

**Reprodução, Desenvolvimento larvar e Crescimento juvenil de
Patella depressa em Laboratório**

Ruben Alexandre da Silva Rebouta

2022

**Reprodução, Desenvolvimento larvar e Crescimento juvenil de
Patella depressa em Laboratório**

Ruben Alexandre da Silva Rebouta

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do
Doutor Paulo Maranhão e Professora Especialista Teresa Baptista

[2022]

Reprodução, Desenvolvimento larvar e Crescimento juvenil de *Patella depressa* em
Laboratório

Copyright © Ruben Rebouta

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

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

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal otimizar técnicas de reprodução para a *P. depressa*, bem como estudar o desenvolvimento larvar e crescimento juvenil desta espécie em laboratório, avaliando as suas épocas de maturação sexual e variações anuais do tamanho dos oócitos por meios histológicos, e recorrendo a ensaios de fecundação e manutenção larvar. Para tal foram recolhidos indivíduos com tamanho >2cm mensalmente e realizados ensaios em laboratório utilizando a concentração de esperma ideal conhecido nas *Patella* spp de 10^6 a 10^8 /espermatozoides/ml, e variando as concentrações de oócitos/ml (30,33; 264,67; 436,67 e 555 oócitos/ml), e simultaneamente tentar fornecer uma resposta rápida entre ensaios numa tentativa de otimizar o cultivo.

Com este estudo foi possível confirmar a sua capacidade de desova constante como população e encontrar os intervalos de maturação para a zona centro de Portugal, nos ensaios realizados foram observados valores satisfatórios, na taxa de fertilização (12,62%, 36,59%, 8,58% e 23,81%) e eclosão (42,86%, 43,90% e 56,14%), no entanto são necessários mais estudos que verifiquem os valores obtidos bem como a necessidade de testar outras variáveis que possam influenciar estas épocas.

Palavras-Chave: *Patella depressa*; reprodução; fecundação; desenvolvimento larvar; histologia.

ABSTRACT

This study had as main objective optimizing reproduction methods for the *P.depressa*, as well as studying the larvae development and juvenile growth in lab, evaluating their seasons of sexual maturation and annual variations of the oocyte size thru histological methods, also doing fertilization and larvae rearing trials. To do so, adult individuals with a size > 2cm were monthly gathered for histological purposes, the trials made in this study used the known ideal sperm concentration of the *Patella* sp. of 10^6 a 10^8 sperm/ml and, testing different oocyte concentration (30,33; 264,67; 436,67 e 555 oocyte/ml), while trying to give quick responses in the trials with the purpose of optimizing it.

With the present study it was possible to confirm the spawning capability of it happening year long, as well as studying their main spawning seasons for the center of Portugal zone, in the trials that were made, the results were satisfying in the fecundity rate (12,62%, 36,59%, 8,58% e 23,81%) and hatching rate (42,86%, 43,90% e 56,14%), although it's believed to be necessary further data to verify these values as well as testing other variables that can have an impact on the spawning seasons.

Keywords: *Patella depressa*; reproduction; fecundity; larvae rearing; histology.

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xi
Introdução	1
Material e métodos.....	7
2.1 Amostragem.....	7
2.2 Análise Histológica	8
2.2.1 Preparação das amostras.....	8
2.2.2 Ciclo Reprodutivo.....	10
2.2.3 Diâmetro dos Oócitos	12
2.3 Reprodução e Crescimento em Laboratório.....	12
2.3.1 Obtenção de gâmetas	12
2.3.2 Fertilização	15
2.3.3 Cultivo Larvar	15
2.3.4 Manutenção de Microalgas e Biofilme	17
2.4 Ensaios de Reprodução em Cativoiro	18
Resultados	21
3.1 Ciclo Reprodutivo.....	21
3.2 Diâmetro dos oócitos.....	25
3.3 Ensaios de Reprodução em Cativoiro	26
Discussão	29
Conclusão e Perspetivas Futuras.....	33
Referências.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfologia do corpo de <i>Patella depressa</i> . (1) Manto . (2) Cavidade do manto. (3) Branquias Paleais. (4) Aorta. (5) Veia Paleal. (6) Pé. Adaptado de Smith (2020).	3
Figura 2 Ilustração do ciclo de vida de <i>Patella</i> . 1- Adultos em desova; 2- Oócito não fecundado; 3- Oócito Fecundado com extrusão do corpo polar; 4- Trocófora; 5- Veligera; 6- Pediveligera; 7- Pediveligera com protoconcha; 8- Adulto; Fotografias 3,6 e 7 por Guallart (2020).	6
Figura 3 Mapa do local de recolha (área delimitada a vermelho) dos indivíduos adultos <i>Patella depressa</i> (Atouguia da Baleia, Portugal).	7
Figura 4 Fotografia de um corte histológico de uma fêmea de <i>Patella depressa</i> . OV- Ócito Vitelogénico; OA- Oócito em Atresia; OP- Oócito Pré-vitelogénico; TC- Tecido Conjuntivo; EV- Espaço Vazio; Escala de 100 µm.	12
Figura 5 Gónadas de <i>Patella depressa</i> . (A) gónada de um macho, (B) gónada de uma fêmea.	13
Figura 6 Ilustração esquemática da grelha da câmara de Neubauer.	14
Figura 7 Fotografia do cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.	17
Figura 8 Variação mensal da frequência dos estágios de maturação gonadal em fêmeas de <i>Patella depressa</i>	22
Figura 9 Variação mensal da frequência dos estágios de maturação gonadal em machos de <i>Patella depressa</i>	22
Figura 10 Variações mensais no índice gonadal populacional das fêmeas recolhidas de <i>Patella depressa</i>	24
Figura 11 Variações mensais no índice gonadal populacional dos machos recolhidos de <i>Patella depressa</i>	24
Figura 12 Variação mensal da frequência do diâmetro os oócitos de <i>Patella depressa</i> ao longo do ano. N, número de oócitos; X, média do diâmetro dos oócitos ± desvio-padrão.	26

INTRODUÇÃO

A aquacultura tem sido um dos setores com maior desenvolvimento económico nos últimos anos, estando incluída a produção de algas, peixes, moluscos e crustáceos. Desde aquacultura para fins alimentares a farmacêuticos e aquariofilia, esta atividade possui um potencial verdadeiramente multifacetado. Tendo em conta o aumento na procura de produtos proteicos frescos e de qualidade, os benefícios ecológicos de produção aquícola são inigualáveis quando comparados com outros métodos de produção de proteína, como a produção de gado e pecuária (Love *et al.*, 2017). A importância da aquacultura é realçada quando se compara com um gigante da economia global que é o setor das pescas. A exaustão de stocks, devido à sobrepesca é um problema emergente, tanto em termos ecológicos como económicos, e para o qual a aquacultura tem vindo a atenuar (Asche & Smith, 2018). A captura de espécies ecologicamente importantes ou juvenis tem um impacto negativo no ecossistema.

A aquacultura de moluscos tem um grande peso comercial sendo o segundo maior grupo produzido contribuindo com 17,7 milhões de toneladas e representando 21,6% da produção total de animais marinhos. Esta produção teve um valor anual de 34,6 mil milhões de dólares, no ano de 2018, representando 13,8% do valor comercial total, mostrando assim a sua relevância neste sector (FAO, 2020). De todas as espécies de moluscos apenas 102 são registadas como espécies com valor comercial importante, entre estas as mais produzidas são várias espécies de ostras (*Crassostrea* sp.) representando 29,5% da totalidade dos moluscos, amêijoa-japonesa (*Ruditapes philippinarum*) com 23,6%, vieiras (*Pectinidae* sp.) representando 11% e outros moluscos onde se encontra o abalone (*Haliotis* sp.) e, em escala piloto, algumas espécies de lapas (*Patella* sp.; *Cellana* sp.; *Lottia* sp.) com uma percentagem de 9,9% (Guo *et al.*, 2009; FAO, 2020).

