinam o cultivo de animais que necessitam que lhes seja fornecido alimento com organismos que utilizam matéria orgânica e inorgânica, produzindo sistemas ambientalmente sustentáveis. Os detritos resultantes podem ainda ser utilizados por detritívoros, como a tainha e pepinos-do-mar (Shpigel, 2013). Contudo, Pereira e Correia (2015) afirmam não existir ainda nenhum sistema artificial completamente autossuficiente e autossustentado.

4. Crustáceos- Camarões

4.1 *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

O camarão-branco-do-Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), como o próprio nome indica, é nativo da costa leste do Oceano Pacífico, entre o México até ao norte do Peru, até Tumbes. Pertence à família *Penaeidae* dentro da ordem *Decapoda*, subordem *Dentrobranchiata* e género *Litopenaeus* (Brock e Main, 1994). É uma das cinco principais espécies de camarão produzidas, tendo como principais países produtores, a China, Tailândia, Indonésia e Brasil. Encontra-se em habitats marinhos tropicais, em águas com temperaturas normalmente superiores a 20°C, durante todo o ano (FAO, 2018).

O ciclo de vida dos camarões peneídeos inicia-se através da migração dos indivíduos adultos para o mar aberto à procura de água com características oceânicas estáveis, como a salinidade e temperatura, onde vivem e se reproduzem. Por sua vez, os náuplios eclodem e à medida que passam para os estádios larvares seguintes, deslocam-se em direção aos estuários, lagoas costeiras e manguezais, que funcionam como maternidades naturais ricas em alimento, onde crescem e se transformam, até chegarem a juvenis, altura em que iniciam a migração para o mar aberto, onde passam para um novo ciclo, como se pode observar na Figura 4 (Treece, 2000).

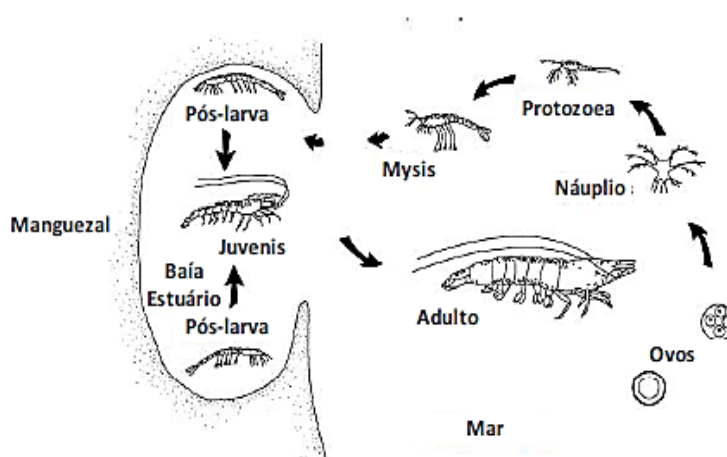


Figura 4- Ciclo de vida do camarão *Litopenaeus vannamei* (Adaptado: Treece, 2000).

A maturação inicia-se quando atingem um peso médio de 20g nos machos e 28g nas fêmeas, o que equivale a uma idade entre os 6 a 7 meses. Quando as fêmeas atingem um peso entre os 30 a 45g, libertam entre 100.000 a 250.000 ovos de aproximadamente 0,22 mm de diâmetro. A incubação ocorre aproximadamente 16 horas após a desova e fertilização (FAO, 2018).

As larvas passam por um desenvolvimento complexo, até se tornarem num adulto. Passando por três estádios larvares distintos com numerosas subfases e mudas. No primeiro estádio como vimos anteriormente, a larva, chamada náuplio, nada intermitentemente e alimenta-se exclusivamente do seu saco vitelino. Passado um dia e meio, os náuplios, atingem um comprimento de metade de um milímetro e transformam-se num *protozoa*, nesta fase já começam à procura de alimento. Quando atingem um tamanho de 2 milímetros, entram no estádio *mysis* e por fim, num estádio larvar mais avançado, transformam-se numa pós-larva precoce, respetivamente. Nesta fase, as larvas continuam a ser planctónicas durante algum tempo, alimentando-se de fitoplâncton e zooplâncton, sendo transportadas para a costa por correntes de maré (Alves *et al.*, 2011). Passado 5 dias, após a sua metamorfose para pós-larvas (PL), as larvas

começam a formar os seus órgãos sexuais, diferenciando-se as gónadas e transformam-se em juvenis. Mudam também os seus hábitos planctónicos e iniciam a sua migração para o mar aberto para um novo ciclo.

Relativamente à estratégia nutritiva, o camarão-branco-do-Pacífico, é uma espécie bentónica, carnívora ou omnívora. Numa fase juvenil, encontram-se quantidades consideráveis de lama e detritos bentónicos no seu estômago. No entanto, à medida que vão aumentando de tamanho, começam a fazer uma dieta rica em pequenos animais aquáticos, nomeadamente, vermes, bivalves e crustáceos (Alves *et al.*, 2011).

No início e final da muda, os camarões peneídeos, suspendem a ingestão parcial ou completa de alimento (Studer, 2018).

O sistema digestivo dos crustáceos apresenta as funções de ingestão, transporte dos nutrientes, mecânica da ingestão, hidrólise, absorção e armazenagem dos nutrientes e transporte das fezes. A sua estrutura interna compreende a boca, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Alves *et al.*, 2011).

Atualmente, ainda está por determinar em que medida as antenas têm influência nesta espécie. No entanto, de um modo geral, as antenas são o órgão sensorial mais importante para os camarões, distinguindo, através destas, o ambiente em que se inserem, os animais da mesma espécie e o sexo oposto, usando-as ainda para comunicar (Nascimento, 2013).

4.2 Vantagens do cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei*

A cultura de *Litopenaeus vannamei* tem atraído cada vez mais produtores, devido a uma série de vantagens competitivas inerentes à espécie, tais como: uma elevada taxa de crescimento, um requerimento proteico relativamente baixo, uma elevada tolerância a altas densidades populacionais, possibilidade de reprodução e/ou domesticação com menos probabilidades de contração de doenças contrariamente a outras espécies, como por exemplo, *Penaeus monodon* e, ainda, uma extrema capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo locais, nomeadamente a parâmetros como, a salinidade e a temperatura da água (Bondad-Reantaso *et al.*, 2012).

No seu habitat natural, ao longo do seu ciclo de vida, esta espécie é obrigada a passar por uma série de flutuações diárias e sazonais, diretamente relacionadas com a salinidade e temperatura da água, o que lhe confere uma enorme capacidade adaptativa. Por estas razões, a salinidade e a temperatura, são apontadas como os principais parâmetros abióticos que influenciam a vida destes organismos aquáticos.

Os camarões peneídeos, ao longo do seu processo evolutivo, adquiriram uma elevada capacidade de se adaptar a uma ampla gama de flutuações de salinidade, resultado da sua capacidade de osmorregulação, conseguindo deste modo, manter a sua pressão osmótica independentemente do meio externo onde estão inseridos, dentro de uma determinada gama de variação (Lima, 2013). Estes são constituídos por espécies estenohalinas, ou seja, que não toleram grandes variações de salinidade, e analogamente, espécies eurihalinas, que suportam grandes variações de salinidade. Dentro das espécies eurihalinas podemos mencionar os camarões, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus schmitti* e o *Litopenaeus vannamei*. A espécie, *L. vannamei*, como adquire uma enorme capacidade de osmorregulação, como vimos anteriormente, pode habitar desde águas com salinidades superiores a 40‰, até águas com salinidades muito próximas de 0‰ (Valença, 2018).

Além dos factos mencionados, a temperatura da água também é um dos fatores limitantes, na realização das atividades metabólicas, crescimento e reprodução dos camarões peneídeos. Estes organismos são animais pecilotérmicos, ou seja, a temperatura corporal varia em função da temperatura do meio envolvente. Deste modo, quando ocorre uma redução da temperatura corporal, o processo metabólico diminui, havendo uma redução da quantidade energética que estes organismos deveriam usar para a realização de outras atividades. Por outro lado, quando ocorre um aumento da temperatura corporal, há conseqüentemente um aumento no metabolismo, conduzindo a uma maior procura de energia (Lima, 2013).

A temperatura influencia também as taxas de crescimento destes animais, através do seu impacto na atividade molecular, além de influenciar os períodos de tempo que os peneídeos permanecem em cada estágio larvar (Silveira *et al.*, 2011).

4.3 O valor da nutrição e alimentação nos camarões

Com o crescimento da aquacultura, surgiu a necessidade de um aumento na produção de ingredientes utilizados na elaboração de dietas adaptadas ao setor produtivo, nomeadamente, os de origem animal, como a farinha de peixe, de carne e ossos, vísceras, sangue e também os de origem vegetal, como o farelo de soja, trigo, milho e os seus subprodutos, entre outros (Oliveira, 2018).

A farinha de peixe é a principal fonte de proteínas de origem animal utilizada para atender à procura por dietas comerciais de camarões, capazes de suprir as necessidades nutricionais. Em 2010, a aquacultura utilizou 73% da farinha de peixe mundial (FAO, 2014). Em 2015, em termos de uso total, os maiores consumidores de farinha de peixe

foram os camarões marinhos, seguindo-se os peixes marinhos, salmão e os crustáceos de água doce (FAO, 2018). Consequentemente, tendo em consideração estes aspetos, a pressão no uso de farinha de peixe na constituição das rações tem aumentado, devido ao rápido crescimento da aquacultura e da procura de nutrientes essenciais (Hulefeld *et al.*, 2018).

No cultivo de camarões, a alimentação pode representar mais de metade do custo de produção, nas rações formuladas para estes organismos, a farinha de peixe corresponde desde 25% a 50% do total da formulação destas dietas. A proteína é o nutriente com mais custos associados, na fabricação de rações e, assim, considerado um dos maiores impedimentos na expansão do setor (Kureshy e Davis, 2002).

Porém, nos últimos anos, a farinha de peixe teve uma queda acentuada na sua produção, estando esta, diretamente relacionada com a baixa captura de espécies de peixes utilizados na sua elaboração, bem como com questões ecológicas (sobrepesca, eventos-*El Niño*), económicas (preço) e de mercado (disponibilidade) (Oliveira, 2018).

Tendo em conta estes aspetos, a procura por ingredientes alternativos que possuam equitativamente um equilíbrio nutricional desejável e que sejam mais respeitadores do ambiente, tem aumentado consideravelmente.

A utilização de fontes alternativas de proteína, nomeadamente subprodutos de plantas e animais é aparentemente uma solução para combater este problema (Saiote, 2013). O desenvolvimento de dietas à base de ingredientes vegetais, conjugadas com suplementos alimentares, como os prebióticos e os aminoácidos essenciais, no sentido de melhorar a utilização destas dietas alternativas, parece ser uma importante alternativa ao desenvolvimento de novas práticas sustentáveis nutricionalmente (Saiote, 2013). O desafio será criar através da substituição destes ingredientes, alimentos de origem vegetal que detenham um equilíbrio nutricional equivalente às concentrações energéticas necessárias, para cada espécie (Saiote, 2013).

Como vimos anteriormente, os camarões peneídeos apresentam diferentes hábitos alimentares ao longo do seu ciclo de vida, sendo herbívoros na fase juvenil e, progredindo, de forma gradual para uma dieta carnívora na fase adulta. Existem relatos que confirmam a existência de materiais de origem vegetal, como sementes, no trato digestivo dos camarões. Como tal, a substituição da farinha de peixe por ingredientes de origem vegetal na ração, para reduzir os custos de produção, tem sido uma alternativa ponderada por diversos investigadores em todo o mundo (Hulefeld *et al.*, 2018).

Um dos ingredientes alternativos e com numerosas vantagens associadas é a soja, a qual apresenta uma elevada disponibilidade no mercado, atendendo aos preços acessíveis e a uma ótima digestibilidade. Contudo, esta matéria-prima não iguala a

farinha de peixe ou o óleo de peixe, uma vez que apresenta um déficit em alguns aminoácidos essenciais (lisina, metionina e treonina), considerados muito importantes para um melhor empenho zootécnico nos camarões (Nunes *et al.*, 2014).

De acordo com Sookying Davis e Silva (2013), a substituição da proteína animal pela proteína vegetal, na elaboração das rações comerciais para camarões marinhos, especialmente a soja como ingrediente principal, tem sido muito frequente.

Diversos estudos corroboram este facto, Alvarez *et al.*, (2007) relata que o farelo de soja poderá substituir a farinha de peixe até 76,5% em dietas formuladas para a espécie *Litopenaeus schmitti*, sem apresentar diferenças significativas na sobrevivência em todos os tratamentos aplicados. A administração de dietas derivadas de ingredientes vegetais com percentagens de 50% a 80% na sua composição, principalmente o farelo de soja, não comprometem o crescimento do camarão-branco-do-Pacífico, *L. vannamei*.

Apesar dos resultados obtidos terem sido promissores até à data, é necessário ainda avaliar com maior precisão o potencial individual dos ingredientes, bem como compreender melhor as exigências nutricionais dos camarões.

4.4 Digestibilidade das rações e ensaios de crescimento

O controlo da qualidade dos ingredientes presentes na formulação das rações é indispensável para o sucesso do cultivo de uma determinada espécie. Um determinado alimento formulado pode fornecer uma excelente fonte de proteínas e, no entanto, resultar num cultivo inadequado, caso os seus ingredientes constituintes não sejam corretamente digeridos e incorporados (Sudaryono *et al.*, 1996). Um alimento considerado ideal deve apresentar uma alta eficiência de utilização, evitando particularmente, a poluição ambiental consequência da sobrecarga desnecessária de nutrientes (Tacon, 2002).

A digestibilidade das rações é um índice considerado adequado em estudos nutricionais e está relacionada com a capacidade dos nutrientes de um determinado alimento serem absorvidos e direcionados para o metabolismo e crescimento dos organismos aquáticos produzidos. O método empírico mais utilizado para medir a disponibilidade de um nutriente é a digestibilidade aparente (DA). Esta é definida como a diferença entre a quantidade de nutrientes digeridos na dieta e a quantidade nas fezes, ou seja, fornece-nos uma estimativa da percentagem de nutrientes provenientes da dieta que são absorvidos e direcionados para o crescimento e metabolismo. O termo “aparente” deve-se ao facto de possíveis presenças de outros componentes nas fezes, nomeadamente, células da mucosa estomacal, enzimas digestivas e bactérias, além dos

próprios componentes derivados do próprio alimento. No entanto, a distinção do que é somente proveniente do alimento - digestibilidade verdadeira - é muito difícil de calcular com precisão, tendo como definição, o equilíbrio entre a dieta e os respectivos resíduos alimentares que escaparam da digestão e chegaram nas fezes, excluindo os produtos metabólicos (Oliveira 2008).

Atualmente existem diversos métodos para a avaliação da digestibilidade aparente (DA), tanto através do cultivo de animais vivos (métodos *in vivo*), como também, através da análise de reações bioquímicas (*in vitro*). O método *in vivo*, de um modo geral, apresenta mais custos associados, por exigir tempo e mão-de-obra especializada (Motikawa, 2006).

Hoje em dia, o método *in vivo* mais utilizado baseia-se na utilização de um marcador inerte (para não interferir com a taxa do nutriente avaliado), de óxido de cromo (Cr_2O_3) inserido nas dietas experimentais, seguindo-se sucessivamente a colheita e análise da sua concentração e do nutriente avaliado na dieta ingerida e nas fezes. Posteriormente segue-se o cálculo da DA, através da proporção dos compostos antes da administração da dieta e após a sua ingestão (fezes). O método gravimétrico ou colheita total, é outro método *in vivo* bastante recomendado para a avaliação da DA. Este baseia-se na quantificação dos nutrientes ingeridos e excretados, através da colheita total da ração não ingerida e das fezes dos organismos cultivados, até à obtenção de uma amostra significativa para análise (Oliveira, 2008).

Estes métodos *in vivo* são dois dos métodos mais solicitados por clientes na empresa Riasearch, sendo as proteínas dos nutrientes mais avaliados, devido à sua relação direta com o crescimento dos animais.

5. Pepinos-do-mar

5.1 Sobre-exploração e aquacultura de pepinos-do-mar

Os pepinos-do-mar ou holotúrias pertencem a uma das cinco classes de animais marinhos invertebrados, os equinodermes, dos quais se incluem as estrelas-do-mar e os ouriços-do-mar. Atualmente são conhecidas cerca de 1712 espécies holoturianas, distribuídas em 6 ordens e 25 famílias (FAO, 2015), encontrando-se o maior número, na região da Ásia-Pacífico, contudo, a cada ano, são descritas novas espécies.

O interesse crescente por espécies de níveis tróficos inferiores anteriormente desprezados, juntamente com uma tecnologia cada vez mais aprimorada e um aumento da expansão geográfica das pescas, levam à sobre-exploração dos recursos disponíveis, com maior incidência nos *stocks* naturais de pescado (Santos *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, tem-se vindo a assistir, a um crescente interesse na exploração das populações de holotúrias a nível mundial, por motivos económicos, assim como pelo elevado potencial biotecnológico demonstrado, essencialmente na obtenção de compostos bioativos (Santos, 2017).

Tradicionalmente, os pepinos-do-mar, são também conhecidos como “beche-de-mer” ou “trepang”. Podem ser consumidos de diversas formas, frescos, cozinhados e processados em bandas de músculo congeladas ou pele seca. Geralmente, o músculo é removido da pele e posteriormente congelado e a pele é semi-processada onde é sujeita a um processo de cozedura e salga. Algumas espécies são consumidas por inteiro, enquanto noutras apenas é edível as gónadas ou intestinos (Bai *et al.*, 2012). A maioria dos pepinos-do-mar são comercializados para consumo humano, fins farmacológicos e indústria de cosméticos.

Nos países asiáticos, têm-se assistido a uma crescente demanda por esta iguaria, devido à intensidade de captura nas últimas décadas, resultando da sobre-exploração de diversas populações. Na Europa, nomeadamente em Espanha e França, são capturadas várias espécies de pepinos-do-mar para exportação e embora não façam parte da gastronomia ocidental (com exceção de algumas regiões), possuem um elevado valor económico (Sales *et al.*, 2017). Em Portugal, a pressão sobre estes recursos é já visível, como na Ria Formosa, onde as holotúrias são capturadas ilegalmente e exportadas para mercados externos (Domínguez-Godino *et al.*, 2015).

Por estas razões, o valor de mercado destes organismos aumentou e simultaneamente os esforços para desenvolver a produção aquícola de várias espécies de pepinos-do-mar também (Zamora *et al.*, 2016).

Aspetos relacionados com a biologia e a ecologia destas espécies, como uma locomoção lenta e evidências moleculares que sugerem que estes animais podem viver até aos 100 anos, tornam estes espécimes ainda mais vulneráveis à sobre-exploração (Uthicke *et al.*, 2003).

A aquacultura e o repovoamento são uma forma de colmatar o défice de pepinos-do-mar selvagens nos últimos anos. Atualmente, os números de países envolvidos na aquacultura desta espécie centram-se maioritariamente na China, Japão, Austrália, Canadá e Indonésia (Santos *et al.*, 2013).

Esta prática provou ser uma fonte promissora do recurso nos mercados asiáticos, porém devido à falta de conhecimento sobre algumas espécies, nomeadamente a biologia, ecologia e estratégia reprodutiva, esta indústria lucrativa ainda não foi desenvolvida num grande número de espécies com potencial futuro (Chen, 2004).

A China, que é a principal produtora de pepinos-do-mar, desde meados da década de 1980, produziu em 2013, quase 194 000 toneladas anuais, (o equivalente a cerca de 99,77% da aquacultura mundial de pepinos-do-mar), abastecendo, deste modo, a demanda local (FAO, 2015). As explorações de pepinos-do-mar nas regiões da Ásia e do Pacífico são, maioritariamente, extensivas, sendo que a maior parte da produção é exportada para o mercado chinês. Hong Kong é uma das regiões administrativas especiais da República Popular da China com maior consumo, detendo 80% do comércio mundial. Sendo que, as espécies produzidas com maior expressão nestas mesmas regiões, centram-se na *Holothuria scabra* e *Apostichopus japonicus*, consideradas duas das principais espécies com maior valor económico no mercado atual (Purcell, 2014).

A Turquia é o principal país mediterrâneo responsável pela captura e exportação de pepinos-do-mar, para países como Hong Kong, EUA, Taiwan, Namíbia, China e Singapura, com uma média de 162 toneladas em 2015 (Sicuro e Levine, 2011).

As holotúrias assumem particular relevância em termos ecológicos, uma vez que sendo organismos detritívoros, desempenham um papel importante na manutenção e melhoramento das condições nos ecossistemas onde se encontram. São responsáveis pela reciclagem de cerca de 90% da biomassa dos fundos marinhos, contribuindo desta forma, para a oxigenação dos sedimentos (Bell *et al.*, 2007). O comportamento nutricional do pepino-do-mar promove o retorno de nutrientes para a coluna de água, aumenta a produção de bactérias associadas aos sedimentos e interfere na estabilidade deste, apresentando, deste modo, efeitos benéficos sobre o meio ambiente (Tolon *et al.*, 2016).

5.2 *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823)

A espécie *Holothuria forskali* pertence à família *Holothuroidea* e à ordem *Aspidochirotida*, pode ser encontrada em toda a costa continental, até às ilhas dos Açores, Desertas e Madeira. Apresenta uma distribuição geográfica típica de uma espécie Atlântica-Mediterrânica, sendo possível ser encontrada também, desde a Escandinávia e ilhas Britânicas até às ilhas Canárias e Marrocos (Tuwo e Conand, 1992). É uma espécie típica da zona intertidal, ficando exposta ao ar durante a maré baixa (onde consegue sobreviver a longos períodos de emersão, tolerando uma vasta gama de temperaturas) e permanecendo submersa na subida da maré.

Habita preferencialmente substratos rochosos, no entanto é possível encontrá-la ainda na zona do subtidal, geralmente até aos 50 metros de profundidade (Campbell, 2006). Apresenta uma coloração negra ou amarelo-acastanhada, exibindo a extremidade

das papilas dorsais branca, podendo atingir em média os 30 cm de comprimento (Saldanha, 2003).

Anatomicamente, em oposição a outros equinodermes, apresenta um corpo cilíndrico, vermiforme mole, bastante alongado no eixo oral-aboral, da boca ao ânus (Santos, 2017). O aparelho bucal é preenchido por cerca de 20 pequenos tentáculos que captam o alimento, conduzindo-o até à cavidade bucal (Pangkey *et al.*, 2012; Purcell *et al.*, 2012).

A parede do corpo é constituída por uma derme e uma epiderme espessa, onde estão localizados o endosqueleto e um epitélio celómico. A derme possui uma característica peculiar dos equinodermes, designada por tecido conjuntivo mutável (TCM) (Lawrence, 1987), conferindo a estes organismos a capacidade de alterar voluntariamente a rigidez do próprio corpo, ou seja, do próprio tecido, podendo tornar-se rijo ou flexível consoante as circunstâncias envolventes.

Outra característica peculiar é a presença de um sistema hidrovacular de natureza celómica, composto por um sistema de tubos por onde circula a água do mar e o fluido celómico. Este sistema é constituído por pequenas perturbações exteriores ao corpo, designados por pés ambulacrários, sendo fundamentais para a locomoção e circulação (Purcell *et al.*, 2012).

A maioria das espécies holoturianas não possuem sistema excretor e respiratórios definidos, realizando trocas através do tegumento. No entanto, holotúrias de maior porte, como é o caso da espécie *Holothuria forskali*, possuem estruturas respiratórias musculares altamente ramificadas, designadas por árvores respiratórias (um par). Estas estruturas, estendem-se desde a cloaca até à cavidade celomática, sendo responsáveis por grande parte das trocas gasosas. A respiração, locomoção e função sensorial são processos combinados (Santos, 2017).

Outra característica própria desta espécie, bem como da ordem *Aspidochirotida*, é a presença de umas estruturas tubulares, extremamente pegajosas. Quando estes organismos, são expostos a situações de *stress* ou quando este lhes é induzido - quer por indução da postura, captura ou predação - expelem uns cordões transparentes e viscosos unidos à cloaca e colados à base das árvores respiratórias, denominados túbulos de Cuvier. Estes túbulos são posteriormente regenerados (cerca de 5 semanas), servindo para imobilizar a ameaça, constituindo um meio de defesa. Podem atingir os 25 cm de comprimento (Tuwo e Conand, 1992; Saldanha, 2003).