A produção de moluscos em Portugal, no ano de 2019, foi 46,6% sendo maioritariamente a produção de amêijoas com 3.276 toneladas seguida da produção de ostras com 1.690 toneladas e por fim a produção de mexilhão com 1.457 toneladas. Comparativamente com o ano de 2018 houve uma redução de 28,9% na produção de moluscos em Portugal, o decréscimo foi justificado pelo fecho de estabelecimentos em *offshore* no ano 2018 que se veio a refletir no ano de 2019 (DGRM, 2021)

Muitos dos moluscos gastrópodes marinhos têm o seu valor relacionado com as características estéticas da valva do organismo sendo comercializados por colecionadores e entusiastas de aquarofilia um pouco por todo o mundo, no entanto existem também alguns que são recolhidos não só pelas valvas, mas também pela sua carne (Lucas & Southgate, 2012).

Populações saudáveis de lapas conseguem manter densidades elevadas no meio selvagem e uma vez que são reprodutores sazonais, mantêm uma fecundidade elevada enquanto crescem rapidamente. Estas características tornam este grupo de organismos candidato a ser estudado para produção em aquacultura de larga escala (Hua *et al.*, 2012). É de notar que tem havido uma tendência crescente na investigação do potencial do cultivo de lapas (Ferranti *et al.*, 2018), sendo estas uma boa fonte alimentar já consumidas um pouco por todo o mundo, em maior quantidade na Califórnia (Erlandson *et al.*, 2010), Havai (Morrison *et al.*, 2007), Açores (Hawkins *et al.*, 2000) e Chile (Olivares-Paz *et al.*, 2006).

Lapas do género *Patella* são moluscos gastrópodes, herbívoros que se alimentam de superfícies cobertas de biofilme constituído por microrganismos, detritos e resíduos algais (Silva *et al.*, Ré, 2003; Brazão, 2009). Habitam substratos rochosos em zonas costeiras do mar Mediterrâneo e na zona este do oceano Atlântico formando comunidades na zona médio litoral e infralitoral (Coleman *et al.*, 2006; Casal *et al.*, 2018). Têm um papel ecologicamente fundamental de controlo de coberturas algais substratos presentes nas zonas costeiras, como estudado por Lorenzen *et al.* (2007) com a *Patella vulgata* no controlo da alga *Ascophyllum nodosum*, mostrando também que estes organismos são mais ativos durante o período noturno, o que irá, indiretamente, inibir ou promover o crescimento da flora e fauna presente (Jenkins *et al.*, 2005; Vafidis *et al.*, 2020).

Podem ainda servir de biomonitores, acumulando metais pesados e poluentes orgânicos nos seus tecidos moles, auxiliando assim em avaliações de cargas de contaminantes presentes no ecossistema e qual a sua relevância ecotoxicológica (Reguera *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2019). Esta característica mostra a sua relevância quando relacionada com as zonas em que habita, uma vez que estas são locais ricos em nutrientes que proporcionam condições essenciais à desova, desenvolvimento larvar e crescimento para inúmeras espécies (Neumann *et al.*, 2015). Algumas espécies deste género encontram-se em declínio populacional como consequência de sobre-exploração, dado à facilidade de captura à mesma pelo ser humano, e utilização na gastronomia local ou como isco para pesca,

reduzido, conseqüentemente, a taxa de reprodução pois a fecundidade é superior em organismos de maior tamanho, criando uma preocupação de conservação biológica (Fenberg & Roy, 2008).

Em Portugal são encontradas quatro espécies deste género, *Patella rustica*, *Patella ulyssiponensis*, *Patella vulgata* e a *Patella depressa* (Figura 1), sendo a última a espécie dominante nas zonas costeiras continentais (Silva *et al.*, 2003). *P. depressa* é um molusco gastrópode da família Patellidae, considerado semi-séssil realizando pequenas deslocações na área ao redor do seu local de fixação. Este comportamento serve para evitar a morte por dissecação, reduzir a chance de ser predada enquanto defende o seu território, para retornarem ao seu local de fixação, estas seguem o trilho de muco que liberta enquanto se desloca (Henriques *et al.*, 2017). O seu crescimento populacional está constantemente dependente de fatores externos como disponibilidade de alimento, distribuição vertical e marés, e tal como noutros moluscos competição por espaço, densidade populacional e predação (Clarke *et al.*, 2004).

O que distingue *P. depressa* das restantes do mesmo género são os cílios paliais esbranquiçados quase opacos e mais extensos quando comparados com as restantes, o seu pé tem uma cor que pode ir de castanho-escuro a preto conferindo-lhe o seu típico nome comum inglês de “*black-footed limpet*” e por fim o interior da valva tem pequenas manchas castanhas escuras junto às extremidades exteriores da valva, conferindo quase um efeito de raios que convergem para o centro da valva, centro este que pode ir de um esbranquiçado a branco (Smith, 2020).



Figura 1. Morfologia do corpo de *Patella depressa*. (1) Manto. (2) Cavidade do manto. (3) Brânquias Paleais. (4) Aorta. (5) Veia Paleal. (6) Pé. Adaptado de Smith (2020).

A espécie em estudo, *Patella depressa*, de acordo com a base de dados Worms (2022) tem a seguinte posição sistemática:

Reino Animalia

Filo Mollusca

Classe Gastropoda

Subclasse Patellogastropoda

Superfamília Patelloidea

Família Patellidae

Género *Patella*

Espécie *Patella depressa* Pennant, 1777

Esta espécie habita a zona nordeste do atlântico desde o Senegal, as costas ocidentais da península Ibérica, França até ao norte do País de Gales (Trigo *et al.*, 2018). Tende a existir um decréscimo da população em locais cujas temperaturas atingem valores abaixo de 8°C, comum na Inglaterra durante o mês de fevereiro (Smith, 2020). Tem preferência a habitar poças pouco profundas com substrato rochoso, é caracterizada por de produzir valvas de baixa profundidade, embora em locais como na costa portuguesa possa apresentar uma maior variabilidade, podendo chegar a produzir valvas semelhantes às produzidas pela *P. vulgata*, tal como o nome científico indica “depressa” do latim significando achatado, do inglês “depressed”.

O seu sistema reprodutivo consiste na gónada presente na massa visceral e um ducto gonadal ligado ao nefrídio direito, não apresentam dimorfismo sexual. O que significa que a identificação do sexo é apenas possível por sacrifício do organismo e observação microscópica ou macroscópica (pela cor da gónada). Os machos apresentam uma cor rosa alaranjada enquanto as fêmeas apresentam uma cor verde acastanhada. A libertação dos gametas para o meio é estimulada por ventos e ondulação forte (Brazão *et al.*, 2003).

A maturação das gónadas ocorre em duas alturas específicas do ano, de setembro a novembro e fevereiro a abril, sendo a primeira aquela que apresenta maior taxa de gónadas maturadas, apesar disto verifica-se que ocorrem também pequenas desovas ao longo do ano. (Morais *et al.*, 2003). Estes períodos parecem variar consoante a posição geográfica, como demonstrado por Ribeiro *et al.* (2009). O autor estudou o ciclo reprodutivo das quatro

espécies de *Patella* em Portugal continental (descritas acima) indicando que as épocas de reprodução estão fortemente ligadas com a temperatura no meio que as populações habitam.

Uma vez que a produção em aquacultura das lapas ainda está em desenvolvimento, certas técnicas realizadas para o seu cultivo são feitas com base noutros moluscos, bivalves e gastrópodes, como ostras (família *Ostreidae*) e abalones (*Haliotis* sp.) respetivamente. Existe grande necessidade de otimizar práticas no cultivo de lapas nomeadamente o melhoramento das taxas de fertilização, sobrevivência e crescimento, estas estão diretamente relacionadas com a investigação da capacidade de fixação da lapa ao substrato bem como da qualidade do alimento e do tipo de substrato (Hua *et al.*, 2014).

As larvas fixam-se ao substrato após começarem a desenvolver capacidade de assentamento (entre as 48 e 72h após fertilização) (Figura 2). Neste processo a larva com capacidade natatória direciona-se ao substrato fixando-se ao mesmo caso seja adequado para tal, quando não o é, a larva liberta-se e volta para a coluna de água. Quando a fixação é bem-sucedida as larvas iniciam a sua metamorfose, perdem a capacidade natatória e desenvolvem-se até serem pequenos indivíduos com uma morfologia semelhante à de um adulto onde se mantêm alimentando-se do biofilme presente no substrato. O substrato pode ser de origem rochosa, estruturas antropogénicas ou, como no caso da ostra a própria casca de um adulto, assim, procedendo a uma metamorfose para uma larva pedi velígera, identificável pela presença de um pé rudimentar. Este processo denomina-se de assentamento e o tipo de substrato bem como o biofilme que o reveste tem um grande papel para o sucesso do desenvolvimento larvar (Wallace *et al.*, 2008; Carroll *et al.*, 2015).

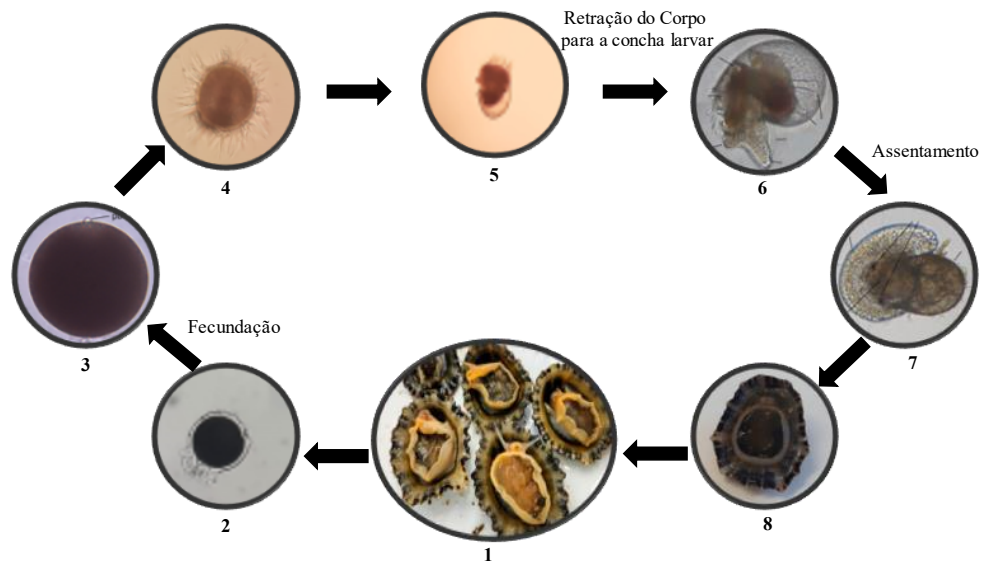


Figura 2. Ilustração do ciclo de vida de *Patella*. 1- Adultos em desova; 2- Oócito não fecundado; 3- Oócito Fecundado com extrusão do corpo polar; 4- Trocófora; 5- Velígera; 6- Pedi velígera; 7- Pedi velígera com protoconcha; 8- Adulto; Fotografias 3,6 e 7 por Guallart (2020).

Esta dissertação tem como objetivo otimizar técnicas de reprodução para *P. depressa*, bem como estudar o desenvolvimento larvar e crescimento juvenil desta espécie em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

O local de recolha foi na Atouguia da Baleia, Porto Batel (39°19'10.34''N; 9°21'18.15''W) (Figura 3), uma praia rochosa que devido às suas características (sendo o acesso ao local por estradas não alcatroadas e o único acesso à praia em si é por escadas degradadas das condições atmosféricas) não apresenta, visualmente, grandes impactos de origem humana. Os indivíduos de espécie *P. depressa*, foram recolhidos cuidadosamente com o auxílio de uma faca de ponta redonda para que estes não sofram lesões durante a recolha. Foram transportados num recipiente com água salgada recolhida no local de modo a manter o nível de humidade até ao laboratório de Biologia do edifício CeteMares (MARE – Politécnico de Leiria), localizado em Peniche.

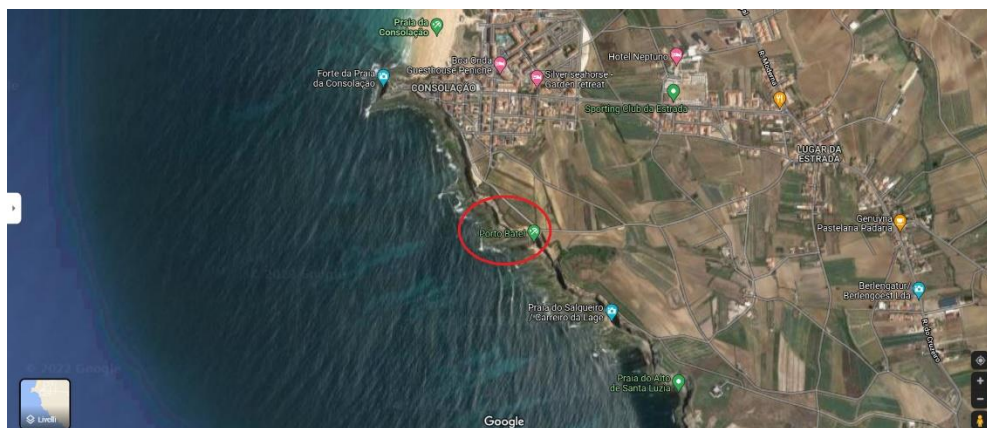


Figura 3. Mapa do local de recolha (área delimitada a vermelho) dos indivíduos adultos *Patella depressa* (Atouguia da Baleia, Portugal).

Foram recolhidos mensalmente de outubro de 2020 a setembro de 2021, inclusive, 50 indivíduos adultos (comprimento da valva > 2cm), para a análise histológica, de modo a garantir que fosse obtido o número mínimo necessário de cada género para a análise (10 machos e 10 fêmeas). Uma vez que só é possível observar dimorfismo sexual naqueles que se encontram num estado de maturação gonadal avançado (observável pela cor do centro do pé, rosa-alaranjado no caso dos machos e castanho-esverdeado no caso das fêmeas), a determinação dos que não apresentaram esta característica só foi possível após a observação da gónada, sendo necessário o sacrifício dos organismos.

Foram recolhidos 20 indivíduos adultos nos meses outubro e novembro de 2020, e, janeiro e maio de 2021 (entre os dias 12 e 17), para realização de ensaios de reprodução em laboratório, tendo sido utilizados entre 2 e 5 indivíduos, dependendo do tamanho das gónadas. O excedente de indivíduos foi devolvido ao local de recolha.

No laboratório são retirados do recipiente de transporte e colocados com o pé virado para cima num tabuleiro de plástico, sendo selecionados os indivíduos de cada género e escolhidos pelo maior rácio gónada/tamanho corporal, possível observar pelo aspeto concavo do pé, por consequência da pressão inserida sob o mesmo dado as suas dimensões.

Todo o material de vidro ou metálico, bem como toda a água utilizada foi esterilizado em autoclave durante 20 min a 121°C de modo a prevenir contaminações.

2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

2.2.1 Preparação das amostras

2.2.1.1 Preparação para processamento de tecidos

Dos 50 indivíduos adultos recolhidos mensalmente, foram escolhidos 10 machos e 10 fêmeas aleatoriamente para análise histológica. O corpo foi separado da valva, com auxílio de uma pinça e um bisturi previamente esterilizados, e removida a massa visceral obtendo uma amostra que é maioritariamente a gónada. As amostras foram então colocadas em formaldeído tamponado a 4% obtido a partir formol tamponado 37% (Labmix – JJMGS, Odivelas, Portugal) e água destilada, calculados os volumes necessários por $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, durante 24h - 48h, sendo depois retirado o formaldeído e substituído por etanol a 70% até à realização da análise histológica.