O sistema digestivo é completo, composto por: faringe, esófago, estômago e intestino sendo este muito longo comparativamente aos outros órgãos. O sistema nervoso, não é centralizado, sendo formado por redes concentradas constituídas por cinco cordões

nervosos que seguem o padrão pentaradial. Não dispõem de coração nem de sistema circulatório típico (Santos, 2017).

Todos os equinodermes apresentam um potencial regenerativo característico e extremamente desenvolvido, essencialmente no que diz respeito às gónadas e outros órgãos internos. Estes animais passam por flutuações na massa corporal, espessura da pele e massa muscular, durante o ciclo anual de reabsorção e regeneração dos seus órgãos internos, o que sustenta a sua enorme capacidade regenerativa. Consequentemente, as dimensões das holotúrias são difíceis de obter, uma vez que possuem um corpo bastante elástico o que gera imensas dúvidas relativamente ao comprimento real (Campbell, 2006).

Um dos fenómenos mais conhecidos, nas holotúrias das ordens *Aspidochirodita* e *Dendrochirotida* é a evisceração, usada como um mecanismo de defesa contra predadores ou quando o organismo é submetido a condições de *stress*, como a sua manipulação inadequada. Neste processo, as holotúrias contraem a parede corporal e expõem parte ou todos os órgãos internos, dependendo da espécie. Posteriormente, os tecidos lesionados são inteiramente regenerados e voltam ao seu normal funcionamento (Santos, 2017).

Contrariamente a outros equinodermes, o sistema reprodutivo das holotúrias, consiste apenas numa única gónada ou glândula genital (geralmente sem ductos genitais).

Quanto à estratégia reprodutiva, é uma espécie dioica, ou seja, apresenta os sexos separados (Sicuro e Levine, 2011). Reproduzem-se anualmente, uma vez por ano, entre o período de abril a junho, de forma sincronizada nos dois sexos. A reabsorção da gónada vazia, ocorre logo após a desova, sem período de repouso (Tuwo e Conand, 1992). Apresentam também, pouco dimorfismo sexual, com exceção ao período de maturação, sendo o género somente identificado através de dissecação e observação microscópica dos gametas. De acordo com Santos (2014), a observação da cor dos túbulos das gónadas é a forma mais simples de identificar o género.

A fertilização é externa, exibindo um comportamento de desova característico observado em muitas espécies de *Aspidochirotida*. Os machos mantêm uma postura ereta, enquanto as fêmeas balançam para a frente e para trás, enquanto os gametas são libertados na coluna de água. No que diz respeito às taxas de fertilização, as fêmeas são bastante férteis, libertando entre 1 a 2 milhões de óvulos numa única desova (Santos, 2017).

O ciclo de vida destes organismos, passa por cinco estádios clássicos característicos da maioria das espécies pertencentes à família *Holothurians* e à ordem *Aspidochirote-gástrula*, auriculária, doliolária (fase não alimentícia) e pentáctula- sendo o estádio juvenil

atingido após algumas semanas, variando de espécie para espécie (Pangkey *et al.*, 2012).

No que diz respeito à sua estratégia nutritiva possuem poucos predadores naturais conhecidos no estado adulto, sendo exceção as lontras marinhas e algumas espécies de estrelas-do-mar. Os juvenis como são mais vulneráveis, têm tendência a esconderem-se por baixo das rochas para se protegerem de possíveis predadores (Santos, 2017).

II. Relatório de estágio na empresa Riasearch

1. A empresa

Fundada em 2016, a empresa Riasearch, localiza-se (40°44'18.9"N 8°39'41.5"W), no Cais da Ribeira de Pardelhas, freguesia da Murtosa, em Aveiro. Pioneira em Portugal dedica-se fundamentalmente à investigação aplicada e desenvolvimento experimental na área da aquacultura através da realização de ensaios nutricionais, fornecendo um serviço inovador para o setor da aquacultura.



Figura 5- Localização da empresa Riasearch (Adaptado: Google maps).

Tem como principal objetivo a validação de dietas destinadas a diferentes organismos aquáticos, bem como, a realização de ensaios de digestibilidade e crescimento destes mesmos organismos. Presta, também, serviços de consultoria em aquacultura e tecnologia de recirculação.

A empresa Riasearch surgiu da identificação de uma necessidade no mercado: a inexistência de empresas destinadas à realização de ensaios nutricionais. Face à diminuta oferta de serviços de experimentação animal relativamente à espécie *Litopenaeus vannamei*, a empresa Riasearch especializou-se no estudo e análise desta, a qual apresenta características que consubstanciam uma vantagem competitiva relativamente a outras espécies, e que se traduz em índices de rentabilidade bastante significativos. Contudo, realiza também ensaios experimentais para uma ampla gama de espécies aquáticas, nomeadamente peixes marinhos como a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e o linguado senegalês (*Solea senegalensis*).

Não obstante colaborar com empresas nacionais, é no mercado internacional que a empresa Riasearch tem a sua principal fonte de atividade, que solicitam a sua colaboração na procura de serviços destinados à experimentação animal, desenvolvendo

vastas parcerias com empresas do setor alimentar para animais aquáticos, estando também envolvidos trabalhos para Centros de Investigação.

Desenvolve também, projetos de I&D em colaboração com os seus parceiros académicos e industriais com o objetivo final de criar novos produtos e tecnologias para o setor da aquacultura. Acrescenta-se ainda como principal parceria na realização de ensaios nutricionais a empresa SPAROS, “spin-off” do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve.

Apesar de ser uma empresa relativamente recente, as projeções atuais indicam que a Riasearch tem solicitações superiores à sua capacidade de entrega, o que revela uma enorme tendência para o seu crescimento e expansão.

2. Objetivos

O estágio realizou-se na empresa Riasearch, no âmbito do Estágio Curricular do 2º ano do Mestrado em Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, do Instituto Politécnico de Leiria.

O estágio curricular teve como principal objetivo o contacto com a realidade empresarial na área da aquacultura, integrando as mais diversas rotinas da instalação. Foram realizadas tarefas como:

- Monitorização e manutenção dos sistemas de cultivo;
- Montagem de sistemas de produção e seu funcionamento;
- Produção e manutenção de cultivos auxiliares, nomeadamente artémia;
- Participação na elaboração de ensaios de crescimento e digestibilidade;

3. Instalações

As instalações da empresa Riasearch consistem em várias unidades experimentais replicáveis, projetadas para gerar dados científicos robustos.

As instalações da empresa incluem um biotério, uma área técnica e um laboratório. O biotério é composto por 55 tanques circulares e 12 tanques retangulares de pvc, com um volume respetivo de 200-350 e 160 L, onde se realizam os ensaios experimentais (Figura 6). Os tanques circulares permitem uma melhor autolimpeza. A água limpa entra numa das laterais do tanque, de forma a criar um movimento circular da água, e a saída localiza-se no centro do tanque de forma a facilitar a sucção da sujidade.



Figura 6- Biotério da empresa, tanques retangulares (à direita) e tanques circulares (à esquerda) (Fonte: www.riasearch.pt).

As instalações da empresa são monitorizadas por um *software* informático personalizado (SCADA), estando ligado a um sistema de alarme 24 horas, que permite a automação e controlo dos sistemas, através da verificação de diversos parâmetros, nomeadamente os arejadores (oxigénio), temperatura, bombas e luz, permitindo uma gestão automática. Sendo possível aceder diretamente a partir de qualquer computador ou *smartphone*, a qualquer informação relacionada com os sistemas da aquacultura, facilitando o contacto e a análise com os valores atualizados. Em casos de avaria ou níveis de alguns parâmetros que estejam fora do comum, por exemplo, o oxigénio dissolvido, são emitidos alarmes através do sistema informático permitindo uma atuação imediata.

Na área técnica, encontra-se todo o equipamento necessário ao correto funcionamento do sistema, nomeadamente bombas de circulação e todo o equipamento responsável pelo tratamento de água.

Nesta mesma divisão, podemos encontrar um espaço de cultivo pós-larvar constituído por 12 tanques retangulares com um volume de 50 L para a realização de ensaios experimentais com PLs, assim como 4 tanques circulares de 600L para a aclimação, quarentena ou crescimento, podendo funcionar ainda como *stock* para o armazenamento temporário de pós-larvas.



Figura 7- Ensaio experimentais realizados nos 12 tanques retangulares (50 L) (Fonte: www.riasearch.pt).

Desta forma, é possível otimizar a logística de produção, regularizando o fluxo de pós-larvas das maternidades e o povoamento de tanques recém-preparados e, permitindo, deste modo, aclimatar os camarões às condições ambientais da aquacultura, manter um inventário, mantendo a qualidade dos *stocks* adquiridos, reduzindo o risco de exposição das PLs ainda recém-desenvolvidas a possíveis agentes patogénicos.

Na sala técnica, ainda se encontra um tanque cilindro-cónico utilizado para cultivos auxiliares, nomeadamente *Artemia salina* que servirá de alimento vivo para os indivíduos, *L. vannamei*, na fase pós-larvar.

4. Circuito hidráulico e equipamentos

4.1 Tratamento de água

Os sistemas desta unidade funcionam em sistema fechado de recirculação (RAS – *Recirculating Aquaculture System*), o que significa que apenas uma pequena percentagem de água dos tanques é substituída diariamente por água nova. O volume de água utilizado no sistema é continuamente tratado, sendo forçado a passar por uma combinação de processos físicos e biológicos. Devido ao elevado controlo nas condições de produção, neste sistema, é possível produzir espécies não nativas (como é o caso) ou espécies que não se compatibilizem com as condições naturais do local, uma vez que este sistema permite adequar a temperatura e a qualidade da água à espécie a produzir (Zhang *et al.*, 2011; Badiola *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014). Simultaneamente, esta tecnologia proporciona ainda, um ambiente estável e de qualidade aos organismos aquáticos, maximizando o seu bem-estar e, conseqüentemente, otimizando as suas taxas

de crescimento e a utilização dos recursos necessários para este (Pires, 2015). Outra vantagem associada ao RAS é o maior controlo relativamente a agentes patogénicos, diminuindo a sua incidência significativamente, uma vez que esta tecnologia minimiza a exposição da unidade a fatores externos (Murray *et al.*, 2014). Por outro lado, requer uma gestão cuidada e minuciosa na prevenção de doenças ou surtos.

Outro aspeto relevante associado ao RAS, diz respeito à otimização do rácio de conversão alimentar (FCR). Dado que, este sistema possibilita uma gestão mais rigorosa da alimentação, através da previsão da idade e tamanho das espécies produzidas em cada fase de produção, devido à maior previsibilidade e estabilidade dos padrões de crescimento, uma vez que existe um controlo mais rigoroso dos parâmetros da água e, conseqüentemente, de todo o ciclo de produção. Desta forma, é possível obter maiores taxas de crescimento, reduzindo a quantidade de alimento administrado, compensando o maior gasto de energia aliado à utilização deste sistema (Murray *et al.*, 2014).

Todos os factos mencionados anteriormente implicam que a aplicação destes sistemas, não sejam viáveis nem possíveis ao cultivo de todas as espécies ou adequados a todos os locais, (Piedrahita, 2003), mas sim em produções intensivas de espécies com alto valor comercial (Gutierrez-Wing e Malone, 2006), devido aos elevados custos de implementação e operação.

A empresa Riasearch dispõe de três sistemas RAS independentes que permitem uma enorme flexibilidade em vários parâmetros ambientais, fornecendo condições experimentais controladas, sendo possível manipular a salinidade, temperatura e níveis de oxigénio, de modo a garantir as melhores condições à espécie a produzir, reduzindo o *stress* e maximizando o crescimento. Os tanques experimentais também estão adaptados para realizar testes em diferentes espécies, incluindo peixes, camarões e plantas.

A captação de água é feita a partir de um furo subterrâneo, localizado a 8 m de profundidade, tendo uma salinidade de 19‰. Seguidamente, a água é bombeada, para depósitos com diferentes capacidades, passando por um sistema de hidroinjeção de ar (hidroinjector) e um filtro de areia antes de ser introduzida no sistema.

O sistema de hidroinjeção de ar proporciona tanto a agitação e a homogeneidade do volume de água, como o arejamento, evitando a sua septicidade e possibilitando, deste modo, a oxidação do ferro dissolvido, de modo a que este seja removido posteriormente pelo filtro de areia. Este filtro, retém o ferro precipitado e outros sólidos em suspensão.

Tendo em consideração estes aspetos, a sua remoção é de fundamental importância, dado que ocorre uma reação de oxidação-redução do Fe^{2+} em Fe^{3+} , formando um precipitado. O ião ferroso (Fe^{+2}) é muito mais solúvel do que o ião férrico (Fe^{+3}). Portanto, os inconvenientes que o ferro traz às águas são atribuídos maioritariamente ao ferro

“ferroso”, que, por ser mais solúvel, é mais frequente (Piveli 2012). O ferro, independentemente de não ser considerado um elemento tóxico, traz diversos problemas à qualidade da água das aquaculturas e conseqüentemente ao produto final, portanto é necessário recorrer ao seu tratamento e monitorização (Piveli, 2012). Só após este tratamento é que a água é introduzida nos sistemas.

4.2 Filtração da água no sistema

Na Figura 8 é possível ver uma representação esquemática do circuito hidráulico da empresa Riasearch que resume todos os processos e etapas envolvidos na filtração da água da empresa.

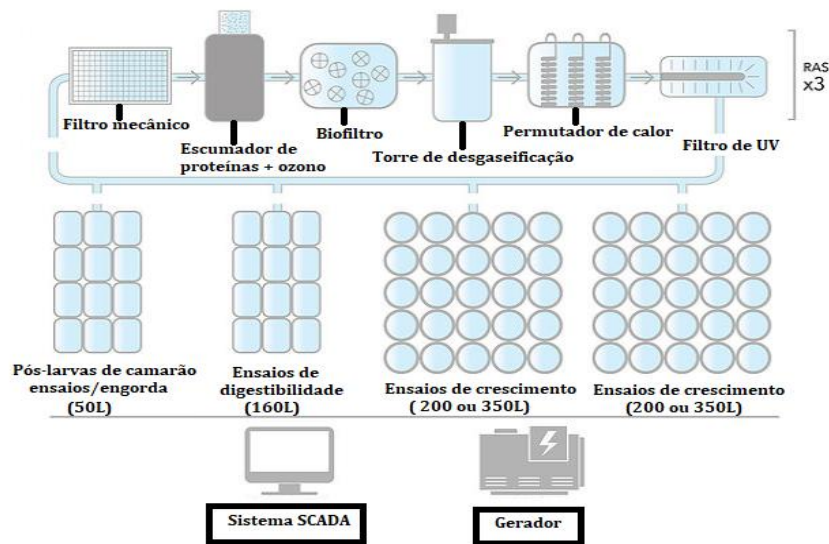


Figura 8- Esquema do circuito hidráulico da empresa (Fonte: Adaptado www.riasearch.pt).

A primeira etapa de filtração é feita por um conjunto de três filtros de partículas de diferentes malhas, onde ocorre a retenção de sólidos em suspensão. Posteriormente, a água é encaminhada para o escumador de proteínas, *Protein Skimmer*, responsável, não só pela remoção de sólidos coloides e outras partículas finas, como também por algumas partículas dissolvidas por escumação, processo pelo qual os resíduos aderem às bolhas de ar produzidas por aerificação gerando espuma. É também adicionado ozono (introdução por *venturi*) para desinfecção da água. A utilização deste processo físico-químico deve-se à necessidade de retirar da água partículas que, por métodos mecânicos, não seriam removidas.

Do escumador de proteínas, a água é conduzida para o filtro biológico, onde se dá a remoção das substâncias dissolvidas e a conversão da amónia. Num sistema fechado, toda a amónia (NH_3), proveniente de alimento não consumido e do metabolismo dos

animais passa a acumular-se na água. Este composto é tóxico para maioria dos organismos aquáticos, podendo muitas das vezes ser letal para espécies mais sensíveis. Portanto, devido a esta acumulação constante, a filtração biológica é crucial, sendo um dos pilares dos sistemas de recirculação.

Os filtros biológicos, (biofiltros) têm no seu interior um substrato onde as bactérias heterotróficas nitrificantes (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*), responsáveis pela oxidação da amónia, se fixam. Estas bactérias são responsáveis por converter, a amónia (NH_3) em nitritos (NO_2) e, posteriormente em nitratos (NO_3) e também eliminar o dióxido de carbono. Os nitratos são a forma final e menos tóxica do processo de nitrificação, sendo de um modo geral bem tolerados pelos animais.

Seguidamente, a água é transportada para depósitos de água limpa e, posteriormente, bombeada para um filtro de UV que procederá à sua desinfecção através da radiação ultravioleta. Por fim, quando necessário, a água passa por um permutador de calor onde é aquecida pela ação de uma bomba de calor, sendo novamente encaminhada para os tanques de cultivo.

Para garantir o sucesso dos ensaios experimentais e evitar níveis baixos de oxigénio na água, a empresa utiliza um compressor (*Air blower*) responsável por assegurar o arejamento da água através de diversos difusores colocados individualmente em cada tanque de cultivo. A manutenção dos níveis de oxigénio na água é assegurada através da utilização de um caudal de água e biomassa adequados em cada tanque.

5. Rotinas

Diariamente procede-se à limpeza da sonda redox, de forma a assegurar, uma leitura mais correta do potencial redox (ORP), uma vez que este parâmetro é utilizado no controlo da injeção de ozono no *skimmer*. Se o potencial redox estiver acima de determinado valor, o ozono deixa de ser injetado e, desta forma, não ocorre a introdução de níveis elevados de ozono na água, que podem ser muito prejudiciais para os organismos aquáticos.

A pesagem da ração é muito rigorosa e necessita de uma atenção redobrada, uma vez que um erro na pesagem pode comprometer o resultado dos ensaios experimentais. De forma a maximizar e rentabilizar o tempo disponível, a pesagem da ração é sempre efetuada para o dia seguinte. Esta pesagem é efetuada numa balança analítica de precisão (KERN, PFB 120-3), de acordo com a quantidade ideal calculada para cada ensaio experimental. De um modo geral, o alimento é fornecido 4 vezes ao dia (9h, 12h, 15h e 17h). O armazenamento da ração também é outro aspeto bastante importante na

empresa, um *stock* organizado de forma adequada, proporciona a qualidade e a manutenção das características organolépticas iniciais dos ingredientes.

Antes da limpeza dos tanques, observa-se o comportamento dos organismos aquáticos: a capacidade natatória, reações de *stress*, possíveis lesões e indícios de infecções parasitológicas.

A limpeza manual dos tanques, é outra tarefa que se realiza diariamente, várias vezes ao dia, removendo os exosqueletos, fezes e ração não consumida. Habitualmente, contabiliza-se a quantidade de ração desperdiçada e o número de mortos, de acordo com o ensaio que esteja a ocorrer de momento. Caso ocorra mortalidade de organismos, é extremamente importante diminuir o tempo de permanência dos indivíduos mortos na água, para diminuir o risco de contaminação.

É importante mencionar que todos os utensílios utilizados na limpeza dos tanques são lavados e desinfetados antes de serem novamente reutilizados noutros tanques, de forma a evitar possíveis contaminações.

A limpeza dos tanques das pós-larvas é realizada várias vezes ao dia, sempre que os níveis de sujidade do tanque o justifiquem. Para tal, utiliza-se o método de sifonagem, através de um pequeno tubo com uma malha filtrante, aspirando deste modo, a sujidade que fica retida nos tanques. Este é um procedimento moroso e exige uma atenção redobrada, podendo acidentalmente reter possíveis pós-larvas por sucção, danificando assim a integridade física das mesmas. É importante monitorizar e registar a quantidade de larvas mortas em cada dia, servindo as taxas de mortalidade/sobrevivência como indicadores do desenvolvimento larvar.

As pós-larvas são avaliadas diariamente a fim de identificar possíveis problemas, deve observar-se se existem alterações nos padrões de comportamento e coloração, nomeadamente comportamentos incomuns como, letargia e desorientação que são sinais de que há algo de errado.

Após a limpeza dos tanques, distribui-se a ração a ser testada, que se encontra identificada de acordo com o número de cada tanque experimental. Consoante a flutuabilidade da ração e a sua velocidade de imersão, é por vezes necessário agitá-la para que esta afunde e seja de mais fácil acesso aos organismos aquáticos.

As análises aos parâmetros físico-químicos da água, são de fulcral importância, de forma a controlar a qualidade da mesma e, conseqüentemente, o bem-estar dos organismos aquáticos. O controlo da amónia, nitratos, nitritos, ferro (NH_3 , NO^{3-} , NO^{2-} e Fe^{3+}) é feito através de *kits* de testes rápidos colorimétricos, sendo realizadas análises duas vezes por semana, sendo que aos nitratos são feitas análises com menor frequência. O oxigénio dissolvido (O_2), a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidade (‰) e pH são

monitorizados diariamente através de uma sonda multi-paramétrica portátil (HANNA instruments, Portugal).

Num sistema fechado, assim como em meio natural, os principais contaminantes da água são os compostos nitrogenados. O principal produto excretado pelo metabolismo dos crustáceos, é a amónia, o produto final do metabolismo das proteínas, sendo altamente tóxica na sua forma livre ou não ionizada (gás dissolvido na água, NH_3). Além disso, se a amónia na sua forma tóxica se conseguir difundir através das membranas celulares das brânquias dos camarões, ocorrerá a redução do crescimento destes através da degradação da ração não consumida. Sendo assim, é necessária uma elevada monitorização deste parâmetro, de forma que, a concentração da amónia seja mantida em valores baixos, para que não ocorram limitações no sistema imunitário dos camarões e, conseqüentemente, no crescimento e, até mesmo, na sua própria sobrevivência.

Por outro lado, a toxicidade dos nitritos, analogamente aos peixes, não tem uma influência tão acentuada nos camarões, pelo facto do sangue dos camarões conter uma proteína denominada hemocianina- hemolinfa- em vez de conter hemoglobina, como pigmento que serve para as trocas gasosas na respiração, ou seja, para o transporte de oxigénio. Complementarmente, a água dos tanques de cultivo contem altas concentrações de iões cloreto, que competem com o nitrito pelos recetores localizados nas células branquiais, reduzindo desta forma, a absorção do nitrito (Nascimento, 2013).

Relativamente ao pH, os valores ótimos para a espécie, de acordo com Van Wyk (1999), encontram-se entre 7-9. Porém, para outros autores, o camarão *L. vannamei* suporta variações de pH superiores a estes valores. Na empresa, os valores estabelecidos para este parâmetro situam-se entre os 7,5-8. Eventualmente, após a monitorização do pH, caso se obtenham valores inferiores a 7, efetuam-se medições à alcalinidade da água, de forma a controlar os carbonatos e bicarbonatos. No entanto, caso ocorra algum problema, ajusta-se a alcalinidade da água, através da adição de bicarbonato de sódio, elevando-a.

No que diz respeito à temperatura, como vimos anteriormente, pelo facto desta espécie ser considerada pecilotérmica, detém uma enorme versatilidade para se adaptar a diferentes tipos de água. Segundo, Hernández *et al.*, (2006) a gama de temperaturas ótima para o cultivo desta espécie, encontram-se entre os 27-30°C (Lima, 2013). A temperatura da água do sistema da empresa é mantida entre 27-29°C.

Relativamente à salinidade, os valores ideais encontram-se compreendidos entre 15-25‰, para a espécie *L. vannamei* (Lima, 2013). A salinidade da água do furo da empresa encontra-se compreendida entre os 19-20‰.

Alterações na salinidade e/ou na temperatura, podem provocar impactos na eficiência metabólica dos animais cultivados, no oxigénio e no consumo de alimento, excreção da amónia, concentração de nitritos na água e na muda, podendo provocar também alterações na resistência, crescimento e sobrevivência destes organismos (Lima, 2013). Desta forma, é essencial uma monitorização regular e precisa destes parâmetros para o sucesso do cultivo e dos ensaios experimentais.

É essencial garantir a manutenção e o bom funcionamento de todo o material e equipamento de forma a não comprometer o ciclo produtivo e os ensaios experimentais. Diariamente procede-se à limpeza das sondas de oxigénio e temperatura para evitar erros de medição devido à acumulação de matéria orgânica presentes nos tanques. Semanalmente também se procede à limpeza dos tubos centrais e de saída dos tanques. O procedimento é relativamente simples e realiza-se apenas com uma esponja e uma escova que permitem remover a sujidade. A limpeza dos permutadores de calor é feita regularmente, de maneira a impedir a formação de incrustações ou outros depósitos nas placas.



Figura 9- Limpeza dos permutadores (Fonte: Própria).

6. Transporte e aclimação das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*

O transporte de animais vivos é uma das principais operações que pode comprometer a qualidade e a taxa de sobrevivência dos organismos aquáticos, sendo das práticas que mais causa *stress* aos organismos. A monitorização de diversos parâmetros físico-químicos, essencialmente a amónia, durante o transporte de animais vivos, é um dos principais problemas a ter em conta neste processo. Como tal, é essencial cumprir uma série de requisitos que cumpram o bem-estar animal, bem como possuir um

conhecimento adequado da biologia da espécie a transportar, de forma a não interferir com o sucesso deste (Pinho, 2011).

Usualmente o “tamanho” da pós-larva é retratado no mercado em função da sua idade cronológica, após completar o período de metamorfose. Portanto, uma PL₁₀ já passou pelos primeiros estádios de desenvolvimento larvar, nomeadamente, náuplio, zoea e *mysis*, sendo uma pós-larva há 10 dias. A idade mais utilizada pelos produtores de crustáceos, é a PL₁₀, entrando a partir daqui numa nova etapa de cultivo, a engorda.

Atualmente, a empresa tem desenvolvido ensaios experimentais com o camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*. Os indivíduos chegam na fase de pós-larva vindos de uma maternidade comercial situada nos Estados Unidos da América. Apresentam geralmente, um peso médio de 0,003 g, o equivalente a PL's com aproximadamente 10 dias (PL₁₀). Antecedentemente à receção das pós-larvas procede-se à limpeza e desinfecção dos tanques de aclimação.

O transporte é realizado em sacos de polietileno, preenchidos com água, oxigénio saturado e carvão ativado, utilizado para neutralizar produtos metabólicos como a amónia (Figura 10).

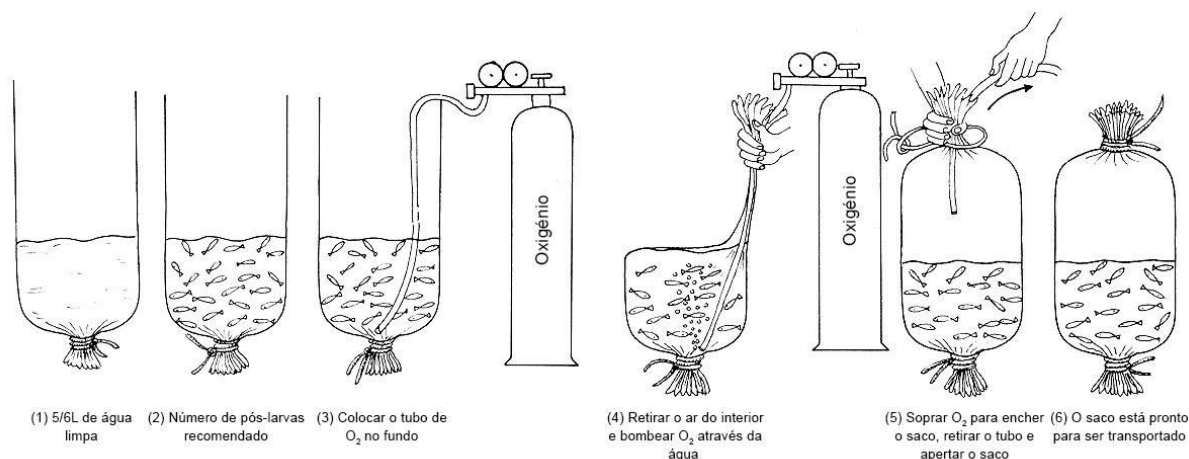


Figura 10- Processo de embalagem de pós-larvas de camarões para o transporte (Fonte: Adaptado, Riasearch).

Antes do transporte, os animais ficam em jejum durante 24 horas, reduzindo o metabolismo e, evitando desta forma, a degradação da qualidade da água através do aumento de resíduos metabólicos e, conseqüentemente, a diminuição do consumo de oxigénio (Pires 2015). Após a chegada dos animais procede-se à aclimação destes.

Primeiramente medem-se os parâmetros físico-químicos da água do transporte, nomeadamente, salinidade, temperatura, oxigénio dissolvido e pH e comparam-se com os da água da empresa. De seguida, colocam-se os sacos de polietileno no interior dos

tanques de aclimação já abastecidos com pouca água, virando-os lentamente, de modo que a água proveniente do transporte fique no interior destes. A aclimação é um processo gradual, começando por se aumentar a temperatura e diminuindo-se a salinidade e pH, ajustando o caudal dos tanques até que os valores estabilizem. Ao longo deste processo recorre-se a medições periódicas a cada 15 minutos, tendo em conta que a temperatura não pode variar mais de 1°C, salinidade 1‰ e o pH 0,1, respetivamente.

Após o processo de aclimação, que dura algumas horas, administra-se alimento vivo, designadamente artémia salina (2-10 náuplios de artémia/PL).

As fases iniciais de vida são uma etapa crítica no desenvolvimento larvar. Os animais competem ativamente por alimento e espaço no ambiente de cultivo, podendo criar disparidade no peso corporal, como também canibalismo entre si.

A *Artemia sp.* destaca-se como um dos alimentos vivos mais fornecido nas fases larvares iniciais de diversas espécies, pela sua fácil produção laboratorial e método de cultivo, pelo elevado valor proteico e fácil digestibilidade, reduzindo a incidência de canibalismo e elevando assim a taxa de sobrevivência larvar.

Posteriormente as pós-larvas são retiradas do tanque de aclimação, contadas individualmente para determinar a taxa de sobrevivência e a densidade populacional a distribuir por tanque experimental, para se dar início à engorda.

Durante esta fase, a alimentação administrada é artémia salina juntamente com ração destinada para camarões, com requerimentos proteicos ajustados ao estágio larvar em que se encontram. As pós-larvas, como metabolizam o alimento muito mais rapidamente do que os camarões maiores, requerem mais alimentações ao longo do dia. Esta alimentação deve ocorrer a cada duas horas de forma contínua, durante 24 horas, utilizando rações com altos níveis de proteína, geralmente entre 40 a 50% e uma granulometria adequada que permitam a manipulação e o consumo pelas PLs. Intervalos mais longos entre as refeições podem resultar em grandes perdas devido ao canibalismo (Pinho, 2011). A ração é quantificada (tamanho do grão e quantidade) para cada tanque dependendo de diversos fatores: densidade populacional, aumento do peso e peso médio de cada tanque. Deste modo, ajusta-se continuamente a quantidade de alimento a administrar a cada tanque, calculando-se o respetivo índice de conversão alimentar (ICA).

Nesta fase pode-se realizar ensaios com PL₁₀ ou proceder à engorda dos camarões para os transferir posteriormente para o biotério onde serão realizados os ensaios, tudo dependendo da solicitação por parte dos clientes.

Após a passagem dos tanques de engorda para o biotério são realizadas biometrias. Os indivíduos utilizados nos ensaios experimentais são todos amostrados. No início de

cada ensaio experimental, os camarões são todos pesados individualmente, sendo que o peso médio inicial é a partir das 2g. É sempre dada especial relevância ao coeficiente de variação (CV), no início de um ensaio experimental, de forma a garantir que a dispersão inicial é a mais baixa possível.

7. Cultivos auxiliares

A produção de fitoplâncton ou zooplâncton, integra o que se designa por cultivos de apoio ou cultivos auxiliares, ou seja, cultivos que se efetuam em paralelo ou complementarmente aos cultivos principais, com a finalidade de produzir alimento vivo para alimentar as larvas dos organismos aquáticos. Por conseguinte, a produção desta cadeia trófica tem que ser adaptada ao consumo diário pelas larvas e a eventuais perdas por mortalidade ou outros incidentes, uma vez que o sucesso da produção larvar depende dos cultivos auxiliares, é essencial que as técnicas de produção de alimento vivo estejam dominadas e de acordo com as necessidades diárias da espécie a produzir.

A artémia salina é considerada um alimento ideal para camarões, como mencionado anteriormente, por apresentar inúmeras vantagens como, o elevado valor nutricional, tamanho adequado, mobilidade e conseqüente atração por parte dos predadores e, ainda, a capacidade de produzir cistos dormentes, que podem ser armazenados por longos períodos de tempo, tornando a sua utilização bastante prática (Ferreira, 2009).

Tendo em consideração estes aspetos, a artémia é ideal para peixes e crustáceos que possam ingerir presas de dimensão superior a 0,5 mm (Sorgeloos *et al.*, 1987).

Os cistos de artémia salina são incubados em tanques cilindro-cónicos de 80L, durante 24 horas, nas seguintes condições: temperatura a 29°C, salinidade 27‰, com forte arejamento da água e iluminação constante. O pH da água encontra-se normalmente a 8, sendo essencial uma monitorização deste parâmetro, uma vez que existe uma tendência para este valor baixar ao longo do processo, como tal para evitar este decréscimo é usual adicionar-se hidróxido de sódio (NaOH).

Para a produção de artémia, coloca-se a eclodir o peso necessário calculado, dependendo do número de larvas que se quer alimentar. Após a eclosão dos náuplios, é realizada a separação dos náuplios dos materiais envolvidos/resultantes da eclosão, nomeadamente, cistos não eclodidos, cápsulas e metabolitos. Para tal, recorre-se a uma tecnologia inovadora, *Sep-Art Artemia Cysts*, que consiste em revestir os cistos com uma camada magnética não tóxica, cuidadosamente selecionada, permitindo uma separação rápida e completa dos náuplios de artémia dos cistos não eclodidos. Após a eclosão dos cistos utiliza-se o *Sep-Art Separator* que contém um forte íman incorporado, sendo os

cistos não eclodidos capturados pelo íman na parte inferior do separador, ficando os náuplios de natação livre não magnéticos prontos para serem utilizados.

Posteriormente segue-se a lavagem dos náuplios de artémia com água do próprio sistema através de um crivo, mantendo-os num recipiente com arejamento e volume conhecido. Realiza-se, seguidamente, a contagem do número de náuplios, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, retirando-se um determinado volume da amostra e calculando-se a concentração total de náuplios presentes no recipiente. Os náuplios são armazenados num local seco, fresco com arejamento e fornecidos às pós-larvas de acordo com as suas necessidades.

III. Ensaios experimentais com a espécie *Holothuria forskali*

1. Introdução

Ainda pouco se sabe sobre quais as dietas artificiais com uma melhor viabilidade para pepinos-do-mar comercialmente importantes, capazes de induzir um rápido crescimento e igualmente eficientes nas exigências nutricionais, para que este crescimento seja proporcionado de forma saudável (Yuan *et al.*, 2006a; Zhou *et al.*, 2006). Informações sobre taxas de crescimento, ecologia larvar, uso de habitat, papel ecológico e sucesso reprodutivo, entre outros, são limitadas e apenas disponíveis para algumas espécies (Mercier *et al.*, 1999; Xilin, 2004; Sun *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, os pepinos-do-mar são produzidos em lagoas de terra sem alimentação artificial. No entanto, com a intenção de aumentar a sua produção os aquicultores começaram a alimentar as holotúrias com dietas formuladas (Shi *et al.*, 2013). Estas dietas formuladas são comumente feitas à base de macroalgas em pó, microalgas em pó ou lama do mar. Nos últimos anos, foram utilizadas como fontes de alimento, fezes de bivalves e algas em pó, no processo produtivo de holotúrias na China (Yuan *et al.*, 2006a).

Estudos recentes demonstraram que, os resíduos alimentares e fezes de animais marinhos, incluindo as fezes das próprias holotúrias, promovem o aumento de cepas bacterianas consideradas benéficas, favorecendo a produção de nutrientes em pepinos-do-mar (Yuan *et al.*, 2006a).

No que diz respeito às algas, é aconselhável a conjugação de duas a três espécies de microalgas (Battaglione, 2002), com o intuito de encontrar um equilíbrio nutricional.

Tendo em conta que as holotúrias se alimentam maioritariamente de substratos ricos em matéria orgânica, incluindo resíduos produzidos por outras espécies, a integração destes organismos detritívoros, em sistemas de aquacultura multitrófica integrada (IMTA) é uma alternativa viável para a sua produção.

De forma a aumentar a produtividade da exploração aquícola e a satisfazer a emergência de novos mercados, têm vindo a ser implementadas novas metodologias. Estas consistem na adição de componentes aos cultivos, nomeadamente algas, que possuem valor comercial e um baixo custo de produção adicional associado (Alexander *et al.*, 2015). Muitos estudos têm abordado sistemas de cultivo integrado de pepinos-do-mar com espécies como, o camarão, mexilhão ou ostras, mencionando as vantagens inerentes à integração destas espécies a este sistema de cultivo (Alexander *et al.*, 2015).

Vantagens estas que estão intrinsecamente relacionadas com os inúmeros benefícios nutricionais, que a inclusão deste recurso-marinho acarreta nas nossas dietas. Os

pepinos-do-mar são ricos em proteínas e baixos em gorduras, possuindo um elevado teor em ácidos gordos essenciais (AGE) como EPA (ácido eicosapentaenóico), DHA (docosahexaenóico) e ARA (ácido araquidónico) (Santos, 2013).

Os lípidos, são um amplo grupo de compostos químicos orgânicos naturais também conhecidos como gorduras, são uma importante fonte de energia para o organismo e desempenham um papel essencial nas atividades metabólicas destes organismos. Os lípidos do pescado são compostos por ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), sendo que a quantidade e o perfil de cada ácido gordo no pescado, varia de espécie para espécie (Nunes *et al.*, 2011).

A gordura polinsaturada é predominantemente constituída por ácidos gordos polinsaturados, nomeadamente ácidos gordos essenciais. São considerados ácidos gordos essenciais, uma vez que o nosso organismo não consegue sintetizá-los e, por isso, o seu aporte é unicamente garantido através da alimentação (Pereira *et al.*, 2013).

Os pepinos-do-mar possuem a capacidade de sintetizar estes ácidos gordos polinsaturados, quando administrados às dietas. Dentro dos ácidos gordos polinsaturados, destacam-se os ácidos gordos essenciais, EPA e DHA, pelo elevado contributo que desempenham na redução do risco de doenças coronarianas, cancerígenas, inflamações e artrite, sendo que o ácido gordo ARA, é responsável pela coagulação sanguínea auxiliando na cicatrização de feridas (Yuan *et al.*, 2006a).

Estes encontram-se presentes em elevadas concentrações em organismos fitoplantónicos, designadamente as microalgas. Consequentemente, as holotúrias, ao serem filtradores ativos, alimentam-se de várias espécies de microalgas (Santos, 2013).

O conhecimento dos requisitos dietéticos e do comportamento alimentar são essenciais para o cultivo de uma determinada espécie em aquacultura, porém o estudo da biologia reprodutiva é o primeiro passo para que seja possível a sua produção.

A reprodução e a maturação das gónadas são reguladas por fatores endógenos, bem como são afetadas por fatores exógenos, como por exemplo a temperatura, salinidade, fatores de *stress*, ciclos lunares, disponibilidade de alimento, entre outros (Santos, 2013).

De um modo geral, o padrão de reprodução dos pepinos-do-mar exhibe um ciclo sazonal, ou seja, espécies situadas em diferentes localizações geográficas, nomeadamente zonas tropicais e zonas temperadas, têm períodos de sincronização das gónadas diferentes, podendo até mesmo haver diferenças entre determinadas regiões geográficas à mesma latitude (Navarro *et al.*, 2012, Santos, 2013). As espécies temperadas apresentam geralmente discretos períodos de desova, na época da primavera e do verão, por outro lado espécies tropicais reproduzem-se por períodos mais longos, durante todo o ano (Navarro *et al.*, 2012)

De acordo com Tuwo e Conand, (1992), a espécie *H. forskali*, apresenta um longo período de maturação da gónada, desde outubro a fevereiro, desovando apenas no início da primavera, período correspondente a águas calmas e ricas em nutrientes (Santos, 2013).

O estado de maturação das gónadas é descrito de acordo com cinco estádios característicos e fundamentais para o correto desenvolvimento das holotúrias: I – indeterminado, II – crescimento, III – maturo, IV – parcialmente desovado e V – desovado (Santos, 2013). Estes, são avaliados segundo o Índice Gonadossomático (GI) e tendo por base vários critérios relativos aos túbulos das gónadas, nomeadamente: coloração, comprimento dos túbulos, diâmetro dos túbulos, presença de ramificações, morfologia e histologia. As técnicas histológicas permitem a observação dos tecidos ao microscópio e, através da microfotografia, avaliar o estado de oogénese e espermatogénese, sendo possível identificar e observar os diferentes estádios de maturação (Ramofafia *et al.*, 2003).

2. Objetivos

A empresa Riasearch pretende implementar um sistema IMTA, associando o seu sistema RAS a um sistema inovador de cultivo de holotúrias, utilizando uma espécie com potencial para desempenhar um papel económico importante na própria empresa e nas empresas aquícolas nacionais.

No âmbito do estágio na empresa Riasearch, surgiu a oportunidade de avaliar a adaptação de holotúrias da espécie *Holothuria forskali*, a um sistema de aquacultura multitrófico integrado (IMTA) *outdoor* e, posteriormente, realizar um ensaio de crescimento, tendo como principais objetivos:

- Avaliar a resistência e o comportamento da espécie a diferentes salinidades, nomeadamente à salinidade da água do furo da empresa;
- Avaliar as taxas de crescimento e sobrevivência da espécie quando sujeita a duas dietas diferentes: 1) uma mistura de três microalgas e 2) os produtos derivados de um efluente composto por fezes de camarões (*L.vannamei*) e alimento não consumido;
- Analisar a influência destas dietas experimentais na composição nutricional do músculo comparativamente com holotúrias selvagens;
- Analisar através de técnicas histológicas os diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas das holotúrias sujeitas ao ensaio experimental;

Já foram realizados alguns estudos promissores em ensaios de crescimento para outras espécies de holotúrias. No entanto, no que diz respeito a esta espécie, *H. forskali*, este ensaio experimental é pioneiro. A elaboração deste trabalho experimental torna-se relevante, na medida em que, pretende contribuir positivamente para aumentar a produtividade de uma exploração aquícola, tendo como principal objetivo, verificar se o aproveitamento dos produtos do efluente dos camarões da espécie, *L. vannamei*, contribuem eficazmente e sustentavelmente para promover o crescimento desta espécie e reduzir paralelamente possíveis impactos ambientais.

IV. Ensaio 1- Influência e tolerância à salinidade da água do furo da empresa da espécie *Holothuria forskali*

3. Materiais e métodos

3.1 Captura, transporte e manutenção

Em janeiro de 2018, realizou-se uma amostragem na zona intertidal da praia do Quebrado, (39° 22.0263' N; 9° 22.43292' O), em Peniche, durante a maré baixa, tendo sido capturados manualmente um total de 11 indivíduos. Após a captura, os exemplares foram transportados para a empresa Riasearch, em baldes de plástico de 25L com arejamento contínuo, sem substrato e imersos em água salgada, sendo este o melhor método de acordo com Santos (2017). A água salgada para o transporte foi retirada do habitat natural.

O transporte demorou cerca de 3 horas e os baldes foram mantidos fechados, de modo a tentar preservar as condições iniciais. Foram também realizadas pequenas pausas para medir os parâmetros da água de transporte de forma a assegurar o sucesso deste. À chegada verificou-se 100% de sobrevivência, não tendo ocorrido nem lesões, nem evisceração dos exemplares sujeitos ao transporte.

Seguidamente todos os indivíduos foram pesados individualmente, tendo-se registado o peso médio (\pm SD) numa balança analítica de precisão (KERN, PFB 120-3) e distribuídos, de modo aleatório, em grupos de 6 e 5 indivíduos pelos 2 tanques *outdoor* de 373L cada, integrados num sistema de recirculação de água (RAS), com arejamento contínuo e substrato arenoso. A água antes de ser introduzida nos tanques experimentais passa por um conjunto de filtros mecânicos (filtro de areia e hidroejector) sendo posteriormente tratada por um *Protein Skimmer*, biofiltro, desgasificador de CO₂ e um filtro UV, como descrito anteriormente no circuito hidráulico da empresa.

Para a realização deste ensaio experimental, antes da chegada das holotúrias à empresa, os dois tanques experimentais foram abastecidos com água do furo, que se encontra a uma salinidade de 19‰, tendo sido adicionados gradualmente 12 Kg de sal (Premium Coral Salt Amino Active) até perfazer uma salinidade de 31‰, para dar início ao ensaio experimental.

Os parâmetros da água foram medidos diariamente e mantidos dentro dos limites adequados para a espécie com exceção da salinidade (intencional) e temperatura, uma vez que se trata de um sistema não controlado (*outdoor*). Utilizou-se, para esse efeito, uma sonda multi-paramétrica portátil (HANNA instruments, Portugal) para os parâmetros de temperatura (°C), oxigénio dissolvido (O₂), salinidade e pH e *kits* de testes rápidos colorimétricos (PRODAC NH₃/NH₄ Test Kit e PRODAC NO²⁻ Test Kit) para a amónia, nitratos e nitritos (NH₃, NO³⁻ e NO²⁻). A temperatura média durante o ensaio foi de 13,20±0,83 °C, do oxigénio dissolvido (O₂), 8,94±0,86 mg/L, do pH 8,15±0,25, sendo o limite máximo estabelecido para a concentração de amónia, nitritos e nitratos (NH₃, NO²⁻ e NO³⁻) de 0,25 mg/L (Santos, 2017).

O ensaio teve uma duração de 16 dias e consistiu em baixar diariamente e gradualmente a salinidade 1‰/dia até alcançar a salinidade 19‰, renovando cerca de 18% do total da água dos tanques através da introdução de água do furo. Ao longo do ensaio experimental os indivíduos foram alimentados 1 vez ao dia, com uma mistura de três microalgas - *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis sp.* fornecida *ad libitum* por volta das 17:00h, a uma concentração de 1,5 x 10⁵ células mL⁻¹, em igual proporção das várias espécies. A escolha das microalgas teve por base o seu elevado valor nutricional e distribuição geográfica, de forma que a alimentação administrada às holotúrias fosse o mais semelhante possível ao seu habitat natural.

Este ensaio teve como finalidade ver a adaptação da espécie em estudo à salinidade da empresa e serviu como um pré-ensaio para o ensaio de crescimento realizado posteriormente.

4. Resultados

4.1 Influência e tolerância à salinidade

Ao longo da experiência houve uma resposta perceptível e uniforme por parte das holotúrias à diminuição da salinidade.

O peso húmido inicial de todos os indivíduos foi registado e encontra-se disponível na Tabela 1.

Tabela 1- Peso húmido inicial e peso médio total (g) das holotúrias (média±DP).

	Número de exemplares	Peso Inicial (g)	Peso médio inicial (g)
Tanque 1	1	36,5	158,4±64,55
	2	178,5	
	3	220,7	
	4	188,6	
	5	143,7	
	6	182,1	
Tanque 2	1	174,4	189,5±16,74
	2	209,5	
	3	199,2	
	4	170,1	
	5	194,3	
Total	11	172,5±47,29	

No início do ensaio experimental as holotúrias encontravam-se nas laterais dos tanques. No entanto, à medida que se foi diminuindo a salinidade, sensivelmente a partir de 23‰, verificou-se que no Tanque 1 e no Tanque 2, cerca de 67% e 80% (4 indivíduos) das holotúrias se tinham deslocado para o substrato, não havendo praticamente fezes no sedimento.

Ao atingir os 21‰, as holotúrias já se encontravam todas no substrato, encontrando-se parcialmente enterradas. Nesta mesma salinidade, evisceraram 4 holotúrias no total, 3 no Tanque 1 (50%) e 1 no Tanque 2 (20%), atingindo mesmo a evisceração completa (expulsando as gónadas e outros órgãos), tendo ocorrido a morte de um indivíduo.