2.2.1.2 Processamento de tecidos

Para o processamento de tecidos as cassetes histológicas previamente preparadas foram identificadas por sexo, número do organismo e mês de recolha. Estas foram então colocadas no processador de tecidos (Leica, TP 1020, Leica), onde são imergidas em vários álcoois, começando no álcool de concentração mais baixa e aumentando gradualmente (80, 96 e 99%) assim, não danificando os tecidos enquanto estes são desidratados. Após a desidratação as cassetes passam por uma sequência de imersões em xilol permitindo que o álcool presente nos tecidos seja lentamente substituído por este solvente, desta forma os

tecidos iram absorver mais facilmente a parafina. É utilizado um dispensador de parafina (Leica, EG 1120, GMI) para que esta fique em estado líquido. Por fim as cassetes histológicas foram então imergidas na parafina líquida, os tecidos impregnadas com a parafina apresentaram uma textura mais rígida para que possam ser cortados posteriormente.

2.2.1.3 Obtenção de cortes

Após a obtenção dos blocos de parafina onde se encontram as amostras, estes foram refrigerados numa placa fria para que o corte fosse o mais preciso possível (sem relevos), e então cortados com micrótomo (Leica, RM2155, GMI) com uma espessura de 5-7 μm .

2.2.1.4 Coloração dos Tecidos

Para a coloração foi necessário em primeiro eliminar a parafina dos cortes submergindo os cortes, agora em lâminas, em xilol duas vezes com uma duração de 25 min cada, uma onde a parafina é removida em grande quantidade e depois para uma nova tina de xilol para que remova pequenas quantidades que possam persistir dentro dos tecidos. Após removida a parafina é necessário hidratar os tecidos para que estes absorvam eficazmente a coloração, para isto as amostras foram sujeitas a imersões sequencialmente com uma duração de 3 a 5 segundos cada, em diferentes concentrações de etanol de forma decrescente, começando com etanol a 100%, para etanol a 96%, etanol a 70% e por fim etanol a 50% e colocadas então em água destilada por 2 minutos para remover vestígios de etanol. Com as amostras hidratadas foi então possível passar à coloração, começando por submergir as amostras em hematoxilina durante 10min, e deixadas em água corrente com um fluxo lento para remover excesso de corante nos tecidos, de seguida foram submergidas em álcool ácido por 2 min e colocadas novamente em água corrente por 5min para remover todos os vestígios de álcool ácido, por fim submergidos em etanol a 96% por 3 min e de imediato submergidas em eosina por 30 segundos, para concluir submergidos em água corrente de modo a remover excesso de corante presente.

2.2.1.5 Montagem das preparações definitivas

Após coradas são novamente desidratadas de modo a manter a coloração no interior dos tecidos, para este fim colocadas novamente em etanol a 96% seguido de etanol a 100%

12 imersões com uma duração entre 3 a 5 segundos para cada concentração, uma vez desidratadas é necessário remover o etanol de modo a preparar as lâminas para receber o meio de montagem, para isto foram submergidas uma última vez em xilol durante 25min, após o tempo estabelecido foi utilizado DPX (Dibutilftalato de poliestireno xileno) (Merck Chemicals, Germany) como meio de montagem, colocadas as lamelas e deixadas a secar por um período mínimo de 24h obtendo assim uma preparação definitiva.

Após o DPX se encontrar seco as preparações definitivas foram colocadas sob observação de um microscópio ótico (ZEISS, Axio Lab A1, Carl ZEISS Axio) de modo a verificar a sua qualidade e visibilidade, para posterior análise foram também fotografadas utilizando o *software* ZenLab (ZEISS Sem 2.6 Blue Edition) e a câmara digital (ZEISS, AxioCam 105 color, Carl ZEISS Axio), salvaguardando uma versão digital caso as preparações com o tempo mostrassem indícios de contaminação ou acidentes de manuseamento.

2.2.2 Ciclo Reprodutivo

Para identificação do estado de maturação das gónadas, os cortes foram observados ao microscópio ótico (ZEISS, Axio Lab A1, Carl ZEISS Axio) e avaliados de acordo com Prusina (2014), associando valores a cada estágio de maturação para que estes possam ser transformados no índice gonadal populacional, como descrito na Tabela 1. Os indivíduos cujo sexo não foi possível identificar foram identificados como indiferenciado ou maturidade sexual não alcançada. Assim foi possível obter uma apreciação anual do desenvolvimento do ciclo reprodutivo de ambos os sexos e simultaneamente tornando possível o cálculo do índice gonadal de acordo com a seguinte fórmula, como realizado por Prusina *et al.*, 2014:

$$\text{Índice Gonadal Populacional} = \frac{\sum \text{Indivíduo em cada estágio} * \text{Número de estágio}}{\text{Total de indivíduos recolhidos mensalmente}}$$

Tabela 1. Identificação do estado de desenvolvimento gonadal na *Patella rustica*. (Prusina *et al.*, 2014).

Valor do Estágio	Descrição	Macho	Fêmea
0	Inativo		Tecido conjuntivo em quantidade abundante na gónada. Apenas alguns oogónios presentes.
3	Prematuro	Tecido conjuntivo abundante. Uma ou duas camadas de linhas de espermatogónios nos limites das gónadas.	Pequena proliferação de oogónios na <i>acinus wall</i> . Vários oócitos pré-vitelogénicos de vários tamanhos podem ser visíveis. Tecido conjuntivo ainda abundante.
4	Tardio	Camadas de células reprodutivas preenchem o lúmen, estas encontram-se em diferentes estágios de maturação, formando um padrão regular da parede tubular até ao lúmen - espermatogónio, espermatócitos e espermatídios. Caudas dos primeiros espermatozoides encontram-se no lúmen tubular resultando numa coloração rosa do lúmen.	Redução do tecido conjuntivo. Células reprodutivas em diferentes fases de maturação. Menor número de oogónios junto <i>acinus wall</i> . Oócitos pré-vitelogénicos de grande tamanho e um número reduzido de oócitos quase maduros podem estar presentes.
5	Maturo	Túbulos desenvolvidos com apenas uma camada de espermatogónio conectado á parede tubular. Espermatozoides livres preenchem o lúmen. Tecido conjuntivo rosa-claro muito fino e alongado.	Gónadas com oócitos vitelogénicos livres completamente desenvolvidos. Oócitos maduros em atresia ou em lise podem ser encontrados.
1.5	Atresia		Tecido gonadal é abundante, mas a maioria dos oócitos apresentam uma fase avançada de atresia. Poucos oócitos pré-vitelogénicos e vitelogénicos podem estar presentes.
2	Desova	Os túbulos são menores em tamanho e rodeados de tecido conectivo solto e abundante. Grandes células germinativas abundantes dos limites das gónadas. Menor número de espermatozoides dentro dos túbulos.	Redução do número de oócitos vitelogénicos livres no lúmen, alguns a mostrar sinais de atresia. Oócitos pedunculados conectados à <i>acini wall</i> podem ser observados.
1	Gasto	Espesso tecido conjuntivo presente na gónada. Podem ser observados hemócitos no tecido conjuntivo perto de espermatozoide residual.	Gónada mostra sinais de destruição de tecidos. Tecido conjuntivo abundante em redor de <i>acini</i> vazio. Hemócitos podem ser observados no tecido conjuntivo.

2.2.3 Diâmetro dos Oócitos

A partir das preparações histológicas, foi medido o diâmetro de 35 oócitos por fêmea, resultando em 350 medições por mês com exceção nos meses onde foram encontrados indivíduos que a maturidade sexual não foi alcançada, não tendo oócitos para medir. Cada oócito foi medido traçando uma reta entre os dois pontos mais distantes das extremidades do oócito e apenas daqueles que mostrassem núcleo visível (Figura 4).