Ao alcançar a salinidade pretendida (19‰), a da água do furo da empresa, todas as holotúrias já se encontravam praticamente enterradas no sedimento e evisceradas, claramente stressadas, exibindo movimentos erráticos, tendo sido desta forma o ensaio experimental dado por terminado.

Na Tabela 2 encontra-se um resumo da mortalidade e eviscerações ao longo do ensaio experimental.

Tabela 2- Resumo de mortalidades e eviscerações ao longo do ensaio.

	Exemplares	Salinidade	Eviscerados	Mortalidade	Observações
Tanque 1	6	31	0	---	Todas nas laterais dos tanques
	6	23	0	---	67% das holotúrias estão no sedimento
	5	21	3	1	Todas as holotúrias no sedimento e 3 evisceradas
	5	19	5	---	Todas no sedimento enterradas e evisceradas
Tanque 2	5	31	0	---	Todas nas laterais dos tanques
	5	23	0	---	80% das holotúrias estão no sedimento
	5	21	1	---	Todas as holotúrias no sedimento e 1 evisceradas
	5	19	5	---	Todas no sedimento enterradas e evisceradas

5. Discussão de resultados

5.1 Tolerância e influência da espécie *Holothuria forskali* à salinidade

A salinidade é um factor abiótico importante que regula o crescimento, a sobrevivência e a produção dos organismos marinhos.

Binyon (1966) identificou os equinodermes como organismos estenohalinos devido à ausência de grandes tecidos epidérmicos, impedindo desta forma, a interação com condições ambientais adversas e o desenvolvimento de órgãos diferenciais capazes de fornecer a capacidade de osmorregulação. Da mesma forma, tem sido relatado na literatura que as taxas de mortalidade aumentam em pepinos-do-mar stressados devido a grandes mudanças na salinidade e temperatura (Mackey, 2004). Um estudo realizado por Tolon (2017), revelou que as espécies *Holothuria tubulosa* e *Holothuria poli* não foram capazes de se adaptar à salinidade 25‰, ocorrendo uma mortalidade de 60% em ambas as espécies no final da primeira semana da experiência. Sendo esta mesma salinidade, considerada como o limite letal para estas duas espécies, como também para outras espécies de pepinos-do-mar, o que não se verificou no presente estudo.

Mercier (1999) menciona que a diminuição de 35 para 30‰ e de 25 para 20‰, leva a que os juvenis da espécie *Holothuria scabra* se desloquem das paredes dos tanques de

cultivo para o substrato, com a finalidade de se enterrarem no sedimento, acabando por reemergir após algumas horas. Neste mesmo estudo, a aclimação ocorreu mais rapidamente na salinidade 30‰, sendo mais lenta na salinidade 20‰. Por outro lado, mais de 40% dos juvenis não foram capazes de lidar com uma diminuição da salinidade para 15‰.

Embora os resultados obtidos no ensaio, sugeriram uma moderada adaptabilidade da espécie *H. forskali*, esta não aponta para uma preferência por baixas salinidades.

Até 23‰ as holotúrias apresentaram uma boa adaptabilidade. A partir daí, mais de metade das holotúrias em ambos os tanques já se encontravam no sedimento não havendo praticamente fezes no substrato, ou seja, a alimentação e o comportamento da espécie foram perturbados. Portanto, conclui-se que à semelhança dos resultados obtidos por Mercier (1999), as holotúrias, com a diminuição da salinidade reagem rapidamente ao se enterrarem no sedimento, podendo este facto ser justificado como uma defesa, de forma a equilibrar as concentrações iónicas do fluido celómico.

Com a realização deste ensaio, concluiu-se que a salinidade do furo da empresa não seria a ideal para a realização do ensaio de crescimento.

V. Ensaio 2- Avaliar a influência de duas dietas na taxa de crescimento e sobrevivência da espécie *Holothuria forskali*

6. Materiais e métodos

6.1 Captura, transporte e manutenção

O ensaio experimental teve uma duração de aproximadamente 6 semanas (42 dias), tendo sido realizado na empresa Riasearch, entre o período de 28 de março e 8 de maio de 2018. Foram selecionadas aleatoriamente holotúrias com um peso compreendido entre as 22-73g.

Em março de 2018, realizou-se uma amostragem através da prática de mergulho autónomo, a uma profundidade entre 5 e 10 metros, na praia do Quebrado, (39° 22.0263' N; 9° 22.43292' O), em Peniche (Portugal), tendo sido capturados um total de 92 indivíduos. Os exemplares foram transportados para o Centro de I&D, Formação e Divulgação do Conhecimento Marítimo (Edifício CETEMARES), em baldes de plástico de 25 L, com arejamento contínuo, sem substrato e imersos em água salgada, sendo este o melhor método mencionado por Santos (2017) para o transporte destes organismos.

Dos 92 exemplares capturados, foram retirados 2 indivíduos para a análise bioquímica, tendo sido conservados a -80°C até ao seu processamento.

Os exemplares capturados permaneceram no CETEMARES, durante 24 horas até serem transportados para a empresa Riasearch, por uma transportadora licenciada para o efeito. A água utilizada para o transporte foi proveniente do depósito de armazenamento de água do CETEMARES, estando esta a uma salinidade e temperatura o mais próximo possível ao seu habitat natural.

Ao longo do transporte foram realizadas pequenas paragens para medir os parâmetros da água com uma sonda multi-paramétrica de forma a assegurar o sucesso deste. O intervalo de tempo entre a saída do Edifício Cetemares até à empresa foi aproximadamente 4:30 horas. À chegada verificou-se 100% de sobrevivência, não tendo ocorrido nem lesões, nem evisceração dos exemplares sujeitos ao transporte.

Precedentemente à chegada das holotúrias foram adicionados gradualmente aos tanques experimentais 40 Kg de sal (Premium Coral Salt Amino Active) até perfazer a salinidade desejada.

Após chegada à empresa, todos os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 15 indivíduos ($n=90$), pelos 6 tanques de fibra *outdoor* de 373L cada e aclimatados durante 1 semana, de modo a serem integrados num sistema de recirculação (RAS), com arejamento contínuo e substrato arenoso. Todos os tanques experimentais foram preenchidos com uma mistura de areias de quartzito, quartzo e feldspato natural esmagados com diferentes tamanhos de grão (1 mm e 2mm) (AREIPOR, APAS 20 e APAS 30), com uma altura de cerca de 10 cm, sendo esta a altura ideal para promover o crescimento da espécie *Holothuria tubulosa*, segundo Tolon *et al.*, (2015). Este mesmo substrato foi substituído a cada 14 dias, ao longo de todo o ensaio experimental, de forma a manter continuamente a matéria orgânica presente no substrato. Ao longo do período de aclimação os indivíduos foram alimentados 1 vez ao dia *ad libitum*, com a dieta A (Tabela 6), por volta das 17:00h, para terem uma composição bioquímica inicial e atividade física similar entre todos os indivíduos experimentais.

Os parâmetros da qualidade da água foram medidos diariamente de manhã, à tarde e ao final do dia e mantidos dentro dos limites adequados para a espécie (Santos, 2017) com exceção da temperatura que sofreu flutuações, uma vez que se trata de um sistema não controlado (*outdoor*). Utilizou-se, para esse efeito, uma sonda multi-paramétrica portátil (HANNA instruments, Portugal) para os parâmetros de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigénio dissolvido (O_2), salinidade e pH e *kits* de testes rápidos colorimétricos (PRODAC NH_3/NH_4 Test Kit e PRODAC NO_2^- Test Kit) para a amónia, nitratos e nitritos (NH_3 , NO_3^- e NO_2^-).

Os parâmetros de qualidade da água ao longo do ensaio, encontram-se resumidos na Tabela 3, sendo o limite máximo estabelecido para o valor da concentração de amônia, nitritos e nitratos (NH_3 , NO_2^- e NO_3^-) de 0,25 mg/L (Santos, 2017).

Tabela 3- Parâmetros de qualidade da água ao longo de todo o ensaio (média±DP).

Parâmetro	Valores
pH	8,16 ± 0,12
Amônia (NH ₃)	0 ≥ 0,25 mg/L
Nitritos (NO ₂ -)	0 ≥ 0,25 mg/L
Nitratos (NO ₃ -)	0 ≥ 0,25 mg/L
Temperatura	14,67 ± 0,83 °C
Salinidade	33,08 ± 0,94 ‰
Oxigênio dissolvido	7,90 ± 0,57 mg/L

6.2 Constituição das dietas

Foram fornecidas duas dietas ao longo do ensaio experimental, a dieta A constituída por uma mistura de três microalgas liofilizadas (PhytoBloom, NECTON) nomeadamente, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis sp.* e *Phaeodactylum triconutum* a uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL, em igual proporção das várias espécies (Battaglene *et al.*, 2002). A dieta B foi constituída por fezes e alimento não consumido de camarões da espécie, *L. vannamei*, a quantidade de alimento fornecida foi 5% da biomassa total por tanque (Dong *et al.*, 2010). Os camarões produzidos na empresa utilizados no ensaio experimental foram alimentados com ração (WINFLAT). A composição geral da dieta A encontra-se na Tabela 4 e a composição da ração WINFLAT, encontra-se na Tabela 5.

Tabela 4- Composição geral da dieta A, constituída por uma conjugação de três microalgas (Fonte: Necton, S.A.).

Dieta	Composição geral			
	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Hidratos de carbono (%)	Ácidos gordos essenciais
<i>Tetraselmis sp.</i> (1)	42-47	7-12	5-12	EPA; ARA; ALA
<i>Isochrysis galbana</i> (2)	41-46	20-23	17-19	DHA
<i>Phaeodactylum triconutum</i> (3)	25-30	---	4-9	EPA

Nota: Composição geral (dwt%) **1)** Fibra: 0-1; Rico em ómega 3, ácidos gordos (EPA, ARA e ALA), vitaminas, aminoácidos, minerais e carotenoides; **2)** Rico em ómega 3, ácidos gordos (DHA), vitaminas, aminoácidos, minerais e carotenoides; **3)** Gordura: 10-14; Rico em ómega 3, ácidos gordos (EPA), vitaminas, aminoácidos, minerais, carotenoides e silicatos.

Tabela 5- Composição da ração WINFLAT (Fonte: SPAROS).

Composição geral (%)							
	Proteína bruta	Gordura bruta	Cinza bruta	Fibra bruta	Fósforo total	Cálcio	Sódio
Ração	62	18	9	0,5	1,9	1,3	0,5

A preparação das microalgas consistiu na pesagem da quantidade correspondente à concentração referida anteriormente, seguidamente adicionava-se cerca de 500 mL de água do sistema e aguardava-se cerca de 15 minutos. Posteriormente procedia-se à mistura da preparação com uma varinha mágica até se formar uma espuma, seguida de 2 minutos para esta repousar. Relativamente à dieta B, a preparação consistiu na recolha diária de fezes e alimento não consumido. Seguidamente pesava-se a quantidade pretendida e triturava-se com o auxílio de uma varinha mágica até se formar uma mistura homogénea. A alimentação era administrada uma vez por dia às 17:00h.

6.3 Desenho experimental

As holotúrias foram sujeitas a um regime de jejum durante 24 horas, de forma a assegurar que libertassem a areia, alimentação e fezes provenientes do período de acondicionamento. Após as 24 horas, foram selecionados exemplares sem qualquer defeito visual na textura do corpo e pesados seguindo o método de pesagem húmida, como descrito por Dong *et al.*, (2006). Retiraram-se os indivíduos dos tanques de cultura e, posteriormente foram colocados numa esponja seca durante 1 min para remover o máximo possível da água externa dos corpos. Foram selecionadas 54 holotúrias com um peso médio corporal húmido de $51,29 \pm 13,86$ g (média \pm SD) e colocadas em igual número em 6 tanques de fibra com uma dimensão (72x72x72 cm) para formar 2 tratamentos em triplicado, o Tratamento 1 que corresponde às fezes+alimento não consumido e o Tratamento 2 que corresponde às microalgas (Figura 11). As holotúrias foram selecionadas de modo que os coeficientes de variação (CV) do peso tivessem valores o

mais próximo possível uns dos outros entre todos os tratamentos experimentais ($\leq 30\%$), proporcionando um conjunto de pesos o mais homogêneo possível. A densidade utilizada foi de aproximadamente $1,24 \text{ kg/m}^3$.



Figura 11- Desenho experimental do ensaio de crescimento (Fonte: Própria).

O sistema hidráulico do ensaio é considerado um sistema aberto, onde a água não é reutilizada em todo o circuito da aquacultura, havendo uma renovação total da água diária nos tanques de cultivo, de forma a garantir que não ocorram misturas entre dietas e entre tratamentos.

A água utilizada para abastecer os tanques experimentais, foi proveniente de um ensaio nutricional com douradas que estava a decorrer na altura. Desta forma, aproveitou-se a salinidade da água do sistema das douradas, evitando a introdução de sal diariamente, o que se tornaria extremamente dispendioso. É importante mencionar que, antes da introdução de água nos tanques de cultivo das douradas, a água passa por uma série de processos, onde é tratada e filtrada como foi referido anteriormente no circuito hidráulico da empresa. Dos tanques de cultivo das douradas, a água é encaminhada para os tanques de cultivo das holotúrias. A água é conduzida para o depósito (1), onde está inserida uma bomba de captação (6480 L/h) que puxa a água para o depósito de cabeça (2), onde por gravidade é conduzida para os tanques.



Figura 12- Desenho experimental para o ensaio de crescimento. Número 1- Refere-se ao depósito 1; Número 2- Refere-se ao tanque de cabeça (Fonte: Própria).

6.4 Taxa de crescimento específico (SGR), Taxa de sobrevivência (SR), Ganho de peso médio (WG), Taxa de crescimento (GR) e Ganho de peso relativo (RWG)

As taxas de crescimento específico (SGR) e de sobrevivência (SR) foram calculadas como um indicador do desempenho de crescimento entre os grupos de tratamento. Foram realizadas amostragens de 2 em 2 semanas de forma a controlar o crescimento e a assegurar que os exemplares se encontravam saudáveis e sem qualquer defeito visual. A taxa de crescimento específico (SGR) e a taxa de sobrevivência (SR) foram calculadas da seguinte forma:

$$SGR (\% \text{ day}^{-1}) = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{T} \times 100$$

$$SR (\%) = \frac{N_f}{N_i} \times 100$$

Sendo que: **W₁** e **W₂** são o peso húmido inicial e final (g) das holotúrias em cada tanque experimental; **T** duração da experiência (dias); **N_f** e **N_i** são o número final e inicial de indivíduos em cada tratamento experimental.

De forma a avaliar com maior precisão o efeito dos dois tratamentos experimentais no desempenho do crescimento das holotúrias, foram calculados ainda o ganho de peso médio (WG), a taxa de crescimento (GR) e o ganho de peso relativo (RWG), tendo sido calculados da seguinte forma de acordo com Tolon (2016):

$$WG(g) = W_t - W_i$$

$$GR(\text{g/day}) = \frac{W_t - W_i}{T}$$

$$RWG(\%) = \frac{W_t - W_i}{W_i} \times 100$$

Sendo que: W_i e W_t são o peso húmido inicial e final (g) das holotúrias em cada tanque experimental (g); T = duração da experiência (dias).

6.5 Caracterização bioquímica

6.5.1 Quantificação da gordura total

Previamente à análise, foram abatidos 3 exemplares por tratamento, através de uma dissecação longitudinal (Figura 13) tendo sido feita a recolha integral do músculo reservando-o a -80°C durante 24 horas.



Figura 13- Exemplares de *Holothuria forskali* dissecados após o final do ensaio experimental (Fonte: Própria).

A quantificação do teor de gordura foi determinada pelo método de extração e purificação lipídica Bligh & Dyer. Segundo Bligh & Dyer (1959), para esta análise, é necessário pesar 5g da amostra numa balança analítica (Mettler Toledo, $d=0.1\text{mg}$) e adicionar 4 ml de água e dois solventes para extração dos lípidos nomeadamente 15 ml de metanol:clorofórmio (2:1) (90ml metanol/45 ml clorofórmio), e homogeneizar posteriormente a amostra durante 5 minutos (caso nos 5 minutos a solução com a amostra não ficar esbranquiçada continuar no vortéx). Após agitação no vortéx, foram

adicionados mais 2ml de uma solução saturada de cloreto de sódio em agitação contínua, 5 ml de clorofórmio e 5 ml de água. A mistura foi homogeneizada durante 5 minutos. Os tubos de Falcon contendo a solução foram submetidos a centrifugação

(Centrifuge 5804R, Eppendorf) para separação de fases, tendo sido obtidas 3 fases. O conteúdo existente foi filtrado através de papel de filtro e o filtrado foi transferido para uma ampola de decantação. A fase orgânica (fase inferior) foi recolhida para um papel de filtro com sulfato de sódio anidro e filtrado para um cadinho previamente pesado. O solvente orgânico existente na mistura foi evaporado num evaporador rotativo (LABOROTA 4000, Heidolph) à temperatura máxima de 40°C. Após evaporação, o conteúdo lipídico na amostra, expressa em percentagem em massa, é determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Teor de gordura total} = \frac{P_f - P_i}{P_a} \times 100$$

Sendo que: **P_i** e **P_f** correspondem ao peso do cadinho inicial e final (gramas); **P_a** corresponde ao peso da amostra (gramas);

6.5.2 Caracterização do perfil lípidos

Foi necessário extrair cerca de 15 mg de gordura bruta resultante da extração descrita acima e utilizados seguidamente para a quantificação do perfil lipídico. A estes 15 mg de gordura foram adicionados 5mL de reagente de metilação (20 ml metanol: 1 ml cloreto de acetilo) e seguidamente foram aquecidos a 80°C durante 1 hora. Posteriormente adicionou-se 1mL de água MiliQ e 2mL de n-heptano e colocou-se a centrifugar durante 5 min a 1500rpm. Finalizando este processo recolheu-se o sobrenadante para os *vials* com *micro-insert* (*Thermo Unicam*). Por fim, os *vials* foram colocados no *TraceGC Ultra* com *Autosampler AS 3000* da marca *Thermo Electron Corporation* ultra onde o conteúdo lipídico existente nas amostras é analisado através de uma técnica de cromatografia gasosa (GC).

6.6 Caracterização histológica

6.6.1 Amostragem biológica e determinação do Índice Gonadossomático

No final do período experimental, um exemplar por tanque foi pesado individualmente, numa balança analítica de precisão (KERN, PFB 120-3) e, posteriormente, sacrificados através de um corte longitudinal ao longo de todo o corpo. Posteriormente pesou-se as respetivas gónadas quando presentes. Estas foram recolhidas e fixadas em formol tamponado a 10%, durante 48 horas, até serem sujeitas a desidratação e incluídas em parafina. O Índice Gonadossomático (GI) encontra-se expresso na seguinte equação (Benítez-Villalobos *et al.*, 2013):

$$GI = \frac{Pg}{P_{total} - Pg} \times 100$$

Sendo que: **Pg** corresponde ao peso da gónada (g); **Ptotal** corresponde ao peso total do indivíduo (g), incluindo as vísceras e a gónada (g).

6.6.2 Análise histológica

Após o período de 48 horas em formol tamponado a 10%, as amostras (gónadas) foram colocadas no processador de tecidos (Leica-TP 1020) onde sofreram um processo de desidratação com uma série de passagens sucessivas em álcoois (C₂H₆O) de concentrações crescentes para remoção da água dos tecidos, de seguida as amostras passaram pelo xilol para remoção do álcool presente. Findo o período decorrente da desidratação, as amostras foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos foram realizados no micrótomo (Sakura® Accu-Cut® SRM™ 200), com uma espessura entre 5 a 7 µm, as lâminas com os cortes foram colocadas na estufa (Binder) a 35°C durante pelo menos 24 horas. Tendo depois sido coradas comestavam preparadas para a coloração, com os corantes hematoxilina-eosina e observou-se cada preparação ao microscópico com câmara fotográfica (Leica DM 2000 LED + Leica MC 170 HD) para determinar verificar a presença de oócitos e espermátócitos e por sua vez determinar o estado de maturação das gónadas.

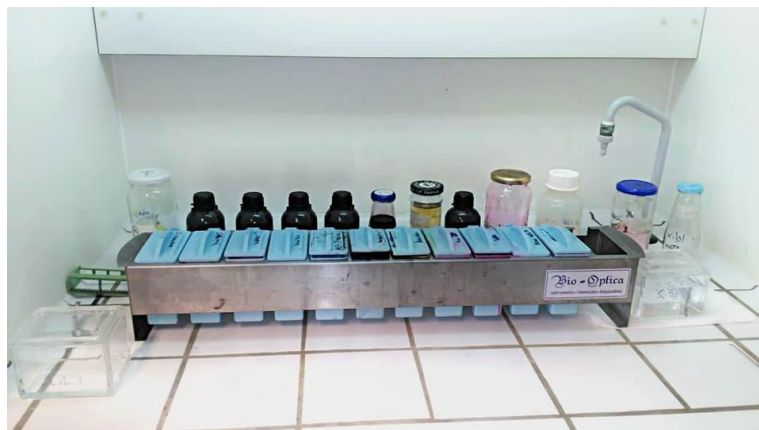


Figura 14- Coloração dos cortes histológicos (Fonte: Própria).

Os registos foram efetuados de acordo com a técnica realizada por outros autores (Sewell e Bergquist 1990; Tuwo e Conand 1992; Ramofafia *et al.*, 2000), sendo que constou na identificação dos estádios de maturação de acordo com os 5 estádios de gametogénese e espermatogénese já pré-estabelecidos: indeterminado (I), crescimento (II), maturo (III), parcialmente desovado (IV) e desovado (V).

7. Análise estatística

Com o objetivo de avaliar a influência dos dois tratamentos em estudo no peso húmido final e inicial, bem como nos parâmetros de crescimento avaliados, realizou-se o teste paramétrico *t-student* (Zar, 2010). Todos os pressupostos (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Sempre que aplicável os resultados são expressos na forma de média \pm desvio-padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 5% (ou seja, sempre que *p-value* <0,05). Todos os cálculos inerentes à análise estatística foram efetuados com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics 25.

8. Resultados

8.1 Crescimento, taxa de crescimento específico e sobrevivência

Na Tabela 6, estão apresentados os resultados obtidos, referentes aos valores dos pesos húmidos iniciais e finais (médios) e as respetivas biomassas no início e final do ensaio.

Tabela 6- Pesos húmidos iniciais e finais e biomassa da espécie *H.forskali* nos dois tratamentos experimentais.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Biomassa inicial (g/m³)	Biomassa final (g/m³)
Tratamento 1 (Peso médio)	51,53 ± 0,85	60,07 ± 6,00	463,7 ± 7,62	278,7 ± 26,41
Tanque 1	52,33 ± 12,68	61,78 ± 11,31	471,0	308,9
Tanque 2	51,60 ± 14,44	53,40 ± 18,24	464,4	267,0
Tanque 3	50,64 ± 13,16	65,03 ± 6,55	455,8	260,1
Tratamento 2 (Peso médio)	51,07 ± 1,24	66,19 ± 26,41	459,6 ± 11,14	309,7 ± 47,47
Tanque 4	50,34 ± 14,04	66,02 ± 9,19	453,1	330,1
Tanque 5	52,50 ± 12,19	68,70 ± 10,13	472,5	343,5
Tanque 6	50,37 ± 14,86	63,85 ± 13,71	453,3	255,4

(1) Valores (média±D.P para os triplicados e entre tanques experimentais).

Como é possível observar, houve um incremento do peso das holotúrias nos dois tratamentos experimentais. Porém, no que diz respeito aos valores da biomassa, constata-se que ocorreu uma diminuição desta nos dois tratamentos.

Na Figura 15 e 16, é possível observar a representação gráfica da mortalidade, diária e total dos indivíduos ao longo do ensaio, em cada tanque experimental. Como se pode verificar, no tanque 3 e 6 foi onde ocorreu uma maior mortalidade, 5 indivíduos/tanque, enquanto que nos restantes tanques (1,2,4 e 5) a mortalidade foi de 4 indivíduos/tanque (Figura 15).

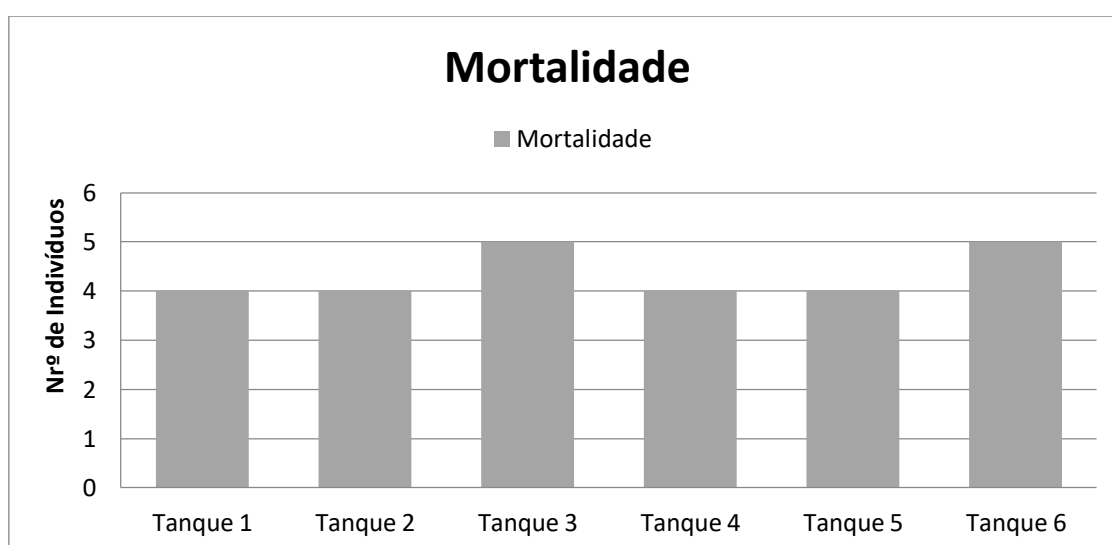


Figura 15- Representação gráfica da ocorrência de mortalidade, em cada tanque experimental ao longo do ensaio.

Relativamente à mortalidade diária, através da análise da Figura 16, é possível observar que ocorreu uma mortalidade contínua do dia 20 de abril ao dia 28 de abril.

É importante mencionar que ao longo do ensaio foram observadas holotúrias com ulcerações na pele, em todos os tanques experimentais.

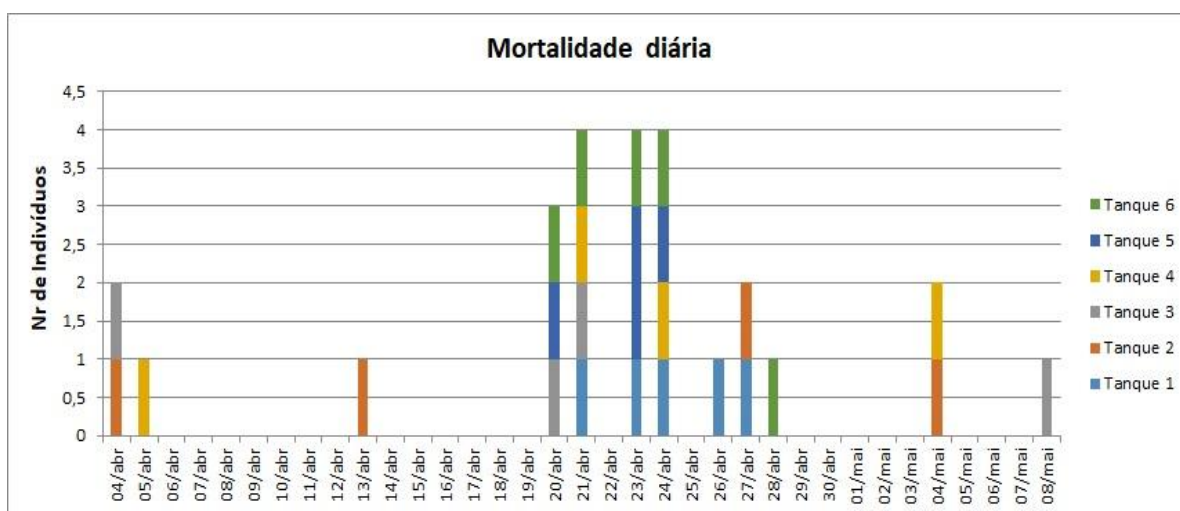


Figura 16- Mortalidade diária ao longo do ensaio, em cada tanque experimental.

Na Tabela 7, estão representados os valores relativos às taxas de crescimento específico (SGR) e de sobrevivência (SR) dos animais nos diferentes tratamentos.

Tabela 7- Taxa de crescimento específico (SGR) e taxa de sobrevivência (SR) nos dois tratamentos experimentais para o ensaio de crescimento de *H. forskali* (1).

	Taxa de crescimento específico (%/dia)	Taxa de sobrevivência (%)
Tratamento 1 (Peso médio)	0,37 ± 0,26	52
Tanque 1	0,40	56
Tanque 2	0,08	56
Tanque 3	0,60	44
Tratamento 2 (Peso médio)	0,62 ± 0,05	52
Tanque 4	0,65	56
Tanque 5	0,64	56
Tanque 6	0,56	44

(1) Valores (média ± D.P para os triplicados e entre tanques experimentais).

As taxas de sobrevivência obtidas no ensaio para a espécie, *H. forskali*, foram de 52% em ambos os tratamentos.

No que diz respeito às taxas de crescimento específico, os resultados demonstram que o Tratamento 2 ($0,62 \pm 0,05\%/dia$) obteve valores superiores comparativamente ao Tratamento 1 ($0,37 \pm 0,26\%/dia$), respetivamente.

O valor máximo obtido para o SGR foi no Tratamento 2, tendo alcançado um crescimento diário de $0,65\%/dia$ (tanque 4). Por outro lado, o valor mínimo obtido foi no Tratamento 1, tendo alcançado um crescimento diário de $0,08\%/dia$ (tanque 2).

Em relação a este parâmetro, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (*t-student*, $t_{(4)}=-1,666$, $p\text{-value}=0,171 > 0,05$) quando comparados os dois tratamentos experimentais (Figura 17).

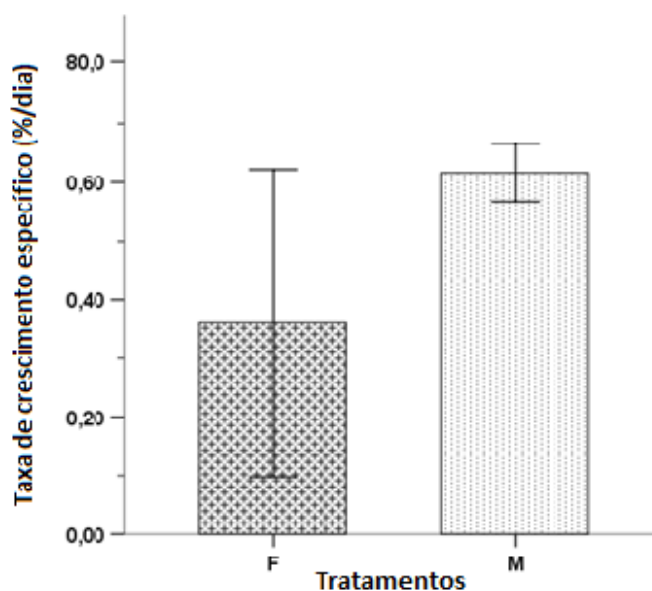


Figura 17- Comparação das taxas de crescimento específico (SGR) entre os tratamentos. Os valores são expressos na forma (média±DP).

Dado o exposto, os resultados demonstram que, apesar do Tratamento 2 apresentar um maior crescimento diário comparativamente ao Tratamento 1, tal informação não tem suporte estatístico.

De acordo com o que se pode observar na Tabela 8, ao longo do ensaio experimental e das amonstragens realizadas (em anexo), as holotúrias, obtiveram sempre um crescimento progressivo, através do seu incremento no peso, não tendo ocorrido nunca a sua perda.

Tabela 8- Ganho de peso médio (WG), taxa de crescimento (GR) e ganho de peso relativo (RWG) dos exemplares relativamente ao ensaio de crescimento com a espécie *H. forskali*.

	Ganho de peso médio (g)	Taxa de crescimento (g/dia)	Ganho de peso relativo (%)
Tratamento 1	8,55 ± 6,34	0,20 ± 0,15	16,60 ± 12,53
Tanque 1	9,47	0,23	22,55
Tanque 2	1,80	0,04	4,29
Tanque 3	14,39	0,34	34,26
Tratamento 2	15,12 ± 1,44	0,36 ± 0,03	29,61 ± 2,45
Tanque 4	15,68	0,37	37,33
Tanque 5	16,20	0,39	38,57
Tanque 6	13,48	0,32	32,10

O Tratamento 2 obteve um ganho de peso médio (WG) de $15,12 \pm 1,44$ g e o Tratamento 1 de $8,55 \pm 6,34$ g, durante os 42 dias experimentais. Sendo que, o Tratamento 2 obteve praticamente o dobro do peso do Tratamento 1.

Outro indicador de crescimento é a taxa de crescimento (GR), tendo sido alcançado o maior valor no Tratamento 2, $0,36 \pm 0,03$ g/dia e o menor valor no Tratamento 1, $0,20 \pm 0,15$ g/dia.

Relativamente ao ganho de peso relativo (RWG), este indicou um crescimento de $29,61 \pm 2,45\%$ dos indivíduos no Tratamento 2. No Tratamento 1 o RWG foi tendencialmente inferior ao Tratamento 2, tendo sido alcançado um crescimento de $16,60 \pm 12,53\%$ no peso das holotúrias sujeitas a esta dieta experimental.

Em relação ao efeito dos dois tratamentos no peso húmido inicial e final, os resultados obtidos evidenciaram não existirem diferenças estatisticamente significativas (*t-student*, $t_{(52)}=-0,128$, $p\text{-value}=0,899>0,05$; $t_{(26)}=-1,479$, $p\text{-value}=0,151>0,05$). É possível observar uma equidade nos pesos húmidos iniciais em ambos os tratamentos no início do ensaio experimental (Figura 18a). Sendo que, em relação ao peso húmido final, verifica-se uma ligeira superioridade no crescimento dos indivíduos no Tratamento 2 (microalgas) relativamente ao Tratamento 1 (fezes e alimento não consumido) (Figura 18b).

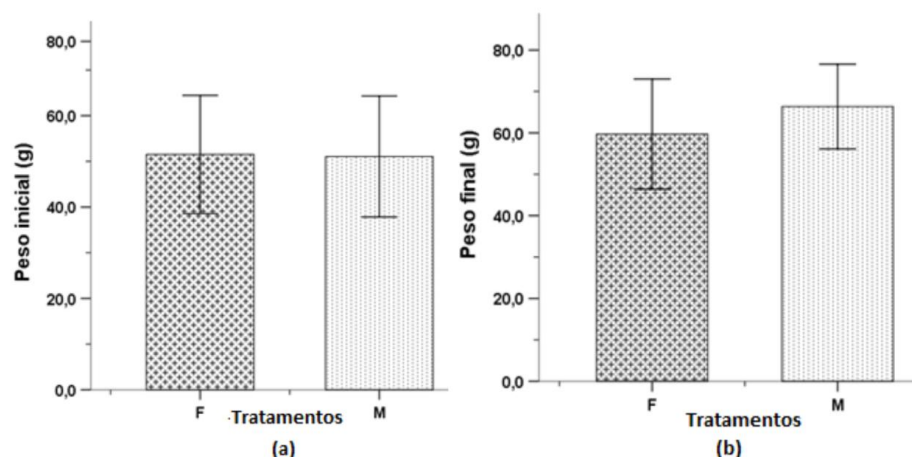


Figura 18- Comparação dos pesos húmidos finais (a) e iniciais (b) médios entre os tratamentos. Os valores são expressos na forma (média±DP).

8.2 Teor de gordura e perfil lipídico

Na Tabela 9, é possível observar os valores referentes às análises bioquímicas efetuadas para quantificar o teor de gordura total no músculo das holotúrias, selvagens (padrão), no Tratamento 1 e no Tratamento 2.

Tabela 9- Teor de gordura total (%) presente no músculo das holotúrias nos tratamentos experimentais, com os respetivos valores de média ± DP.

Tratamento	Gordura total (%)
Selvagens (Padrão)	0,69 ± 0,74
Tratamento 1	0,14 ± 0,01
Tratamento 2	0,12 ± 0,02

Os valores obtidos para o teor de gordura total para os selvagens foram de 0,69 ± 0,74%, para o Tratamento 1, 0,14 ± 0,01% e para o Tratamento 2, 0,12 ± 0,02%, respetivamente.

De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que os dois tratamentos experimentais, apresentam valores tendencialmente inferiores para o teor de gordura total, comparativamente aos selvagens (padrão).

A Tabela 10 apresenta o teor de ácidos gordos presentes no músculo para as holotúrias nos dois tratamentos e nos selvagens. Como é visível, nos Tratamentos 1 e 2, o grupo de ácidos gordos presentes em maior quantidade são os ácidos gordos saturados (Σ SFA), apresentando valores, respetivamente, $61,31 \pm 15,01\%$ e $55,06 \pm 4,39\%$.

Relativamente aos selvagens é possível observar que o grupo de ácidos gordos em maior quantidade diz respeito aos ácidos polinsaturados (Σ PUFA), com valor de $61,45 \pm 6,48\%$. Além disso, apresenta em relação aos restantes tratamentos, valores tendencialmente superiores tanto de ácidos polinsaturados, como de monoinsaturados (Σ MUFA) incluindo os $\omega 3$ e $\omega 6$, com exceção dos ácidos saturados com uma quantidade de $33,56 \pm 8,00\%$.

No que diz respeito à razão $w3/w6$ os valores obtidos nos dois tratamentos e nos selvagens foram semelhantes entre si, correspondendo o maior valor ao Tratamento 2, $0,68 \pm 0,46\%$.

Tabela 10- Teor de ácidos gordos no músculo (%) das holotúrias nos dois tratamentos e nos selvagens, com os respetivos valores de média \pm DP.

	Selvagens	Tratamento 1	Tratamento 2
Ácidos gordos	Média (%)	Média (%)	Média (%)
Saturados	$33,56 \pm 8,00$	$61,31 \pm 15,01$	$55,06 \pm 4,39$
Monoinsaturados	$2,64 \pm 0,65$	$1,47 \pm 0,13$	$1,81 \pm 0,06$
Polinsaturados	$61,45 \pm 6,48$	$35,94 \pm 3,77$	$42,47 \pm 4,52$
Ómega 3 ($w3$)	$18,65 \pm 4,06$	$10,05 \pm 2,18$	$15,47 \pm 3,40$
Ómega 6 ($w6$)	$34,19 \pm 0,15$	$20,92 \pm 4,58$	$22,67 \pm 5,56$
$w3/w6$	$0,55 \pm 1,76$	$0,48 \pm 6,29$	$0,68 \pm 0,46$

A Tabela 11 apresenta a composição de cada um dos grupos de ácidos gordos identificados na Tabela 10, para as holotúrias em todos os tratamentos.

Tabela 11- Composição de ácidos gordos no músculo (%) das holotúrias nos dois tratamentos e nos selvagens, com os respetivos valores de média±DP.

		Selvagens	Tratamento 1	Tratamento 2
Ácidos gordos		Média (%)	Média (%)	Média (%)
SFA	C 16:0	13,28 ± 1,28	24,58 ± 4,74	23,14 ± 7,34
	C 18:0	19,78 ± 1,58	36,39 ± 5,16	31,92 ± 8,82
	C 22:0	0,51 ± 0,23	0,34 ± 0,47	N/D
MUFA	C 18:1 n9	0,67 ± 0,57	0,60 ± 0,28	N/D
	C 18:1 n7	1,97 ± 0,92	0,86 ± 0,44	0,85 ± 0,12
	C 18:4 n1	8,01 ± 0,91	4,97 ± 0,88	4,33 ± 1,24
	C 18:3 n3	0,72 ± 0,06	N/D	N/D
PUFA (Ómega 3)	C 18:4 n3	1,44 ± 0,18	1,16 ± 0,04	0,75 ± 1,05
	C 20:3 n3	1,66 ± 0,10	0,42 ± 1,60	0,50 ± 0,71
	EPA- C 20:5 n3	12,16 ± 1,42	6,33 ± 0,60	9,29 ± 3,51
	C 22:5 n3	1,37 ± 0,42	1,37 ± 0,65	0,68 ± 0,95
	DHA- C 22:6 n3	1,31 ± 0,25	0,76 ± 0,98	4,26 ± 1,82
	C 18:2 n6	N/D	0,10 ± 0,15	0,35 ± 0,16
PUFA (Ómega 6)	C 18:3 n6	0,92 ± 0,17	0,54 ± 0,24	0,41 ± 0,32
	ARA- C 20:4 n6	23,15 ± 1,31	14,32 ± 0,68	15,72 ± 3,98
	C 22:2 n6	7,28 ± 0,01	3,92 ± 1,98	4,73 ± 1,33
	C 22:3 n6	0,25 ± 0,16	0,09 ± 0,13	N/D
	C 22:5 n6	0,76 ± 0,59	0,44 ± 0,12	0,41 ± 0,20

Relativamente aos ácidos gordos saturados, o Tratamento 1 foi o que apresentou um maior teor de ácidos gordos, nomeadamente do ácido palmítico (C16:0) (24,58 ± 4,74%), do ácido esteárico (C18:0) (36,39 ± 5,16%) e do ácido beérico (C22:0) (0,34 ± 0,47%), embora este último em menor quantidade. No Tratamento 2 o ácido gordo identificado em maior quantidade foi o ácido esteárico (C18:0) com 31,92 ± 8,82%, enquanto os selvagens, obtiveram 19,78 ± 1,58% deste mesmo ácido.

O ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0) estão presentes em todos os tratamentos experimentais, enquanto que o ácido beérico apenas se encontra no Tratamento 1 e selvagens.

Relativamente aos ácidos monoinsaturados, os selvagens obtiveram valores mais elevados para este grupo de ácidos gordos, a maior abundância centra-se no ácido (C 18:4 n1) com $8,01 \pm 0,91\%$, valor este tendencialmente superior quando comparado com os $4,97 \pm 0,88\%$ e $4,33 \pm 1,24\%$ no Tratamento 1 e 2. Neste mesmo grupo, o ácido oleico (C 18:1 n9) encontra-se presente nos selvagens e no Tratamento 1 com uma quantidade $0,67 \pm 0,57\%$ e $0,60 \pm 0,28\%$, respetivamente.

Para o grupo dos ácidos gordos polinsaturados, verificou-se uma maior quantidade de $\omega 3$ (ómega-3) e $\omega 6$ (ómega-6) nos selvagens, com algumas exceções. No que diz respeito aos $\omega 3$, o ácido gordo alfa-linolénico (C 18:3 n3) apenas se encontra presente nos selvagens com $0,72 \pm 0,06\%$.

Relativamente ao teor em ácidos gordos essenciais (EPA e DHA), os selvagens apresentaram maior quantidade do ácido eicosapentaenóico (C 20:5 n3- EPA), $12,16 \pm 1,42\%$. Por outro lado, o ácido docosahexanóico (C 22:6 n3- DHA), encontra-se em maior quantidade no Tratamento 2 ($4,26 \pm 1,82\%$), seguindo-se dos selvagens ($1,31 \pm 0,25\%$) e por último no Tratamento 1 ($0,76 \pm 0,98\%$).

Para os ácidos gordos polinsaturados $\omega 6$, o ácido que se apresenta em maior quantidade é o ácido gordo araquidónico (C 20:4 n6- ARA) com $23,15 \pm 1,31\%$ para os selvagens, $15,72 \pm 3,98\%$ para o Tratamento 2 e $14,32 \pm 0,68\%$ para o Tratamento 1.

Neste mesmo grupo, o Tratamento 2 apresenta maior quantidade do ácido gordo linoleico (C 18:2 n6), $0,35 \pm 0,16\%$, sendo que nos selvagens este ácido gordo não foi identificado.

8.3 Determinação do Índice Gonadossomático

Para a determinação do Índice Gonadossomático (GI) foram amostradas 6 holotúrias no total (1 holotúria por tanque), sendo que apenas 3 holotúrias continham gónada, pelo que foi impossível calcular o GI para os restantes exemplares. O GI foi calculado com o objetivo de avaliar o estágio de maturação sexual dos indivíduos no final do ensaio e está representado na Tabela 12.

Tabela 12- Índice Gonadossomático (GI) calculado para os exemplares submetidos ao ensaio experimental de crescimento para o Tratamento 1 e para o Tratamento 2.

Índice Gonadossomático (%)	
Tratamento 1	6,47
	5,04
Tratamento 2	4,68

É importante mencionar, que o peso das gónadas no Tratamento 1 foi ligeiramente superior ao Tratamento 2. Relativamente à cor observada nas gónadas, estas tinham uma cor salmão e branco transparente no Tratamento 1 e uma cor laranja claro, no Tratamento 2.

Através da análise dos cortes histológicos ao microscópio, foi possível identificar uma fêmea amostrada, onde os oócitos eram perceptíveis e dois machos com o lúmen preenchido com espermatozóides. Na Figura 19, é possível observar um dos estádios de oógenese: crescimento.

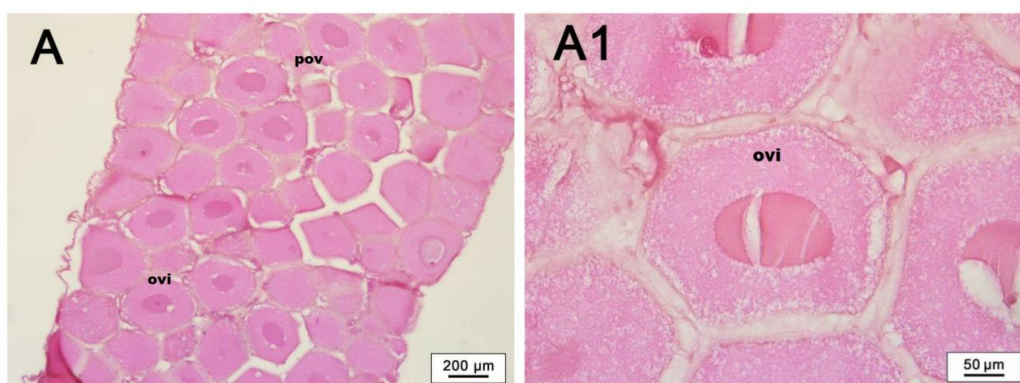


Figura 19- Observação do estágio de oógenese nas fêmeas de *Holothuria forskali*. Foto A e A1- Ovário com oócitos em crescimento.

É possível observar, na foto A a presença de oócitos em crescimento (primários e secundários), assim como os primeiros oócitos vitelogénicos (pov) e oócitos vitelogénicos intermédios (ovi).

Relativamente à espermatogénese, ou seja, ao desenvolvimento dos espermatozóides dos machos de *H. forskali*, na Figura 20 é possível observar 2 dos estádios de espermatogénese: crescimento (B), maturo (C).

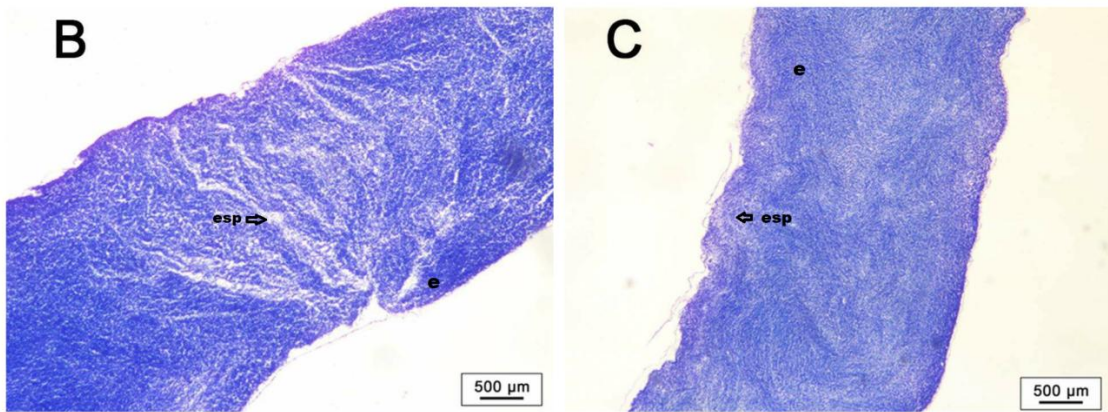


Figura 20- Observação dos estádios de espermatogênese nos machos de *Holothuria forskali*. Foto B- Estádio em crescimento; C- Estádio maturo.