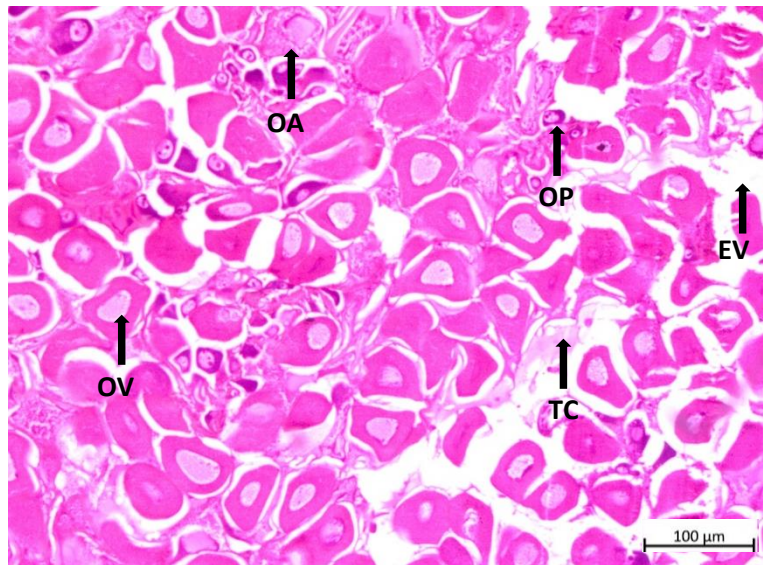


Figura 4. Fotografia de um corte histológico de uma fêmea de *Patella depressa*. OV- Oócito Vitelogénico; OA- Oócito em Atresia; OP- Oócito Pré-vitelogénico; TC- Tecido Conjuntivo; EV- Espaço Vazio; Escala de 100 µm.

2.3 REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO EM LABORATÓRIO

2.3.1 Obtenção de gâmetas

Após a recolha dos 20 indivíduos para o ensaio, procedeu-se à separação da valva do corpo de cada indivíduo e de seguida removidas as gónadas e separadas pelo tipo de gâmeta. Toda a água utilizada durante a obtenção de gâmetas e ensaios tem uma salinidade de 35 e temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ de acordo com os estudos de Pérez *et al.* (2016).

Com o auxílio de um bisturi realizou-se uma ligeira incisão na gónada, esta localiza-se logo acima aos músculos da valva, uma incisão ligeiramente mais profunda pode furar a zona visceral contaminando a amostra. A amostra foi imediatamente colocada em gobelés separados pelo tipo de gâmeta, as gónadas podem ser identificadas pela sua cor, a masculina

apresenta uma cor clara e a feminina uma cor castanha-esverdeada (Figura 5), com 500ml de água salgada esterilizada (Brazão *et al.*, 2003).

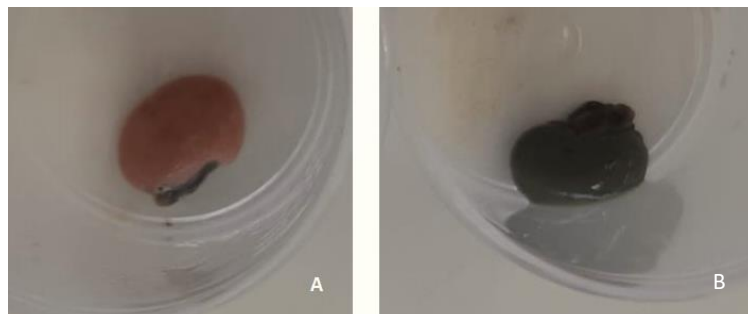


Figura 5. Gónadas de *Patella depressa*. (A) gónada de um macho, (B) gónada de uma fêmea.

Após obtidos os gâmetas de cada organismo foi verificado, ao microscópio ótico (ZEISS, Axio Lab A1, Carl ZEISS Axio), numa câmara de Sedgewick (Wildlife Suply Company, Modelo 1891-A10, USA), o estado de maturação dos oócitos. Quando imaturos têm forma de pera e um córion pouco desenvolvido (Souza *et al.*, 2009). Gónadas que apresentassem oócitos com tais características foram descartadas e substituídas, evitando assim a utilização de oócitos de uma fêmea imatura. Oócitos maduros apresentam um formato quase redondo (uma vez os oócitos observados ainda não teriam sido expostos a água salgada e por isso apresentavam um aspeto desidratado), e com uma camada de córion completamente desenvolvida em redor do mesmo (Souza *et al.*, 2009). Após 30 minutos dos oócitos serem expostos a água salgada são novamente observados ao microscópio ótico de modo a verificar o seu estado, devem ter um aspeto completamente redondo e o córion quase impercetível sendo possível apenas observar uma linha fina junto à célula.

Os oócitos de cada fêmea foram juntos num só gobelé, homogeneizados e passados por um crivo com malhagem de 200 μm , filtrando lixo e impurezas maiores como areia e resíduos do invólucro da gónada, por fim são novamente crivados com um crivo de 45 μm (Peréz *et al.*, 2019) ficando retidos neste e deixando passar impurezas de tamanho inferior, e gentilmente removidos do crivo com água salgada. Uma vez que os oócitos apresentam uma maior densidade que a água salgada, foram ainda realizadas 4-6 decantações removendo partículas em suspensão de tamanho $>45 \mu\text{m}$ e obtendo assim, o menor volume possível, de uma solução concentrada de oócitos (Guallart *et al.*, 2020). Para determinar a concentração de oócitos foi utilizada a câmara de Sedgewick e realizadas 3 contagens de amostras de 1 ml

e realizada a média. As concentrações utilizadas foram de 436,67 (Ensaio 1), 555 (Ensaio 2), 30,33 (Ensaio 3) e 264,67 (Ensaio 4) oócitos/ml.

Os espermatozoides foram crivados com um crivo de 45 µm, uma vez que são células de reduzidas dimensões estes passam no crivo, retendo impurezas que possam estar presentes. A amostra total de espermatozoides é então colocada num gobelé de 500 ml com água salgada, o seu estado de maturação foi avaliado ao microscópio ótico, numa câmara de Neubauer (Heinz Herenz Medizinalbedarf, REF: 1080339, Alemanha). Para a avaliação foram utilizados dois critérios, o nível de motilidade, após terem sido expostos a água salgada por 30 minutos, e a presença/ausência de estruturas em “forma de estrela”. Estas estruturas são aglomerados de espermatídios e são um indicador que os gâmetas presentes na gónada podem não estar completamente desenvolvidos (Guallart *et al.*, 2020; Ferranti *et al.*, 2021).

A amostra de espermatozoides obtida foi então diluída num volume de 1:10 (1 parte amostra para 10 partes água salgada). Para determinar a concentração foi utilizada a câmara de Neubauer, utilizando lugol de modo a fixar os espermatozoides e realizadas 3 contagens de amostras de 20 µL, extrapolando depois o resultado para obter o valor por ml. Contando os quadrados maiores A, B, C e D (Figura 6) repetindo três vezes e realizada a média e aplicando a seguinte fórmula:

$$x = \frac{A+B+C+D}{4} \times 10^4 = \dots 10^6 \text{ cel/ml}$$

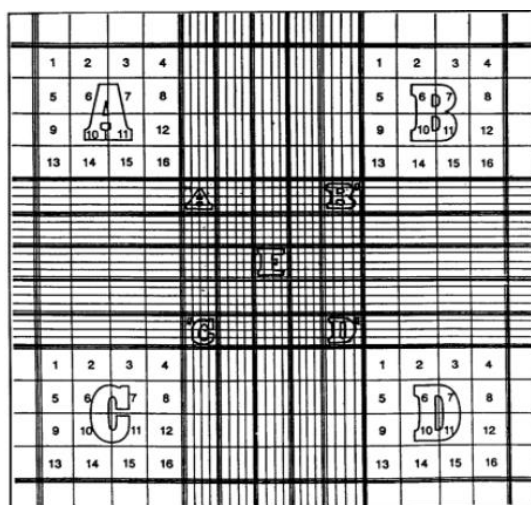


Figura 6. Ilustração esquemática da grelha da câmara de Neubauer. Retirado de Ferreira (2009).