Na Figura B, no estágio de crescimento, é possível observar espermatócitos (esp) em crescimento tardio, através da acumulação de espermatozoa (e) nos túbulos. Na Figura C, no estágio maturo, já se observa a presença de espermatozoa, através dos espermatócitos (esp) evidentes.

9. Discussão de resultados

9.1 Crescimento, taxa de crescimento específico e sobrevivência

Nos últimos anos, têm sido realizados esforços na aquisição de conhecimentos sobre o acondicionamento, potencial biotecnológico, análises sensoriais e biologia reprodutiva da espécie, *Holothuria forskali*, com a finalidade de implementar um sistema de produção desta espécie, eficaz e rentável (Chen, 2004, Santos *et al.*, 2015).

Existem muitos estudos nutricionais focados no crescimento de pepinos-do-mar tropicais (Hamel e Mercier, 1996; Wang *et al.*, 2008). No entanto, estudos nutricionais realizados em espécies temperadas, ainda são escassos (Santos, 2017).

Até à data, ainda não tinha sido realizado nenhum ensaio de crescimento com a espécie, *Holothuria forskali*, integrada num sistema IMTA, com a finalidade de reaproveitar os produtos de um efluente sem qualquer tipo de custo associado, de forma a verificar se este mesmo efluente promove eficazmente o crescimento saudável destes organismos. As taxas de sobrevivência são um indicador do estado de saúde dos indivíduos, assim como do desempenho no decorrer do ensaio. Os resultados deste estudo evidenciam que as holotúrias nos dois tratamentos, exibiram taxas de sobrevivência de 52%, em ambos.

Costa (2010) referiu num estudo relacionado com a sobrevivência e o crescimento do pepino-do-mar, *Holothuria grisea*, que obteve taxas de sobrevivência de 68% e 60%. Giraspy e Ivy (2008) mencionaram que as taxas de mortalidade (mais de 50%) de juvenis da espécie, *Holothuria scabra var. versicolor*, foram elevadas durante as primeiras três semanas em todos os tratamentos.

No entanto, os resultados obtidos neste estudo, não vão ao encontro da maioria dos resultados relatados em estudos anteriores semelhantes, com espécies diferentes. Anisuzzaman *et al.*, (2017), obteve taxas de sobrevivência de 100% para a espécie *Apostichopus japonicus*, num estudo relacionado com o efeito de diferentes algas na dieta sobre o crescimento, sobrevivência e interleucina-10. Hai-Bo *et al.*, (2015) num estudo relacionado com a alteração do perfil de ácidos gordos no pepino-do-mar, *Apostichopus japonicus*, através da inclusão de diferentes percentagens de plantas terrestres em diferentes dietas, obteve uma taxa de sobrevivência média de 87,5%.

Face aos resultados obtidos, existem diversos fatores que podem justificar as reduzidas taxas de sobrevivência apresentadas neste estudo. É de notar que os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos dentro dos limites considerados adequados (com exceção da temperatura) para a espécie (Santos, 2017) bem como, a

alimentação fornecida e o substrato adicionado aos tanques experimentais. Vários autores relataram que a temperatura teve efeitos significativos sobre as taxas de sobrevivência obtidas (Battaglione *et al.*, 1999a; Mercier *et al.*, 1999). Quando a temperatura se encontra abaixo ou acima da temperatura ótima de produção de uma determinada espécie, pode resultar numa taxa metabólica declinada ou acelerada, afetando diretamente a taxa respiratória, de alimentação e de assimilação (Landau, 1992), sendo que a temperatura ótima para o crescimento, bem como as tolerâncias térmicas, ainda são desconhecidas para a espécie em estudo.

Um estudo realizado por Santos *et al.*, (2017) demonstrou que a espécie, *Holothuria forskali*, obteve uma taxa de sobrevivência de 100% ao longo do condicionamento (6 meses), com a temperatura a variar entre os 16 e 18 °C.

No presente estudo, a temperatura média foi, $14,67 \pm 0,83$ °C, saindo um pouco do intervalo de temperatura estabelecido no estudo anterior. Porém, o facto do ensaio de crescimento, ter sido realizado num sistema *outdoor*, onde os pepinos-do-mar estão suscetíveis a passar por flutuações diárias de temperatura, pode ter interferido com as taxas de sobrevivência obtidas. Contudo, um estudo realizado por Dong *et al.*, (2006) demonstrou que a espécie, *Apostichopus japonicus*, obteve taxas de sobrevivência de 100% para holotúrias sujeitas a flutuações de temperatura de 15 (± 2) °C (obtendo valores máximos de SGR para esta mesma temperatura).

No entanto, uma vez que se trata de uma espécie tropical com características específicas e condições diferentes de condicionamento, nomeadamente: regime nutricional, localização geográfica, condições de cultivo e pesos dos indivíduos, nada se pode concluir.

Por estas razões, afigura-se pouco provável que o problema resida na temperatura, uma vez que os indivíduos aparentavam alimentar-se bem, revolvendo o fundo dos tanques com os seus tentáculos em forma de árvore, manifestando o seu típico comportamento alimentar, bem como era possível observar aquando da sifonagem, a presença de areia nas fezes, o que se refletiu no ganho de peso ao longo do ensaio. Sob o mesmo ponto de vista, se este parâmetro estivesse relacionado com a mortalidade observada, as holotúrias iriam manifestar episódios de *stress* contínuos (chegando mesmo à evisceração completa) e acabariam por gastar as suas reservas para combater esta adversidade, em vez de crescerem.

O excesso de carga orgânica nos tanques, ou seja, a possibilidade da quantidade de alimento administrado durante o ensaio não estar ajustado às necessidades nutricionais das holotúrias, pode ter comprometido a sobrevivência destas. O excesso de matéria orgânica (alimento não consumido), aumenta a concentração de nutrientes na água dos

tanques, que por sua vez, aumenta a proliferação de microrganismos aeróbios, que se alimentam destes mesmos nutrientes em excesso. O aumento da população destes microrganismos, leva a um grande consumo de oxigênio dissolvido na água, altera o pH, a qualidade da água e ainda toda a biota envolvente.

Costa (2010) mencionou que no início da experiência as elevadas mortalidades obtidas coincidiram com o excesso de matéria orgânica nesse período. Porém, uma vez que os parâmetros da água eram monitorizados diariamente, estando os valores sempre dentro dos limites adequados para a espécie, a água dos tanques era substituída diariamente e a quantidade das dietas administradas foram calculadas de acordo com a bibliografia, esta hipótese não parece constituir um argumento válido.

Por outro lado, a substituição da água diariamente, de forma a não ocorrerem misturas entre dietas, pode ter contribuído para as elevadas taxas de mortalidade, podendo provocar *stress* nos organismos. Embora a renovação integral da água dos tanques tenha sido sempre realizada de forma a minimizar possíveis situações de *stress* fisiológico, foi possível observar, por duas vezes, a evisceração de algumas holotúrias, evidenciando sinais evidentes de *stress*.

Como foi mencionado anteriormente e como é possível observar no gráfico da mortalidade diária (Figura 16), de dia 20 de abril a 28 de abril da experiência, a mortalidade aumentou substancialmente, tendo sido observadas ulcerações na epiderme das holotúrias pouco depois do início deste. Foi possível visualizar que sempre que se retirava um indivíduo morto dos tanques experimentais, a pele continha uma grande quantidade de muco e emanava um odor fétido.

As informações relativas a doenças bacterianas em holoturóides ainda são limitadas. No entanto, é frequentemente relatado que as diferentes espécies de holotúrias cultivadas podem sofrer de uma doença que afeta o tegumento (Morgan, 2000).

Morgan (2000), relata que existe apenas um único artigo que refere que um reprodutor da espécie, *Holothuria scabra*, sofria de uma doença bacteriana. A infecção envolveu a perda da pigmentação epidérmica associada à presença de grande quantidade de muco viscoso. Becker *et al.*, (2004) menciona ainda que juvenis da espécie, *Holothuria scabra*, manifestavam uma doença, nomeadamente, a doença da ulceração da pele. Esta é uma doença extremamente contagiosa e resulta de uma infecção bacteriana grave que causa a morte dos organismos dentro de 3 dias. O primeiro sinal da infecção é um ponto branco que aparece no tegumento dos indivíduos, perto da abertura cloacal. A infecção estende-se rapidamente para todo o tegumento, levando à morte dos organismos.

Os recentes "Avanços na Aquicultura e Manejo de Pepinos Marinhos" (ASCAM) afirmam que a ulceração da pele ou doenças relacionadas com esta, ocorrem em diferentes espécies, distribuídas pelo mundo todo. Esta doença foi registada na espécie, *Apostichopus japonicus*, na China, foi observada também na *Isostichopus fuscus* no Equador e na *Holothuria scabra* na Austrália e na Nova Caledónia. Sabe-se que a doença é causada por uma infeção bacteriana, mas o agente patogénico que inicia as ulcerações cutâneas ainda não foi identificado (Becker *et al.*, 2004).

No presente estudo, estas evidências foram comprovadas, nomeadamente o muco viscoso e a perda da pigmentação epidérmica dos indivíduos, sendo que estas constatações revelam fortes indícios que a mortalidade esteja relacionada com a contração de uma doença bacteriana.

Relativamente ao ensaio de crescimento, os resultados demonstram que, os dois tratamentos experimentais contribuíram eficazmente para o incremento da condição física das holotúrias, através do ganho de peso ao longo do ensaio experimental.

As três espécies de microalgas selecionadas, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis sp.* e *Phaeodactylum triconutum*, não só supriram as necessidades nutricionais dos organismos, como tiveram um efeito positivo no ganho de peso dos mesmos. Muitos autores consideram que a melhor forma de encontrar um equilíbrio nutricional em pepinos-do-mar na fase adulta, até mesmo em reprodutores, é fornecer um mix de microalgas (duas a três espécies), de forma a suprir as exigências nutricionais dos indivíduos (Chen, 2003; Ivy e Giraspy 2006).

No presente estudo, a utilização de microalgas liofilizadas parece ser uma dieta viável para incrementar o crescimento da espécie, *Holothuria forskali*. O processo de liofilização mantém as propriedades nutritivas dos alimentos, uma vez que não rompe as membranas celulares das proteínas e vitaminas. Contudo, implicam um enorme investimento por parte dos produtores e, conseqüentemente, um enorme prejuízo económico para as empresas.

O Tratamento 2, obteve um ganho de peso praticamente o dobro relativamente ao Tratamento 1, sendo o maior valor encontrado para a taxa de crescimento específico (SGR) no Tratamento 2 (0,65%/dia).

Este facto pode ser justificado pelo elevado valor proteico das microalgas administradas (>40%) e vai de encontro a estudos mencionados por diversos autores. Um estudo com base na *Apostichopus japonicus* (Zhu *et al.*, 2005) demonstrou que esta, manifestava um melhor crescimento quando alimentada com dietas contendo 18,21-24,18% de proteína (Zhu *et al.*, 2005), sendo o maior SGR obtido com níveis de proteína de 33% (Seo *et al.*, 2011). Chu Yuan e Appadoo (2007) também comprovaram este facto,

mencionando que o pepino-do-mar *Bohadschia marmorata* quando alimentado com um suplemento de proteína apresentou um melhor crescimento.

Por outro lado, Gunay *et al.*, (2014) num estudo relacionado com o efeito de várias temperaturas no crescimento e na taxa de sobrevivência de pepinos-do-mar da espécie, *Holothuria tubulosa*, alcançou um SGR de $0,288 \pm 0,02\%/dia$. Os indivíduos foram alimentados com algas marrom secas e em pó.

No que diz respeito ao Tratamento 1, o SGR obtido foi de $0,37 \pm 0,26\%/dia$, sendo este valor semelhante aos valores encontrados em estudos idênticos. Lavitra *et al.*, (2010) num estudo relacionado com o efeito da temperatura no crescimento da espécie, *Holothuria scabra*, em lagoas de terra, sem alimentação artificial, obteve um valor para o SGR de $0,25\%/dia$. Por outro lado, Zamora e Andrew (2012), obtiveram valores para o SGR de $0,71 \pm 0,05\%/dia$, em holotúrias da espécie, *Australostichopus mollis*, alimentadas com resíduos de mexilhão.

Estudos anteriores demonstram que o pepino-do-mar, *Apostichopus japonicus*, cresceu gradualmente quando inserido na natureza com fezes frescas de bivalves, obtendo valores para a taxa de crescimento de 0,17, 0,21 e 0,28 g/dia (Yuan, 2005). Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos neste ensaio para holotúrias com tamanhos de peso húmido iniciais, semelhantes ao do estudo em questão.

Yuan *et al.*, (2006b) realizou um estudo onde quantificou o crescimento da espécie, *Apostichopus japonicus*, em regime intensivo através da inclusão de cinco dietas diferentes. As cinco dietas utilizadas na experiência foram: dieta A- Fezes secas de bivalves; dieta B- 75% de fezes e 25% de algas em pó; dieta C- 50% de fezes secas e 50% de algas em pó; dieta D- 25% fezes secas e 75% de algas em pó; dieta E- Algas em pó.

Os resultados obtidos demonstraram que a dieta A (fezes secas), promoveu um crescimento negativo das holotúrias, com valores de SGR de $-0,66\%/dia$. Um dos motivos que pode justificar este resultado é o processo de secagem das fezes ($65^{\circ}C$ durante 36 horas), podendo ter removido todos os benefícios inerentes à dieta, inclusive bactérias, vitaminas e ácidos gordos. Como tal, esta dieta não foi adequada para pepinos-do-mar em cultivo intensivo. Uma razão para o Tratamento 1 ter obtido um SGR positivo e ter contribuído para os resultados obtidos, pode estar relacionado com a utilização de fezes frescas da espécie, *Litopenaeus vannamei*, não removendo todos os benefícios inerentes a esta dieta, promovendo o seu crescimento.

Contudo, as dietas mistas contendo fezes e algas em pó demonstraram resultados promissores para o cultivo da espécie *Apostichopus japonicus*. Sendo que, as holotúrias alimentadas apenas com algas em pó (dieta E), obtiveram um SGR de $1,31\%/dia$. Por

outro lado, as holotúrias alimentadas com dietas mistas (dieta B, C e D) obtiveram valores superiores de SGR. A dieta B (75% de fezes e 25% de algas em pó) foi a dieta que obteve o maior valor de SGR, 2,13%/dia.

Os valores obtidos para o SGR neste estudo, foram significativamente superiores aos alcançados no presente trabalho. O Tratamento 2 obteve um crescimento diário de $0,62 \pm 0,05\%$ /dia, sendo este valor bastante inferior à dieta E, 1,31%/dia. Tendo em conta que a duração do ensaio experimental para a espécie *Apostichopus japonicus* foi semelhante, assim como o peso médio inicial das holotúrias e uma vez que a dieta E possui um nível proteico bastante inferior à mistura de microalgas utilizadas durante o ensaio experimental, uma possível justificação poderá estar relacionada com algum parâmetro abiótico desajustado ou até mesmo com a biologia das próprias espécies em questão.

A substituição da água diariamente e do substrato a cada 14 dias, de forma a manter continuamente a matéria orgânica presente no substrato, pode ter contribuído para o incremento do peso das holotúrias. Um estudo realizado por Laxminarayana (2005) refere que, a substituição da água diariamente e do substrato a cada quinze dias, ao longo de todo o ensaio experimental, mantêm a matéria orgânica presente no substrato e proporciona uma melhor qualidade da água.

Outra justificação plausível para o incremento do peso nos dois tratamentos, poderá estar relacionada com a água proveniente do tanque das douradas, uma vez que esta, trazia consigo resíduos alimentares (matéria orgânica) que podem ter contribuído para o aumento deste.

Tendo em consideração estes resultados, é possível verificar que os valores obtidos para o SGR no presente estudo foram bastante satisfatórios, sendo as discrepâncias encontradas possivelmente justificadas por diferenças entre características das espécies em estudo, pesos e tipos de dietas administradas ao longo dos ensaios.

9.2 Teor de gordura total e caracterização do perfil de ácidos gordos

O músculo das holotúrias analisadas nos dois tratamentos experimentais e nas holotúrias selvagens, apresentaram valores muito baixos para a gordura total, nomeadamente, $0,69 \pm 0,74\%$ para os selvagens, $0,14 \pm 0,01\%$ para o Tratamento 1 e $0,12 \pm 0,02\%$ para o Tratamento 2, respetivamente. Sendo que, os selvagens apresentam um valor tendencialmente superior de gordura total comparativamente aos dois tratamentos experimentais.

Os resultados obtidos neste estudo são discrepantes dos resultados alcançados por Bilgin e İzci (2015), os autores obtiveram para a espécie, *Holothuria forskali*, uma

percentagem de gordura total inferior aos valores obtidos no presente estudo, $0.256 \pm 0.208\%$. Os exemplares neste estudo, foram capturados em Esmirna (Turquia), no mar Egeu, localizado no interior da bacia do mar Mediterrâneo.

Deste modo, as diferenças encontradas para este parâmetro, podem estar relacionadas com alterações sazonais no comportamento alimentar e variações geográficas (Chang – Lee *et al.*, 1989).

Por outro lado, em aquacultura, verifica-se que as espécies produzidas apresentam um teor de gordura mais elevado do que as selvagens, decorrente das rações fornecidas, da atividade física reduzida que desenvolvem durante a produção e da otimização das taxas de crescimento, o que leva a que a sua composição corporal tenda a ter um maior teor lipídico que as espécies selvagens (Ribeiro, 2011). Porém, não foi o que se observou nos resultados obtidos na análise bioquímica.

Uma possível justificação para os resultados obtidos pode estar relacionada com a altura do ano em que as holotúrias selvagens foram capturadas. As holotúrias foram capturadas no mês de março, numa altura em que houve excecionalmente uma forte agitação marítima em Peniche, sendo que estas, no meio natural, quando submetidas a condições marítimas adversas, tendem a refugiar-se debaixo das rochas, armazenando grandes quantidades de gordura nos seus corpos, gordura esta necessária às suas funções básicas (Santos, 2015).

No entanto, Santos *et al.*, 2015, comparou a gordura total de três espécies distintas de holotúrias selvagens, das quais a espécie *Holothuria forskali* foi a que apresentou maior teor de gordura (4,83%), comparativamente às outras duas espécies, *Holothuria mammata* (1,00%) e *Stichopus regalis* (3,63%). As amostragens neste estudo, para esta análise bioquímica, foram realizadas no período outono/inverno, altura de forte agitação marítima. Visto que, no estudo de Santos *et al.*, 2015 as holotúrias foram capturas no mesmo local, não havendo variações sazonais no comportamento alimentar, nem variações geográficas, a diferença obtida entre os níveis de gordura total (0,69% e 4,83%) podem ser justificadas pelas razões mencionadas anteriormente, podendo ter sido recolhidos indivíduos para análise, mais expostos à forte agitação marítima do que os no presente trabalho.

De acordo com Ozer *et al.*, (2004), os processos de manuseamento também são passíveis de afetar a composição química das holotúrias, podendo este facto também estar relacionado com a diferença encontrada na gordura total.

Chang – Lee *et al.*, (1989) definiram um intervalo geral percentual para a gordura total das holotúrias, de 0,1 a 0,9%. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo, encontram-se em concordância com este mesmo intervalo.

Analogamente aos resultados anteriores, foi possível observar que as holotúrias selvagens em relação aos dois tratamentos, apresentam valores superiores de ácidos gordos, em praticamente todos os grupos, com exceção dos ácidos gordos saturados (SFA) e da razão entre o $\omega 3/\omega 6$. O Tratamento 2 foi o que obteve uma maior razão entre estes dois grupos de ácidos gordos, $0,68 \pm 0,46\%$, seguindo-se os selvagens, $0,55 \pm 1,76\%$ e o Tratamento 1, $0,48 \pm 6,29\%$, respetivamente.

Segundo Maulvault *et al.*, (2009) o consumo excessivo de $\omega 6$ resulta na diminuição da síntese de ácidos gordos $\omega 3$, tais como o EPA e o DHA. Alguns autores sugerem que os ácidos gordos $\omega 6$ possuem características pró-inflamatórias, devido ao efeito anti-inflamatório que os $\omega 3$ possuem face aos $\omega 6$ (Ghosh *et al.*, 2006). Portanto, torna-se de elevada importância, em termos nutricionais, conhecer a relação entre estes ácidos gordos presentes nos alimentos ingeridos diariamente.

Existem algumas divergências de opiniões relativamente à relação ideal entre os $\omega 3:\omega 6$. Alguns autores e entidades, como a WHO e a FAO, chegam a um consenso e recomendam dietas cujas razões $\omega 3/\omega 6$ estejam compreendidas entre 1:5 a 1:4 (Martin *et al.*, 2006). Porém, razões entre 1:3 e 1:2 têm sido também sugeridas pois poderão possibilitar uma maior conversão do ácido ALA em DHA.

Neste estudo verifica-se uma maior quantidade $\omega 6$ face a $\omega 3$, o que se deve fundamentalmente à presença em maior quantidade dos ácidos ARA e do ácido docosadienóico (22:2 n6).

Os ácidos gordos saturados são considerados uma gordura “má”, estando associados ao aumento do risco de doenças circulatorias e cardíacas, aumento do colesterol sanguíneo, particularmente do colesterol LDL (“mau colesterol”), etc. Já foi comprovado que substituir a gordura saturada pela gordura insaturada na alimentação pode ajudar a reduzir o colesterol LDL, um dos fatores de risco no desenvolvimento de doenças coronárias (Candeias, 2013).

Porém, é necessário um equilíbrio entre o consumo dos diferentes tipos de ácidos gordos, recomendando-se uma ingestão reduzida de ácidos gordos saturados e ácidos gordos “trans” e um maior consumo de ácidos monoinsaturados e polinsaturados (Candeias, 2013).

Os ácidos gordos saturados (SFA) mais comuns no pescado são: o mirístico (14:0), o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0). O ácido palmítico, comparativamente aos restantes SFA, encontra-se, geralmente, presente em percentagens muito elevadas sendo aquele que mais se destaca. No entanto, apesar do ácido palmítico se encontrar presente em todos os tratamentos em quantidades relativamente elevadas, o ácido gordo saturado que mais se destacou, apresentando um teor mais elevado foi o ácido esteárico. Santos

et al., 2015 obtiveram resultados semelhantes para a espécie *H. forskali* selvagem, onde obtiveram uma maior percentagem do ácido esteárico embora estes valores tenham sido inferiores aos obtidos neste estudo. Esta discrepância poderá estar relacionada com a altura do ano em que ocorreram as capturas.

No que diz respeito aos dois tratamentos, o Tratamento 1 ($36,39 \pm 5,16\%$) apresentou um maior teor do ácido esteárico comparativamente ao Tratamento 2 ($31,92 \pm 8,82\%$). O ácido esteárico é um ácido gordo existente na maior parte das gorduras animais e gorduras vegetais, sendo mais abundante nas gorduras animais (aproximadamente 30%) do que nas gorduras vegetais (menos de 5%) (Candeias, 2013), podendo este facto estar relacionado com o teor mais elevado encontrado para este tratamento. Contudo, apesar de ser um ácido gordo saturado, o ácido esteárico parece não apresentar os efeitos negativos associados a este tipo de gordura.

Um estudo mencionado por Bilgin e Tanrikulu, (2018) relacionado com as propriedades nutricionais da espécie, *Holothuria tubulosa*, apresentou valores do ácido palmítico, $6,460 \pm 0,574\%$ e do ácido esteárico, $7,205 \pm 1,017\%$, bastante inferiores aos obtidos neste estudo, tanto para os selvagens, como para o Tratamento 1 e 2.

No que diz respeito aos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), o ácido oleico (18:1 ω 9) é o que mais se destaca no perfil de ácidos gordos do pescado, bem como o ácido palmitoleico (16:1 ω 7). No entanto, no presente estudo, apenas se verificou a presença do ácido oleico na composição do músculo das holotúrias, nos selvagens e no Tratamento 1. Porém, no estudo anterior mencionado para a espécie *H. tubulosa*, Bling *et al.* (2018) obteve valores superiores para o ácido oleico, $4,062 \pm 0,334\%$, assim como no estudo de Santos *et al.*, (2015), $2,61 \pm 0,42\%$, comparativamente ao teor obtido neste estudo para os selvagens, $0,67 \pm 0,57\%$.

Um motivo para este ácido gordo não se encontrar presente no Tratamento 2, pode estar relacionado com a não inclusão deste ácido no perfil do alimento que lhes foi fornecido na alimentação.

Diversos estudos evidenciam a necessidade de se incluir nas dietas elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados, especialmente EPA e DHA, para que se atinjam os níveis ótimos de desenvolvimento e crescimento desejados (Yildiz, 2008). No que diz respeito, ao teor em ácidos gordos essenciais (EPA e DHA), os selvagens apresentaram maior quantidade do ácido eicosapentaenóico (C 20:5 n3- EPA), $12,16 \pm 1,42\%$. Por outro lado, o ácido docosahexanóico (C 22:6 n3- DHA), encontra-se em maior quantidade no Tratamento 2 ($4,26 \pm 1,82\%$), seguindo-se dos selvagens ($1,31 \pm 0,25\%$) e por último no Tratamento 1 ($0,76 \pm 0,98\%$).

Para os ácidos gordos polinsaturados ω_6 , o ácido que se apresenta em maior quantidade é o ácido gordo araquidónico (C 20:4 n6- ARA) com $23,15 \pm 1,31\%$ para os selvagens, $15,72 \pm 3,98\%$ para o Tratamento 2 e $14,32 \pm 0,68\%$ para o Tratamento 1.

Neste mesmo grupo, o Tratamento 2 apresenta maior quantidade do ácido gordo linoleico (C 18:2 n6), $0,35 \pm 0,16\%$, sendo que nos selvagens este ácido gordo não foi identificado.

Santos *et al.*, 2015, relativamente aos ácidos gordos essenciais, obteve para a espécie, *Holothuria forskali*, valores inferiores de EPA ($10,49 \pm 0,21\%$), DHA ($1,01 \pm 0,09\%$) e ARA ($20,3 \pm 0,14\%$), comparativamente aos valores encontrados para os selvagens. Sendo que, os valores obtidos para estes mesmos ácidos gordos no Tratamento 2, foram muito próximos aos resultados mencionados, chegando mesmo a serem ultrapassados no teor do ácido gordo ARA. Por outro lado, Bligin e İzci (2016), obtiveram valores inferiores destes mesmos ácidos para a espécie em estudo, com exceção do DHA ($3,69 \pm 0,45\%$).

Diversos estudos mencionam que uma ingestão desequilibrada e elevada do ácido linoleico (LA) inibe a capacidade natural do organismo sintetizar o DHA (Martin *et al.*, 2006; Soccol *et al.*, 2003).

Nos resultados obtidos, os valores obtidos para o DHA foram inferiores em comparação com os valores obtidos para os ácidos gordos EPA e ARA. Uma justificação plausível para estes resultados, poderá estar relacionada com a inclusão do LA nas dietas, ter sido desequilibrada ou elevada, conduzindo a uma inibição natural por parte do organismo das holotúrias, na síntese deste ácido gordo essencial.

Ainda é importante referir que as holotúrias selvagens obtiveram valores de ácidos gordos polinsaturados, bastante superiores aos saturados, contrariamente às duas dietas experimentais. Os sedimentos marinhos contêm um elevado nível de ácidos gordos de cadeia ramificada, que se acredita serem de origem bacteriana (Graeme *et al.*, 1988). Uma vez que a alimentação das holotúrias passa pela ingestão de grandes quantidades de sedimentos presentes no fundo marinho, é de esperar que estes organismos contenham elevados teores em ácidos gordos (Yahyavi *et al.*, 2012).

Comparando os dois tratamentos experimentais, o Tratamento 2 obteve valores superiores para a maioria dos ácidos, nomeadamente EPA, DHA e ARA. Este facto pode estar relacionado, com o elevado valor nutricional das microalgas administradas, essencialmente em ácidos gordos essenciais. No entanto, os valores associados ao Tratamento 1, podem estar relacionados com a lixiviação da ração não consumida acabando por perder nutrientes. Quanto maior o nível proteico das rações, como é o caso (62%) e quanto maior o tempo de exposição da ração à água, maior é a transferência de

nutrientes para o ambiente, diminuindo os nutrientes das rações. O facto de só alimentar as holotúrias uma vez por dia e ao final do dia (17h) pode ter contribuído para estes resultados. A quantidade de efluente administrada (5% da biomassa) poderá também ter sido insuficiente para satisfazer as necessidades nutricionais das holotúrias.

Mediante o exposto, pode concluir-se que a dieta que contém os produtos derivados do efluente dos camarões, ainda é deficitária, comparativamente ao perfil de ácidos gordos do Tratamento 2 e das holotúrias selvagens, que apresentam valores mais elevados destes mesmos ácidos gordos, mais importantes para a nutrição e saúde humana.

No entanto, tendo em conta os resultados obtidos neste estudo e os encontrados na bibliografia, esta dieta parece ser promissora para o cultivo da espécie, *Holothuria forskali*.

9.3 Análise histológica e avaliação do estado de maturação das gónadas dos indivíduos da espécie *Holothuria forskali*

No final do ensaio, com o intuito de avaliar o estado reprodutivo dos indivíduos após o ensaio experimental, em cada um dos tratamentos experimentais e conseqüentemente fazer uma comparação com estudos histológicos com holotúrias selvagens da mesma espécie, *Holothuria forskali*, foram utilizadas técnicas histológicas.

É possível, através da avaliação do Índice Gonadossomático (GI), ainda que de carácter subjetivo, consequência do alto conteúdo em água que os exemplares possuem no interior do corpo, avaliar o estado de maturação no final do ensaio (Ramofafia *et al.*, 2003).

De acordo com diversos autores, o intervalo de GI tido como o valor correspondente a gónadas maduras encontra-se compreendido entre 5-12% (Santos, 2013). Contudo, isto não se verifica nos resultados obtidos no ensaio, uma vez que foi encontrado um macho num estágio de maturação em crescimento, para valores de GI compreendidos neste intervalo. Visto que, o intervalo percentual estabelecido abrange todas as espécies holoturianas, neste caso, podemos estar perante uma exceção e, conseqüentemente, esta espécie não se enquadrar neste mesmo intervalo.

Porém, é sabido que o Índice Gonadossomático é afetado por diversos fatores, não só pelo peso das gónadas, como também pelo tamanho e peso corporal dos indivíduos. O macho encontrado neste estágio em crescimento, apresentou um peso da gónada superior às restantes amostras, com um valor de GI conseqüentemente superior. Tendo em conta, que a sazonalidade do desenvolvimento das gónadas está associada ao

armazenamento de reservas orgânicas e minerais nos tecidos somáticos, que são transferidas para as gónadas durante a gametogénese (Lawrence, 1976), a discrepância dos resultados obtidos pode estar relacionada com uma maior mobilização das reservas energéticas (nutrientes) para a maturação das gónadas, em vez de gâmetas, apresentando deste modo, valores de GI compreendidos para este intervalo.

Segundo Conand (1993), as fêmeas possuem por norma Índices Gonadossomáticos superiores aos dos machos, estando este motivo associado ao facto de desovarem durante um maior período de tempo em relação aos machos. Contudo, não foi o que se verificou nos resultados obtidos, porém não existe uma representatividade da amostra considerável para retirar qualquer tipo de conclusão.

As colorações observadas para as gónadas no Tratamento 1 foram cor salmão e branco transparente. Por outro lado, a coloração das gónadas para o Tratamento 2 foi um laranja claro. Os resultados obtidos vão de acordo, com os resultados de Santos *et al.*, (2015), em que as fêmeas num estágio de maturação de crescimento apresentavam uma coloração das gónadas laranja claro (com um peso da gónada também correspondente ao intervalo de 1,3-6,5g) e os machos uma coloração esbranquiçada transparente (com um peso da gónada correspondente 1,1-5,9g). No entanto, para a holotúria do sexo masculino já madura, a coloração obtida foi uma cor salmão, como nos resultados obtidos.

De acordo com Pratas (2018), pode afirmar-se que, quanto mais intensa é a coloração da gónada, mais avançado é o seu estágio de maturação, o que se verifica no presente estudo. Estudos precedentes verificam que a coloração das gónadas, bem como o diâmetro dos túbulos constituintes, se modificam ao longo dos anos, evoluindo de acordo com o estágio de maturação em que se encontram (Ghobadyan *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2012).

Relativamente ao estado de maturação das gónadas, não foi possível, visualizar todos os estádios de maturação, sendo que o número de amostras foi muito reduzido, para além do curto período de estudo comparativamente a outros estudos de grande relevância, com base na biologia reprodutiva de holotúrias. No entanto, Santos *et al.*, (2015) analisou a maturação dos túbulos das gónadas de *H. forskali* em cada mês para machos e fêmeas selvagens, onde em relação ao mês de maio (mês em que terminou o ensaio experimental), só foram encontrados túbulos das gónadas parcialmente desovados (estádio IV) e maduros (III) para as fêmeas e parcialmente desovados para os machos. Contrariamente, neste estudo, foram observadas gónadas em diferentes estados de maturação analogamente ao estudo anteriormente referido. Sendo que, foram

encontradas gónadas em estádios de crescimento (estádio II) e maduras (estádio III) para os machos e em crescimento para uma fêmea, neste mesmo mês.

A maturação das gónadas é controlada por fatores endógenos, mas é profundamente afetada por fatores exógenos, particularmente a temperatura (Santos, 2013). Conand (1993) menciona que os ciclos reprodutivos anuais são característicos da maior parte das espécies temperadas, cuja época de desova ocorre como consequência da conexão do aumento da temperatura com a intensidade da luz, conduzindo, conseqüentemente, a uma maior oferta de alimento para pepinos-do-mar.

Shiell e Uthicke (2006) afirmam que a maturação das gónadas em alguns equinodermes é supostamente influenciada pela disponibilidade e qualidade dos alimentos.

As dietas administradas ao longo do ensaio experimental, assim como as flutuações diárias da temperatura da água podem ter interferido no estado de maturação das gónadas, levando a um atraso da gametogênese comparativamente ao estudo em questão.

10. Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho experimental, revelaram grandes potencialidades da espécie *Holothuria forskali*, se integrar no cultivo da empresa Riasearch. No entanto, o motivo para as baixas taxas de sobrevivência obtidas terá que ser descoberto e ultrapassado.

Relativamente às dietas experimentais, os resultados alcançados sugerem que, a inclusão dos produtos derivados do efluente dos camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, como dieta, revelaram ser um candidato para substituir a dieta comumente administrada às holotúrias, as microalgas.

Porém, de acordo com os resultados obtidos e com a bibliografia, seria importante, realizar uma análise química aos produtos derivados do efluente utilizado no ensaio experimental e reajustar a dieta de forma a proporcionar um melhor equilíbrio nutricional, eventualmente através da conjugação de diferentes percentagens de microalgas e fezes de crustáceos, de forma a potenciar um crescimento saudável e a melhorá-lo.

Outra questão a ter em consideração, num estudo futuro, está relacionada com o sistema experimental e, conseqüentemente, com o desenho experimental. Seria interessante reformular o sistema, de forma a conseguir testar diferentes dietas num sistema fechado, nomeadamente num sistema RAS, em condições *indoor*, onde todos os parâmetros experimentais sejam passíveis de serem controlados e manipulados de acordo com o estudo em questão ou com os parâmetros considerados ideias para a espécie. De igual forma, seria importante utilizar um maior número de exemplares, para obter resultados mais fidedígnos, possibilitando, deste modo, realizar uma análise estatística a todos os componentes em estudo.

O sucesso do cultivo de pepinos-do-mar, depende de diversos fatores, nomeadamente de avanços no conhecimento da biologia reprodutiva de diversas espécies comercialmente viáveis, como também, da otimização dos conhecimentos direcionados na alimentação e na nutrição mais adequada a cada fase do ciclo de vida das holotúrias.

Na indústria da aquacultura, um dos maiores desafios é o desenvolvimento de dietas ótimas do ponto de vista nutricional, com um menor custo associado e um menor dano ambiental possível. Neste estudo, concordantemente com os resultados anteriormente obtidos, os produtos derivados do efluente dos camarões utilizados como dieta experimental não acarretam qualquer tipo de investimento para a empresa, transformando-o num produto adicional, de valor acrescentado, contrariamente às microalgas liofilizadas que apresentam custos bastante elevados.

Relativamente à análise histológica, futuramente seria interessante perceber qual dos dois fatores (temperatura ou alimentação), teve um maior impacto no atraso da gametogénese em comparação com as holotúrias selvagens.

Em suma, conclui-se que a integração da espécie *H. forskali* num sistema IMTA é viável, proporcionando o seu crescimento. Contudo, relativamente ao valor nutricional, a dieta (fezes + alimento não consumido) pode ser melhorada, quando comparada com os valores obtidos referentes ao perfil de ácidos gordos das holotúrias selvagens.

Os resultados obtidos neste trabalho experimental, podem ser úteis no desenvolvimento de dietas mais apropriadas, económicas e sustentáveis. Sendo que, é de extrema importância realizar estudos mais aprofundados, de maneira a conhecer as necessidades nutricionais ideais das holotúrias, nomeadamente desta espécie com potencial para ser introduzida no mercado ocidental.

VI. Referências bibliográficas

- Alexander, K. A., Potts, T. P., Freeman, S., Israel, D., Johansen, J., Kletou, D., Melande, M., Pecorinof, D., Rebours, C., Shorteng, M., Angel, D. L. (2015). The implications of aquaculture policy and regulation for the development of interated multitrophic aquaculture in Europe. *Aquaculture*. 443:16–23.
- Alvarez, J. S., Hernandez-Illamas, A., Galindo, J., Fraga, I., Garcia, T.; Villarreal, H. (2007). Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley 1997). *Aquac. Res.*, v. 382, p. 689- 695.
- Alves, N., Nishida, A. K., Andrade, H. A., Andriguetto-Filho, J. M., Natividade, C. D., Brandini, F. P., Lessa, R. (2011). A ecdise do caranguejo uçá na visão dos caranguejeiros. *Boletim Do Instituto de Pesca*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Amaya, E., Davis, D.A., Rouse, D.B. (2007). Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*., v. 262, p. 419–425.
- Anisuzzaman, M., Cheol, J. U., Feng, J., Kuk, C. J. J., Kamrunnahar, K. Da-in, Lee; Sun, Y., H; Joong, Kang., Seok. (2017). Effects of different algae in diet on growth and interleukin (IL)-10 production of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries and Aquatic Sciencies*.20:24,4-6 pp.
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*. 51: 26-35.
- Bai, Y., Yang, Y., Huang, Q. (2012). Combined electrohydrodynamic (EHD) and vacuum freeze drying of sea cucumber. *Drying Technology*, 30:10, 1051-1055 pp.
- Barrington, K., Chopin, T., Robinson, S. (2009). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. *Integrated mariculture: a global review*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 529, 7-46.
- Battaglione, S. C., Seymour, J. E., Ramofafia, C. (1999a). Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. *Aquaculture*, 178: 293–322. doi: 10.1016/S0044-8486 (99) 00130-1.
- Battaglione, S.C. (1999b). Culture of tropical sea cucumbers for the purposes of stock restoration and enhancement. *Naga* 22, 4–11.
- Battaglione, S. C., Seymour, J. E., Ramofafia, C., Lane, I. (2002). Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. *Aquaculture*, 207:1, 29-47pp.
- Becker, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovao, J., Eeckhaut, I. (2004). The skin ulceration disease in cultivated juveniles of (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture*, 2004, v.242, no.1-4 pp. 13-30.
- Bell, J. D., Agudo, N. N., Purcell, S. W., Blazer, P., Simutoga, M., Pham, D., & Della Patrona, L. (2007). Grow-out of sandfish *Holothuria scabra* in ponds shows that co-culture with shrimp *Litopenaeus stylirostris* is not viable. *Aquaculture*, 273(4), 509-519 pp.
- Benítez-Villalobos, F., Avila-Poved, O. H., Gutiérrez-Méndez, I. S. (2013). Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms*. Vol. 1: 13–24.
- Bilgin, Ş. and İZÇİ, L. (2015). The Effects of Drying & Boiling Process On Nutritional Components of *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823). In: *Journal of Food and Health Science*. Turquia, p.4.
- Bilgin, Ş. and Öztürk Tanrikulu, H. (2018). The changes in chemical composition of

Holothuria tubulosa (Gmelin, 1788) with ambient-drying and oven-drying methods. In: Food Science Nutrition. 2018 Sep; 6(6): 1456–1461.. pp.1456-1459.

- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., vol. 37: 911–917.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Josupeit, H., Cai, J., Zhou, X. (2012). The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. Journal of Invertebrate Pathology, 110(2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.010>.
- Brock, J. A., Main, K. L. (1994). Guide to de common problems and diseases of cultured of *Penaeus vannamei*, World Aquaculture Society. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, HI. 241 p.
- Buschmann, A. H., Hernández-González, M. C., Aranda, C., Chopin, T., Neori, A., Halling, C., Troell, M. (2008). Mariculture Waste Management. In: Jørgensen, S.E., Fath, B.D. (Eds.), The Encyclopedia of Ecology, Ecological Engineering, vol. 3. Elsevier, Oxford, 2211–2216.
- Campbell, A. (2006). Fauna e Flora do Litoral de Portugal e da Europa. Guias Fapas, 245p.
- Candeias, V. (2013). Gorduras Alimentares. Direcção Geral da Saúde, pp.3-5.
- Chang-Lee, M. V., Price, R. J., Lampila, L. E. (1989). Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus spp.*). Journal of Food Science, 54:567-572.
- Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. SPC Bêche-de-mer Information Bulletin, 18: 18-23 pp.
- Chen, J. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In: Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO, Rome, Fisheries Technical Paper (ed. by A. Lovatelli, & C. Conand), Food & Agriculture Organization 463: 25-38 pp.
- Chopin, T., Robinson, S. (2006). Rationale for developing integrated multi-trophic aquaculture (IMTA): an example from Canada. Fish Farmer Mag, 1, 20-21.
- Chu Yuan, M, .J., Appadoo, C. (2007). Effects of Temperature Salinity and Feed on the Survival and Growth of Juvenile Sea Cucumber *Bohadschia marmorata* .Journal of Coastal Development, 11(1): 29-39.
- Conand, C. (1993). Reproductive biology of the holothurians from the major communities of the New Caledonia lagoon. Marine Biology, 116:439–450.
- Costa, P. B. (2010). Crescimento, sobrevivência e capacidade de reciclagem de matéria orgânica do pepino-do-mar, *Holothuria grisea*, 1867. (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirodita).Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Aquicultura, Brasil.26-30.
- DGPA. Direcção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos. (2013). Aquicultura. Obtido de: www.dgrm.min-agricultura.pt
- DGPA. Direcção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos e Instituto Nacional de Estatística. (2017). *Estatísticas Da Pesca 2017*.
- Domínguez-Godino, J. A., Slater, M. J., Hannon, C., & González-Wangüermert, M. (2015). A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. Aquaculture, 438, 122-128.
- Dong Y., Dong S., Tian X., Wang F. & Zhang M. (2006). Effects of diel temperature fluctuations on growth, oxygen consumption and proximate body composition in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. Aquaculture 255, 514–521.
- Dong, S., Liang, M., Gao, Q., Dong, F. Y., Tian, X. (2010). Intra-specific effects of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with reference to stocking density and body size. Aquaculture Research, 41: 1170-1178. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02404.x
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 233pp.
- FAO. (2015). FAO Aquaculture Newsletter nº 53. Food and Agriculture

Organization of the United Nations. Rome. 55-57 pp.

- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 2pp.
- FAO. (2018). The state of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. Rome.
- Ferreira, P., M., P. (2009). Manual de cultivo e bioencapulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Retirado de: https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/publicacoes/pescas.mar/Manual_Cadeia_Alimentar_final.pdf
- Ghobadyan, F., Morovvati, H., Ghazvineh, L., Tavassolpour, E. (2012). An investigation of the macroscopic and microscopic characteristics of gonadal tubules in the sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Persian Gulf, Iran). SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 32: 6-14.
- Ghosh, S., Kewalramani, G., Yuen, G., Pulinilkunnil, T., An, D., Innis S.M., Allard, M.F., Wambolt, R.B., Qi, D., Abrahami, A., Rodrigues, B. (2006). Induction of mitochondrial nitrate damage and cardiac dysfunction by chronic provision of dietary ω -6 polyunsaturated fatty acids. Free Radical Biology & Medicine. 41: 1413-1424.
- Giraspy, D. A. B., Ivy, G. (2008). The influence of commercial diets on growth and survival in the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. *versicolor* (Conand, 1986), (Echinodermata: Holothuroidea). SPC Bêche-de-mer Information Bulletin, 28: 46-51 pp.
- Graeme, A., Dunstan, A.J., Sinclair, K., Naughton, J.M. (1988). The lipid content and fatty acid composition of various marine species from Southern Australian Coastal waters. Comp. Biochem. Physiol., 91(1):165-169.
- Gunay, D. (2012). Investigation of digestive enzyme activities in sea cucumbers (*Holothuria tubulosa* G., 1778), PhD thesis, İzmir: Ege University, 69 pp.
- Gutierrez-Wing, M. T., Malone, R. F. (2006) – Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. Aquacultural Engineering, 34(3):163–171. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2005.08.003.
- Hai-Bo, Y., Qin-Feng, G., Shuang-Lin, D., Bin, W. (2015). Changes in fatty acid profiles of seacucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) induced by terrestrial plants in diets. Aquaculture. 442:119–24.
- Hamel, J.F. and Mercier, A. (1996). Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53: 253– 271. doi: 10.1139/f95-186.
- Hulefeld, R., Habte-Tsion, H. M., Lalgudi, R. S., McGraw, B., Cain, R., Allen, K., Kumar, V. (2018). Nutritional evaluation of an improved soybean meal as a fishmeal replacer in the diet of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. <https://doi.org/10.1111/are.13593>.
- Hughes, A., Black, K. (2016). “Going beyond the search for solutions: understanding trade-offs in European integrated multi-trophic aquaculture development”. Aquaculture Environment Interactions, Vol. 8:191-199.
- Ivy, G., Azari, D., Giraspy, B. (2006). Development of large scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. *versicolor* (Conand, 1986) in Queensland, Australia. SPC Bêche – de – mer Information Bulletin, 24:28–34.
- Kureshy, N.; Davis, D. A. (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture., v. 204, p.125-143.
- Landau, M. (1992). Introduction to Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., New York, 440 pp.
- Lavitra, T., Fohy, N., Gestin, P., Rasolofonirina, R. and Eeckhaut, I. (2010). Effect of water temperature on the survival and growth of endobenthic *Holothuria scabra*

(Echinodermata: Holothuroidea) juveniles reared in outdoor ponds. In: SPC Beche-de-mer Information Bulletin, 30th ed. pp.26-28.