A concentração de esperma utilizada em *Patella* sp. foi de 6×10^5 a 10^8 espermatozoides/ml sendo este o valor adequado para não ocorrer polispermia durante a fecundação enquanto mantém elevadas taxas de fertilização (Smaldon & Duffus 1985; Souza *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2019; Guallart *et al.*, 2020). As concentrações utilizadas foram de $1,46 \times 10^6$ (Ensaio 1), $7,85 \times 10^5$ (Ensaio 2), $7,58 \times 10^5$ (Ensaio 3) e $1,57 \times 10^6$ (Ensaio 4) espermatozoides/ml.

2.3.2 Fertilização

Foram então misturados 90 ml da solução concentrada de oócitos com 10 ml da solução de espermatozoides num gobelé onde ocorreu a fertilização. Após 3h a solução é crivada com um crivo de 45 μ m retendo os oócitos e removendo o excesso de esperma, diminuindo assim a probabilidade de ocorrer polispermia por exposição prolongada (Ferranti *et al.*, 2018; Guallart *et al.*, 2020). Após crivados, os oócitos foram colocados em 500 ml de água salgada, e foi removido 1 ml desta solução e colocada numa câmara de Sedgwick onde foi contabilizado o número de oócitos fertilizados, sendo identificados pela presença do corpo polar na parede do oócito, e então utilizada para calcular a taxa de fertilização recorrendo ao seguinte cálculo:

$$\text{Taxa de Fertilização} = \frac{\text{Número de ovos fertilizados}}{\text{Número total de ovos}} \times 100$$

2.3.3 Cultivo Larvar

Foram distribuídos em média, 80 oócitos fertilizados para cada gobelé, para um total de 6 gobelés (réplicas) com 300 ml de água salgada. Sendo cinco réplicas para o ensaio, e uma réplica utilizada para observar o desenvolvimento larvar ao longo do tempo no microscópio ótico.

Estes gobelés preparados após a fertilização foram mantidos a temperatura controlada $19 \pm 1^\circ\text{C}$, sala com controlo de temperatura (Ensaio 1, 2 e 3) ou numa câmara climática (Ensaio 4), sem arejamento durante as primeiras 24h após a fertilização minimizando a turbulência da água permitindo a deteção de larvas acabadas de eclodir caso surjam antes das 24h, o nível de oxigénio presente no meio é suficiente para a sobrevivência

das mesmas. Após as 24h o meio é homogeneizado gentilmente e, de modo a contabilizar e analisar o crescimento larvar registando a fase larvar que cada organismo se encontra, foram recolhidas 3 amostras de 1 ml (correspondentemente a 1% do volume do meio) de cada réplica, com estes dados é possível calcular a taxa de eclosão por:

$$\text{Taxa de Eclosão} = \frac{\text{Número de larvas trocóforas}}{\text{Número inicial de ovos fertilizados}} \times 100$$

Após a contagem às 24h foi adicionado arejamento fraco uma vez que começaram então a aparecer as primeiras larvas trocóforas com capacidade natatória. Estas foram recolhidas à medida que iam surgindo, e colocadas em 5 novos gobelés com 300 ml de água salgada e um substrato de valvas de *P. depressa* cobertas com um biofilme previamente preparado (ver ponto 2.3.4) à mesma temperatura e com arejamento fraco. 48h após a fertilização todas as restantes larvas eclodidas foram colocadas nos gobelés com o substrato e os gobelés iniciais descartados. Deste modo, oócitos em decomposição e larvas mortas que podem aumentar a toxicidade no meio, não comprometeram o desenvolvimento saudável das trocóforas. As transferências foram efetuadas com o auxílio de uma micropipeta com pontas esterilizadas e utilizado um recipiente intermédio para garantir que não seriam transferidos quaisquer tipos de lixo acidentalmente e evitando a perda de organismos durante o maneo.

Estas larvas trocóforas foram alimentadas com a microalga *Dunaliella* sp. num volume de 20 μ L por cada 5 larvas eclodidas. O cultivo das microalgas encontrava-se a uma concentração de 2×10^6 células/ml, fornecido como alimento suplementar uma vez que as larvas são lecitótroficas.

24h após a fertilização, foram removidas 3 amostras de 1 ml de 2h em 2h, por um período total de 6h, da sexta réplica, mantendo assim uma observação regular do desenvolvimento larvar, sem interferir na concentração das restantes réplicas utilizadas para o ensaio.

Uma vez que se trata de um cultivo fechado sem renovação de água, foi ainda realizado uma troca parcial de água de 10%, sempre para um gobelé intermédio autoclavado com fundo preto de modo a não perder organismos. Estas trocas começaram a ser feitas 24h após fertilização e foram realizadas diariamente até ao final dos ensaios.

2.3.4 Manutenção de Microalgas e Biofilme

Foi mantido um cultivo auxiliar de *Dunaliella* sp. (Figura 7) de modo a obter uma concentração de microalgas suficiente para alimentação das larvas trocóforas. As culturas foram mantidas em balões volumétricos de 250 ml sendo o volume destes aumentado gradualmente (*scale-up*) até balões volumétricos de 1 litro. A partir deste volume foram feitas repicagens semanalmente, mantendo um inóculo de 1/3 do meio concentrado e adicionado 2/3 de água salgada autoclavada, foi ainda adicionado 1,5 ml de um meio de cultivo comercial (Nutribloom), Todo o material utilizado nesta manutenção foi autoclavado e as repicagens realizadas em ambiente asséptico de modo a evitar contaminações do cultivo. Foram mantidos 2 balões volumétricos por segurança no caso de um dos balões ser contaminado com outra microalga.



Figura 7. Cultivo de *Dunaliella* sp.

Foi produzido um biofilme de *Skeletonema* sp. num gobelé de 600 ml, desses 600 ml 300 ml foram provenientes dum gobelé de cultivo desta mesma microalga e 300 ml de água salgada previamente autoclavada numa sala de temperatura controlada a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ e com um fotoperíodo controlado (12h luz/ 12h escuro) e adicionadas as valvas para que o biofilme se pudesse desenvolver na sua superfície, foi utilizado um outro biofilme, este foi produzido num sistema de crescimento de *Holothuria arguinensis*, e foi se desenvolvendo ao longo do tempo nas paredes dos aquários do sistema em causa, para o seu desenvolvimento foi adicionado semanalmente *Saccorhiza polyschides* em pó e um suplemento de nutrientes (proveniente do produto comercial Algamac 3050), mantido numa sala de temperatura, um fotoperíodo controlado (12h luz/ 12h escuro), com arejamento fraco e água salgada autoclavada. Para ser utilizado nos ensaios foi então removida uma pequena amostra do

biofilme onde foi mantido numa sala de temperatura e luz controlada. Após 1 semana da inoculação do biofilme foram adicionadas as valvas de *P. depressa*, previamente lixiviadas e deixadas em água destilada durante pelo menos 24h, para que o biofilme se possa desenvolver na sua superfície.

2.4 ENSAIOS DE REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO

Foram realizados 4 ensaios em laboratório, uma vez que a concentração ideal de *Patella* já foi extensivamente estudada, foi utilizada uma concentração de 6×10^5 a 10^8 espermatozoides por ml (Souza *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2016), sendo esta a ideal de modo a evitar polispermia. A concentração ideal de oócitos é pouco mencionada, descrevendo na maioria dos casos apenas o número de fêmeas utilizadas, por essa razão a concentração de oócitos nos ensaios realizados que foi utilizada encontra-se entre 30,33 e 555 oócitos por ml, com o objetivo de descobrir a concentração ideal de oócitos para o intervalo de concentração ideal de espermatozoides (Tabela 2).

Tabela 2. Mês de recolha dos adultos e concentração dos gâmetas utilizada em cada ensaio.

	Mês de Recolha	Concentração de Espermatozoides/ml	Concentração de Oócitos/ml
Ensaio 1	Novembro 2020	$1,46 \times 10^6$	436,67
Ensaio 2	Dezembro 2020	$7,85 \times 10^5$	555
Ensaio 3	Janeiro 2021	$7,58 \times 10^5$	30,33
Ensaio 4	Mai 2021	$1,57 \times 10^6$	264,67

Numa tentativa de otimizar as técnicas de reprodução em cativeiro, de ensaio para ensaio foram realizadas alterações como resposta rápida com o intuito de obter melhores taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência larvar (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela descritiva das alterações realizadas entre ensaios.

	Início de alimentação (Horas após fecundação)	Troca de gobelé às 48h	Troca de gobelé às 72h	Substrato utilizado às 72h	Volume de alimento fornecido
Ensaio 1	24	-	-	Biofilme de <i>Skeletonema</i> sp.	5 µL por larva eclodida
Ensaio 2	2	-	-	-	100 µL
Ensaio 3	24	-	X	Valvas	5 µL por larva eclodida
Ensaio 4	24	X	X	Biofilme do sistema das holotúrias + Valvas	5 µL por larva eclodida

No ensaio 1, foi adicionado o alimento pela primeira vez 24h após a fertilização, e foi adicionado alimento (*Dunalliella* sp.) mediante o número de larvas eclodidas, foi fornecido diariamente 20 µL por cada 5 larvas eclodidas. Às 72h foi adicionado pequenos pedaços de biofilme de *Skeletonema* sp. aos gobelés de cultivo.

Perante o primeiro ensaio, foram observadas larvas eclodidas antes das 24h após fecundação, por isso como resposta rápida para o ensaio 2, o alimento foi fornecido logo 2h após fecundação, num volume de 100 µL, assim larvas acabadas de eclodir já teriam alimento disponível. Uma vez que não foram encontradas larvas eclodidas, não foi possível prosseguir o restante protocolo.

Uma vez que não foram encontradas larvas eclodidas no ensaio 2, para o ensaio 3 o alimento voltou a ser fornecido apenas às 24h, num volume de 20 µL por cada 5 larvas eclodidas. Ainda no ensaio 3, às 72h após fecundação em vez de adicionar o biofilme e/ou substrato aos gobelés de cultivo, as larvas que eclodiram até esta hora foram mudadas para novos gobelés, com mesmo número de réplicas, os mesmos parâmetros de cultivo, e o substrato (neste caso valvas de *P. depressa*). Neste ensaio não foi adicionado biofilme.

Por fim o ensaio 4, o fornecimento de alimento não foi alterado relativamente ao anterior. As larvas eclodidas antes das 48h após a fertilização, foram mudadas para um novo gobelé com os mesmos parâmetros de cultivo, este procedimento foi adicionado para separar larvas recém eclodidas de detritos de oócitos não eclodidos e/ou em decomposição. Por fim às 72h foram novamente mudadas para um novo gobelé, este com as valvas como substrato, estas já devidamente cobertas pelo biofilme recolhido do sistema das holotúrias.

RESULTADOS

3.1 CICLO REPRODUTIVO

A partir da análise histológica foi possível verificar que, em *P. depressa*, observaram-se fêmeas em fase de desova ao longo de todo o ano (Figura 8). Foi possível observar fêmeas com as gónadas maduras à exceção dos meses de maio, setembro, novembro e dezembro, no entanto havendo fêmeas em desova ao longo do ano é certo que haja um mínimo de fêmeas maduras. No mês de dezembro foi registado o maior número de fêmeas com gónadas na fase inativa. Apesar de *P. depressa* mostrar várias desovas ao longo do ano apresenta uma maior concentração de fêmeas maduras em outubro, com uma percentagem de 50% e com duas épocas de maturação gonadal evidente de janeiro a abril e novamente de julho a agosto, os dois meses onde se recolheu maior número de fêmeas maduras foi em outubro e junho atingindo os 50%. Apenas em setembro foram observadas fêmeas em atresia com uma percentagem de 20%.

Relativamente aos machos (Figura 9), os períodos de maturação gonadal observados são semelhantes aos das fêmeas, mostrando gónadas maduras de janeiro a abril e de junho a junho, a frequência de gónadas maduras atingiu valores máximos em fevereiro com 40%. Tal como nas fêmeas, com exceção de fevereiro, consegue-se observar indivíduos com gónadas em desova em todos os meses, com o máximo encontrado em julho com uma percentagem de 70%. É possível encontrar gónadas em estágio tardio (quase maduras), em todos os meses com exceção em dezembro.

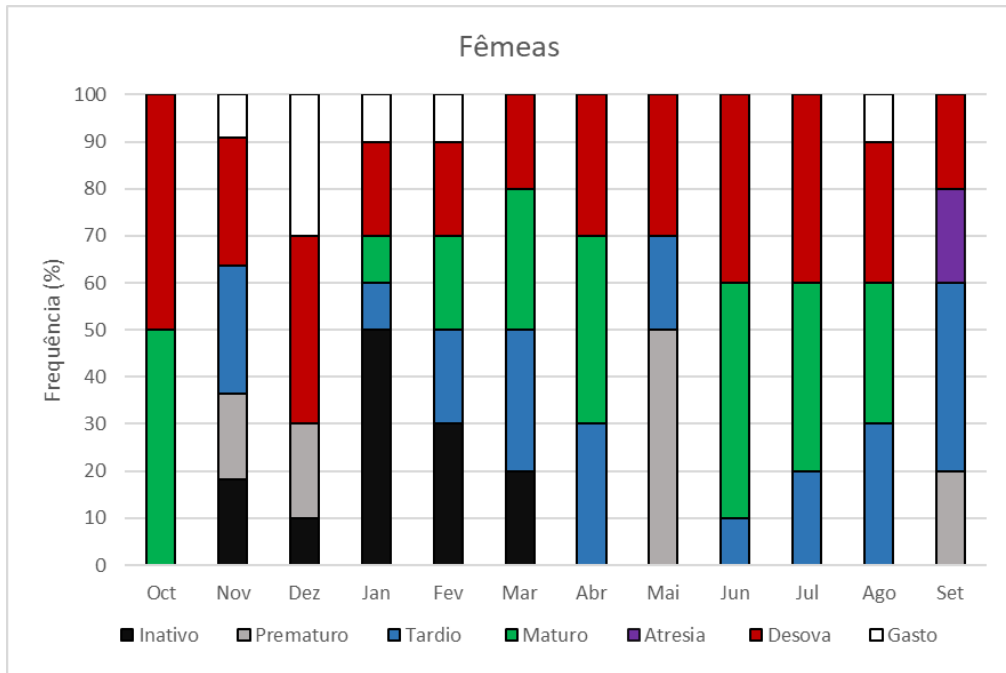


Figura 8. Variação mensal da frequência dos estágios de maturação gonadal em fêmeas de *Patella depressa*.