- Lawrence, J. (1987). A functional biology of echinoderms. Johns Hopkins University press. 623 pp.
- Lawrence, J. M. (1976). Patterns of lipid storage in post-metamorphic marine invertebrates. *American Zoologist* 16:747-762.
- Laxminarayana, A. (2005). Induced spawning and larval rearing of the sea cucumbers, *Bohadschia marmorata* and *Holothuria atra* in Mauritius. SPC Beche-de-mer Information Bulletin, 22: 48-52.
- Lee, P. G.; Lawrence, A. L. Digestibility. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.). (1997). Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, vol. 6. World Aquac. Soc., Baton Rouge, LA, USA, pp. 194–260.
- Lima, P. P. (2013). “Influência da salinidade e da temperatura da água nas respostas comportamental e fisiológicas de camarões marinhos *Litopenaeus Vannamei* (Boone 1931).” *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(9): 1689–99.
- Mackey, A. (2004) Factors That Influence the Reproduction of Sea Cucumbers in, San Diego State University, US.
- Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., Souza, N.E., Visentainer, J. V. (2006). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição*. 19: 761-770.
- Maulvault, A. (2009). Valor nutricional de algumas espécies consumidas em Portugal (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha - Especialização em Aquacultura e Pescas). Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve.
- Mercier, A., Battaglione, S. C., Hamel, J. F. (1999). Daily burrowing cycle and feeding activity of juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra* in response to environmental factors, *JExp Mar Biol Ecol.* 239, 125-156.
- Morgan, A. D., 2000. Aspects de la gestion des stocks gé'niteurs d'holothuries de sable (Echinoderme: Holothurides).
- Motikawa, S. (2006). “Digestibilidade roteica de Rações Comerciais Para o Camarão Rosa *Farfantepenaeus Paulensis* Pérez-Farfante (1967): Avaliação Por Métodos in Vivo e in Vitro.” (1967): 78.
- Murray, F., Bostock, J., Fletcher, D. (2014). Review of recirculation aquaculture systems technologies and their commercial application. Highlands and Islands Enterprise. University of Sterling Aquaculture. 50-62 pp.
- Nascimento, M. L. (2013). “Análise Dos Perigos Associados Ao Camarão *Litopenaeus Vannamei* No Brasil.” : 87pp.
- Navarro, P. G.; García-Sanz, S.; Tuya, F. (2012). Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). *Scientia Marina* 76(4): 741-752.
- Ning, Z., Liu, S., Zhang, G., Ning, X., Li, R., Jiang, Z., e Zhang, J. (2016). Impacts of an integrated multi-trophic aquaculture system on benthic nutrient fluxes: a case study in Sanggou Bay, China. *Aquaculture Environment Interactions*, 8, 221-232.
- Nunes, A. J. P., Sá, M. V. C., Browdy, C. L., Vázquez-Añón, M. (2014). Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture.*, v. 431, p. 20–27.
- Oliveira, Gabriela Faria. (2008). “Metodologia Otimizada Para a Determinação de Digestibilidade de Dietas Para Camarões Marinhos Em Cultivo.” Dissertação de mestrado.
- Özer, N. P., Mol, S., Varlık, C. (2004). Effect of the handling procedures on the chemical composition of sea cucumber. *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 4(2).

- Pratas, D. S. V. (2018). Contributo para o estudo do potencial cultivo do pepino-do-mar, *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823). Tese de Mestrado em Aquacultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche. 32-59 pp.
- Pangkey, H., Lantu, S., Manuand, L. and Mokolensang, J. (2012). Prospect of sea cucumber culture in Indonesia as potential food sources. *Journal of Coastal Development*, 15:2, 114-124 pp.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Teixeira, N., Andrade, P. B. (2013). Amino acids, fatty acids and sterols profile of some marine organisms from Portuguese waters. *Food Chemistry*, 141:2412-2417.
- Pereira, L., Correia, F. (2015). Macroalgas Marinhas da Costa Portuguesa – biodiversidade, ecologia e utilizações. Paris: Nota de Rodapé Edições.
- Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226(1-4):35–44. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00465-4
- Pinho, R. (2011). “Captura, Manutenção e Transporte de Animais Marinhos.” 50-59 pp.
- Pires, P. J. (2015). “Avaliação Do Impacto Em *Solea Senegalensis* Expostos a Luz de Diferentes Comprimentos de Onda: Crescimento, Indicadores de Stress e Na Pigmentação Avaliação Do Impacto Em *Solea Senegalensis* Expostos a Luz de Diferentes Comprimentos de Onda: Crescimento, Ind.” : 109.
- Piveli, R. P. (2012). “Qualidade Das Águas e Poluição: Aspectos Físico-Químicos - Ferro, Manganês e Metais Pesados.” : 22. http://www.leb.esalq.usp.br/disciplinas/Fernando/leb360/Fasciculo_8_-_Ferro_e_Manganes_e_Metais_Pesados.pdf.
- Purcell, S. W., Samyn, Y., & Conand, C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6*. FAO, Rome. 223p.
- Purcell, Steven W. (2014). “Value, Market Preferences and Trade of Beche-de-Mer from Pacific Island Sea Cucumbers.” *PLoS ONE* 9(4).
- Ramofafia, C., Battaglione, S. C., Bell, J. D., Byrne, M. (2000). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. *Marine Biology*. 136 (6): 1045-1056.
- Ramofafia, C., Byrne, M., Battaglione, C.S. (2003). Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology*, 142:281–288.
- Ribeiro, B. C. (2011). Desenvolvimento de produtos reestruturados de corvina (*Argyrosomus regius*) de aquacultura. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 113pp.
- Saldanha, L. (2003). Fauna Submarina Atlântica: Portugal continental, Açores e Madeira. Publicações Europa-América. Portugal 224p.
- Sales, S. S., Pessoa, M. F., Lourenço, H. M. G., Bandarra, N. M. (2017). Caracterização e valorização do pepino-do-mar no Estuário do Sado: perfil nutricional, propriedades biológicas e aplicação de novas tecnologias de processamento. *Res NetHealth* 3, spta 52.1-2.
- Santos, A. F. P. Acondicionamento e Valorização de duas espécies de Pepino do mar: *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) e *Stichopus regalis* (Cuvier, 1817). (2017). Dissertação (Mestrado em Aquacultura)- Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche. 37-42 pp.
- Santos, R.; Dias, S.; Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Tecelão, C.; Pedrosa, R.; Pombo, A. (2015). Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquaculture. Research* 11–14 pp.
- Santos, F., Pratas, D., Baptista, T., Pombo, A. (2014). Sex determination in sea

cucumbers: *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*. International Meeting on Marine Research. 2014. Peniche, Portugal.

- Santos, R.F.A. (2013). “Estudo Da Biologia Reprodutiva e Do Potencial Biotecnológico e Alimentar de Holotúrias Da Costa de Peniche.” 2013. Tese de Mestrado em Aquacultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche.
- Seo, Y., Shin, I., Lee, S. (2011). Effect of dietary inclusion of various ingredients as an alternative for *Sargassum thunbergii* on growth and body composition of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Nutrition* 17: 549–556.
- Shi, C., Dong, S.L., Pei, S.R., Wang, F., Tian, X.L., Gao, Q.F. (2013). Effects of diatom concentration in prepared feeds on growth and energy budget of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquac Res.*46:609–17.
- Shiell, G.R., Uticke, S. (2006). Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria whitmaei* (Holothuroidea: Aspidochirotrida) in the Indian and Pacific Ocean regions of Australia. *Marine Biology*, 148–973–986.
- Shpigel, M. (2013). Mariculture mariculture Systems, Integrated Land-Based. In *Sustainable Food Production* (pp. 1111-1120). Springer New York.
- Sicuro, B., Jay, L. (2011). “Sea Cucumber in the Mediterranean: A Potential Species for Aquaculture in the Mediterranean.” *Reviews in Fisheries Science* 19(3):299–304.<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10641262.2011.598249>.
- Silveira, M.R.M., Bemvenuti, M.A., Moresco, A. (2011). “Hábito Alimentar de *Oligosarcus Robustus* MENEZES, 1969 e de *Oligosarcus Jenynsii* (GÜNTHER, 1864), No Sul Do Estado Do Rio Grande Do Sul.” *Atlântica* 33(1): 73–86.
- Soccol, M.C.H., Oetterer, M. (2003). Seafood as Functional food. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46: 443-454.
- Sookying, D., Davis, D.A., Silva, F.S.D. A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.
- Sorgeloos, P., Léger, P., Lavanés, P., Tackaert, W. (1987). Increased yields of marine fish and shrimp production through application of innovative techniques with *Artemia*. *Aquaculture et Développement, Cahiers Ethologie Appliquée*,7,43-50.
- Studer, B. H. (2018). *Litopenaeus vannamei* (Summary). In: FishEthoBase, ed. Fish Ethology and Welfare Group. World Wide Web electronic publication. Version 1.2. www.fishethobase.net.»
- Sudaryono, A., E. Tsvetnenko, L.H. E. (1996). Digestibility studies on fisheries by product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 143: 331-340.
- Sun, H., Liang, M., Yan, J., Chen, B. (2004). Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. In: Lovatelli A, Conand C, Purcell S, Uthicke S, Hamel J-F, Mercier A (eds) *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*, pp. 327–332. FAO, Rome.
- Tacon, A.G.J. (2002). Thematic Review of Feeds and Feed Management Practices in Shrimp Aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 69 pp.
- Tolon, T. (2017). "Effect of Salinity On Growth And Survival Of The Juvenile Sea Cucumbers *Holothuria Tubulosa* (GMELIN, 1788) And *Holothuria Poli* (DELLE CHIAJE, 1923)." 2017.3-6.
- Tolon, T., Emiroglu. D., Gunay. D., Hanci, B. (2016). “Effect of Stocking Density on Growth Performance of Juvenile Sea Cucumber *Holothuria Tubulosa* (Gmelin , 1788).” 2011: 1–8.
- Tuwo, A., Conand, C. (1992). Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(04), 745-758.
- Treece, G.D. Shrimp Culture. In. *Encyclopedia of Aquaculture*. (Robert R. Stickneyed). John Wiley e Sons, Inc. 2000. p. 805-868).

- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., Arrow, K.J., Barrett, S., Crépin, A.S., Ehrlich, P.R., Gren, A., Kautsky, N., Levin, S.A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B.H., Xepapadeas, T., de Zeeuw, A. (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13257-13263;
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., e Fang, J. G. (2003). Ecological engineering in aquaculture - potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297(1), 1-9.
- Uthicke, S., Conand, C., Benzie, J.A.H. (2003). Population genetics of the fissiparous holothurians *Stichopus chloronotus* and *Holothuria atra* (Aspidocheirota): A comparison between Torres Strait and La Reunion. *Mar. Biol.*, 139:257-265 pp.
- Valença, R.A.(2018). Cultivo de *Litopenaeus vannamei*: (nº78). Acedido em: 7 de Agosto de 2018 em: <http://www.panoramadaaquicultura.com/paginas/revistas/78/vannamei.asp>.
- Wang, F., Yang, H., Gao, F. and Liu, G. (2008). Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 151(4): 491-498. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.06.024.
- Xilin (2004). The progress and prospects of studies on artificial propagation and culture of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. In: A. LOVATELLI, C. CONAND, S. PURCELL, S. UTHICKE, J.F. HAMEL, AND A. MERCIER, eds. *Advances in sea cucumber aquaculture and management (ASCAM)*, Food and Agricultural Organisation (FAO) of United Nation; Rome, Technical Paper 463:273-276.
- Yamanouchi, T. (1956). The daily activity rhythms of the holothurians in the coral reef of the Palao Islands. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 5, 347–362.
- Yahyavi, M., Afkhami, M., Javadi, A., Ehsanpour, M., Khazaali, A., Khoshnood, R., Mokhlesi, A. (2012). Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilota* from Qeshm Island (Persian Gulf). *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(12),pp.2862–2869.
- Yildiz, M. (2008). Fatty acid composition of some comercial marine fish feeds available in turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 32 (3):151-158.
- Yuan, Y.V., Walsh, N.A. (2006a). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*, 44:1144–1150.
- Yuan, X., Yang, H., Zhou, Y., Mao, Y., Zhang, T., Liu, Y. (2006b). The influence of diets containing dried bivalve feces and/or powdered algae on growth and energy distribution in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea). *Aquaculture*. 256:457–67.
- Yuan, X., 2005. Studies on physio-ecology and bioremediation of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). Ph.D thesis, Graduate School of Chinese Academy of Science. 138pp. (em Chinês com o abstract em Inglês).
- Zamora, L. N., Yuan, X., Carton, A. G., Slater, M. J. (2016). Role of deposit-feeding sea cucumbers in integrated multitrophic aquaculture: progress, problems, potential and future challenges. *Reviews in Aquaculture*. Zar, J. H., Hall, P. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5th Edition. 944p.
- Zamora, L. and Jeffs, A. (2012). Feeding, metabolism and growth in response to temperature in juveniles of the Australasian sea cucumber, *Australostichopus mollis*. In: *Aquaculture* 358–359 (2012) 92–97. New Zealand, pp.95-96.
- Zhang, S. Y., Li, G., Wu, H.-B., Liu, X.-G., Yao, Y.-H., Tao, L., Liu, H. (2011). An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering*. 45, 93-102.

- Zhong, Y., Khan, M. A., Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4), 1188-1192pp.
- Zhou, Y., Yang, H., Liu, S., Yuan, X., Mao, Y., Zhang, T., Liu, Y., Zhang, F. (2006) Feeding on biodeposits of bivalves by the sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka (Echinodermata: Holothuroidea) and a suspension coculture of filter-feeding bivalves with deposit feeders in lantern nets from longlines. *Aquaculture*.256:510–20.
- Zhu, W., Mai, K.S., Zhang, B.G., Wang, F.Z., Xu, G.Y. (2005). Study on dietary protein and lipid requirement for sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *Marine Sciences*, 29: 54-58.

VII. Anexos

Tabela 1- Primeira amostragem realizada para a *Holothuria forskali*, início do acondicionamento.

Início do ensaio:	28 de Março					
Final do ensaio:	8 de Maio					
Duração:	42 dias					
	Tratamento 1			Tratamento 2		
Tanque	1	2	3	4	5	6
Tratamento	F	F	F	M	M	M
Holotúria/Tanque	9	9	9	9	9	9
Parametro	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)
Biomassa (g)	465,1	457,6	450,0	445,6	464,5	446,3
Média	51,7	50,8	50,0	49,5	51,6	51,6
22 de Março	Acondicionamento: (7 dias)					
Pesos individuais (g)						
Média (Mean)	51,68	50,84	50,00	49,51	51,61	49,59
Desvio-padrão (SD)	12,82	14,56	13,28	14,05	12,15	15,03
CV (%)	25%	29%	27%	28%	24%	30%
Holotúria 1	41,4	57,0	51,6	44,0	65,5	24,8
Holotúria 2	48,6	33,5	44,5	63,2	51,0	68,5
Holotúria 3	35,8	60,1	36,4	58,9	49,6	36,1
Holotúria 4	61,8	66,3	61,3	22,5	40,5	63,2
Holotúria 5	54,7	46,1	68,0	57,3	30,4	39,3
Holotúria 6	44,6	23,2	50,2	37,2	46,3	62,7
Holotúria 7	39,9	53,6	24,6	67,3	50,4	51,6
Holotúria 8	73,4	66,3	54,8	45,7	65,2	59,7
Holotúria 9	64,9	51,5	58,6	49,5	65,6	40,4

Tabela 2- Segunda amostragem realizada, fim do acondicionamento e início do ensaio de crescimento.

	Tratamento 1			Tratamento 2		
Tanque	1	2	3	4	5	6
Tratamento	F	F	F	M	M	M
Holotúria/Tanque	9	9	9	9	9	9
Parametro	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)
Biomassa (g)	471,0	464,4	455,8	453,1	472,5	453,3
Média	52,3	51,6	50,6	50,3	52,5	50,4

Dia: 28 de Março		Fim do condicionamento				
Pesos individuais (g)						
Média (Mean)	52,33	51,60	50,64	50,34	52,50	50,37
Desvio-padrão (SD)	12,68	14,44	13,16	14,04	12,19	14,86
CV (%)	24%	28%	26%	28%	23%	30%
Holotúria 1	73,7	24,3	55,5	44,6	31,3	63,8
Holotúria 2	65,6	66,8	50,5	60,0	51,6	52,5
Holotúria 3	49,2	34,3	25,5	68,1	47,1	37,2
Holotúria 4	45,5	67,0	37,3	38,0	66,3	40,9
Holotúria 5	36,7	46,8	52,3	23,4	41,6	25,9
Holotúria 6	62,3	52,3	59,4	50,4	51,3	69,0
Holotúria 7	40,5	60,9	68,5	46,6	65,7	63,4
Holotúria 8	42,1	57,7	61,7	58,1	50,3	60,4
Holotúria 9	55,4	54,3	45,1	63,9	67,3	40,2

Tabela 3- Terceira amostragem realizada para o ensaio de crescimento.

	Tratamento 1			Tratamento 2		
	1	2	3	4	5	6
Tanque						
Tratamento	F	F	F	M	M	M
Holotúria/Tanque	9	8	8	8	9	9
Parametro	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)
Biomassa (g)	485,5	411,6	413,4	457,5	501,1	483,4
Média	53,9	51,5	51,7	57,2	55,7	53,7

Dia: 10 de Abril						
Pesos individuais (g)						
Média (Mean)	53,94	51,45	51,68	57,19	55,68	53,71
Desvio-padrão (SD)	12,25	14,19	13,88	10,10	12,12	14,64
CV (%)	23%	28%	27%	18%	22%	27%
Holotúria 1	42,7	68,5	63,1	63,1	55,0	55,9
Holotúria 2	64,4	56,1	27,6	71,3	34,6	30,0
Holotúria 3	47,4	48,8	38,3	67,1	50,0	43,5
Holotúria 4	38,6	59,3	70,3	48,5	68,8	40,4
Holotúria 5	75,5	54,2	60,9	61,2	53,7	63,5
Holotúria 6	64,2	62,8	54,0	42,1	44,6	72,4
Holotúria 7	51,0	25,9	52,2	49,8	69,4	44,4
Holotúria 8	57,5	36,0	47,0	54,4	54,8	67,0
Holotúria 9	44,2				70,2	66,3

Tabela 4- Quarta amostragem durante o ensaio de crescimento.

Tanque	Tratamento 1			Tratamento 2		
	1	2	3	4	5	6
Tratamento	F	F	F	M	M	M
Holotúria/Tanque	9	7	8	8	9	9
Parametro	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)
Biomassa (g)	498,3	374,4	426,5	485,4	528,0	511,2
Média	55,4	53,5	53,3	60,7	58,7	56,8
Dia: 19 de Abril						
Pesos individuais (g)						
Média (Mean)	55,37	53,49	53,31	60,68	58,67	56,80
Desvio-padrão (SD)	12,11	15,09	13,69	10,26	11,65	14,37
CV (%)	22%	28%	26%	17%	20%	25%
Holotúria 1	76,5	64,2	29,7	51,6	48,3	34,1
Holotúria 2	40,6	57,5	53,9	46,2	53,5	43,2
Holotúria 3	59,2	28,0	71,3	66,3	71,0	75,6
Holotúria 4	44,5	55,7	55,6	64,6	38,5	46,8
Holotúria 5	65,6	37,8	48,7	70,5	71,9	59,3
Holotúria 6	66,1	70,1	39,8	53,0	73,1	68,1
Holotúria 7	45,7	61,1	62,6	57,3	58,2	70,4
Holotúria 8	51,8		64,9	75,9	57,9	66,3
Holotúria 9	48,3				55,6	47,4

Tabela 5- Última amostragem, fim do ensaio de crescimento para a espécie *Holothuria forskali*.

Tanque	Tratamento 1			Tratamento 2		
	1	2	3	4	5	6
Tratamento	F	F	F	M	M	M
Holotúria/Tanque	5	5	4	5	5	4
Parametro	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)	WW (g)
Biomassa (g)	308,9	267,0	260,1	330,1	343,5	255,4
Média	61,8	53,4	65,0	66,0	68,7	63,9
Dia: 8 de Maio						
Pesos individuais (g)						
Média (Mean)	61,78	53,40	65,03	66,02	68,70	63,85
Desvio-padrão (SD)	11,31	18,24	6,55	9,19	10,13	13,71
CV (%)	18%	34%	10%	14%	15%	21%
Holotúria 1	76,4	30,2	66,7	55,9	73,9	46,3
Holotúria 2	58,4	71,5	72,6	58,5	66,3	69,4
Holotúria 3	45,9	56,6	56,8	78,7	52,0	61,1

Holotúria 4	67,5	69,4	64,0	66,8	76,6	78,6
Holotúria 5	60,7	39,3		70,2	74,7	
Holotúria 6						
Holotúria 7						
Holotúria 8						
Holotúria 9						

Tabela 6- Folha de registo diário para a mortalidade diária, em todos os tanques experimentais.

	04/abr	05/abr	13/abr	20/abr	21/abr	23/abr	24/abr	26/abr	27/abr	28/abr	04/mai	08/mai	Total
Tanque 1					1	1	1	1	1				5
Tanque 2	1		1						1		1		4
Tanque 3	1			1	1							1	4
Tanque 4		1			1		1				1		4
Tanque 5				1		2	1						4
Tanque 6				1	1	1	1			1			5

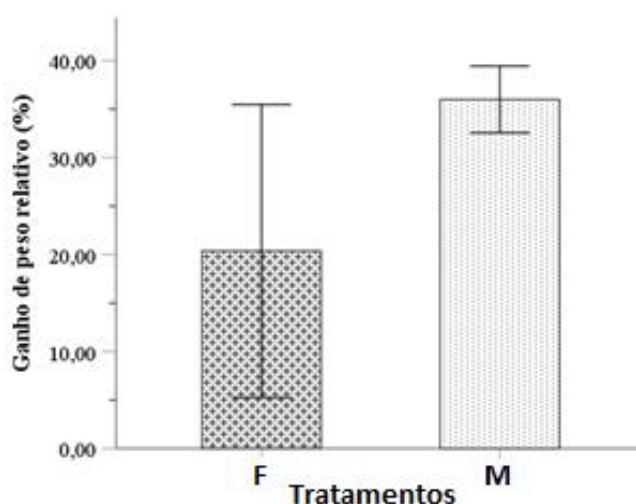


Figura 1- Comparação do ganho de peso relativo (RWG) entre os tratamentos. Em relação a este parâmetro, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (*t-student*, $t_{(4)} = -1,748$, $p\text{-value} = 0,155 > 0,05$) quando comparados os dois tratamentos experimentais.

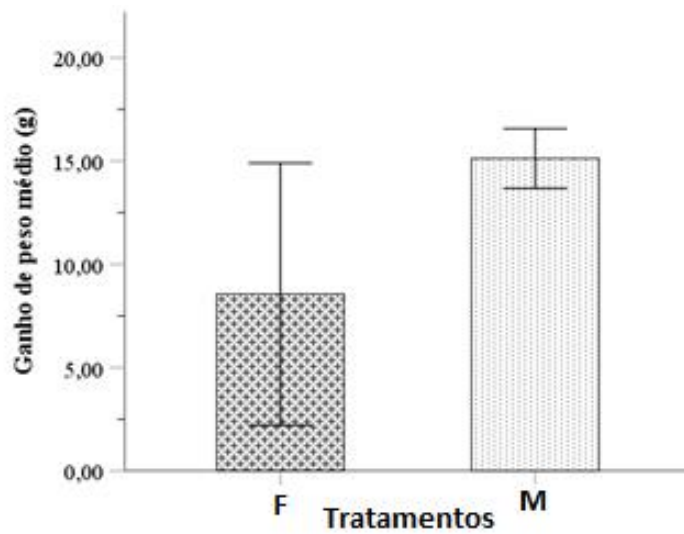


Figura 2- Comparação do ganho de peso médio (WG) entre os tratamentos. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (*t-student*, $t_{(4)} = -1,748$, $p\text{-value} = 0,155 > 0,05$) quando comparados os dois tratamentos experimentais.

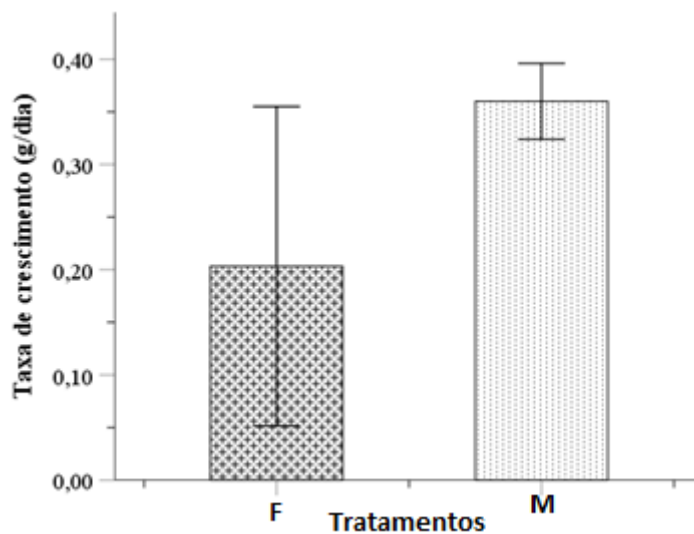


Figura 3- Comparação das taxas de crescimento (GR) entre os tratamentos. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (*t-student*, $t_{(4)} = -1,740$, $p\text{-value} = 0,157 > 0,05$) quando comparados os dois tratamentos experimentais.