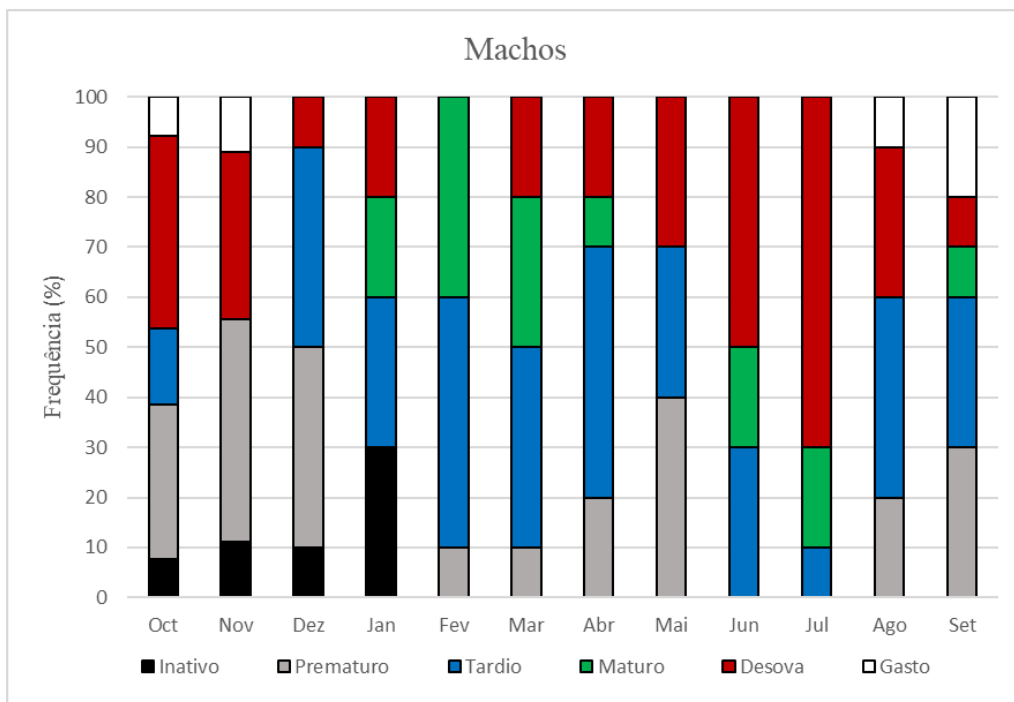


Figura 9 Variação mensal da frequência dos estágios de maturação gonadal em machos de *Patella depressa*.

O cálculo do índice gonadal da população é utilizado obter uma leitura simplificada de quando as gónadas se encontram maduras dentro da população, os valores estão compreendidos entre zero (população inteira com gónadas inativas) e 5 (população inteira com gónadas maduras).

O índice gonadal da população das fêmeas recolhidas resultou numa média $2,88 \pm 0,77$ variando entre 1,4 em janeiro, já dentro da primeira época de maturação, este valor pode ser considerado baixo pela elevada percentagem de fêmeas com gonadas inativas de 50% neste mês, e 3,8 em abril correspondendo ao último mês da segunda época de maturação. Observando a figura 10, é possível verificar as oscilações no índice, mostrando também que apesar de mostrar mais facilmente as duas épocas de maturação, na primeira (janeiro a abril) apenas os dois últimos meses estão mais evidentes por este meio uma vez que fevereiro e janeiro encontram-se abaixo de 3 (março e abril). Já a segunda época encontra-se melhor delineada havendo uma evidencia de maior número de fêmeas maduras na população apresentando valores acima de 3,5 durante os meses de junho e julho, e apenas ligeiramente abaixo, agosto com 3,4.

No caso dos machos, o valor médio do índice gonadal populacional obtido foi de $3,05 \pm 0,58$, o valor mínimo obtido foi em outubro com 2,38 e o valor máximo em fevereiro com 4,3, o valor máximo está compreendido dentro da primeira época de maturação o que seria o expectável e estes valores mantêm-se elevados até abril, correspondendo corretamente com a primeira época de maturação, apesar de na segunda época os valores mostrarem-se mais baixos com valores de 3,2, 2,8 e 2,9 para os meses de junho, julho e agosto respetivamente, estes continuam a ser valores mais altos quando comparadas aos meses fora dos dois intervalos de maturação como é possível observar na figura 11.

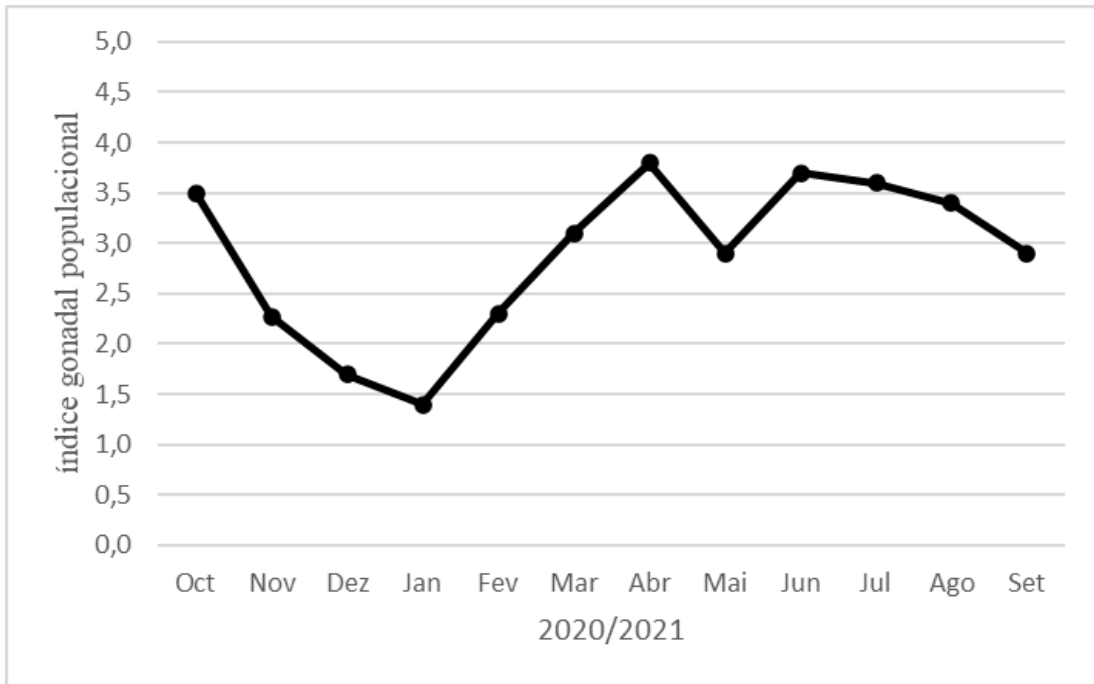


Figura 10. Variação mensal no índice gonadal populacional das fêmeas recolhidas de *Patella depressa*.

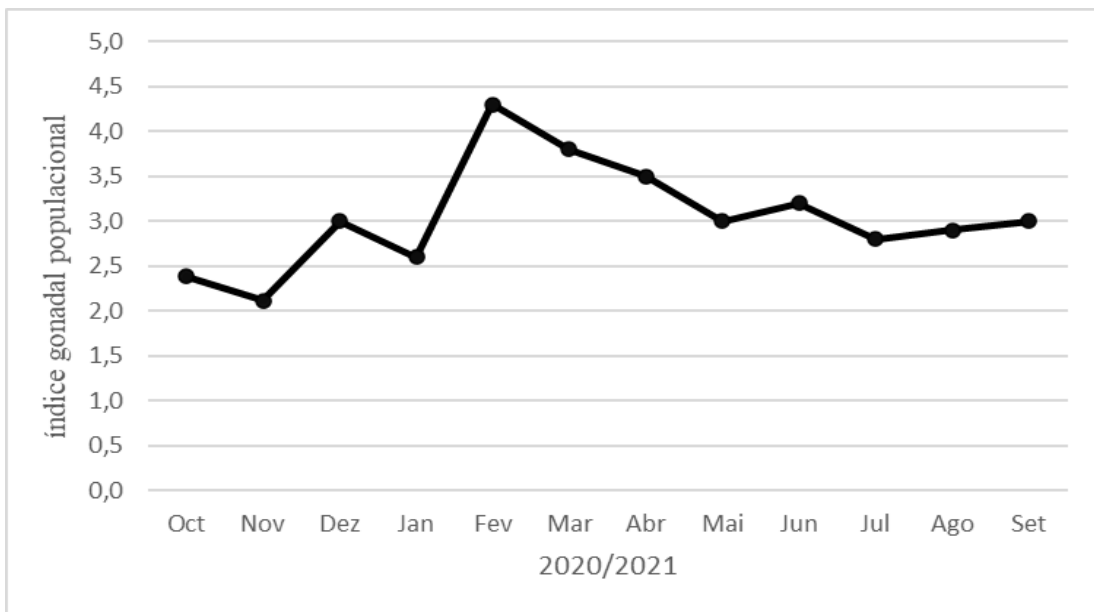
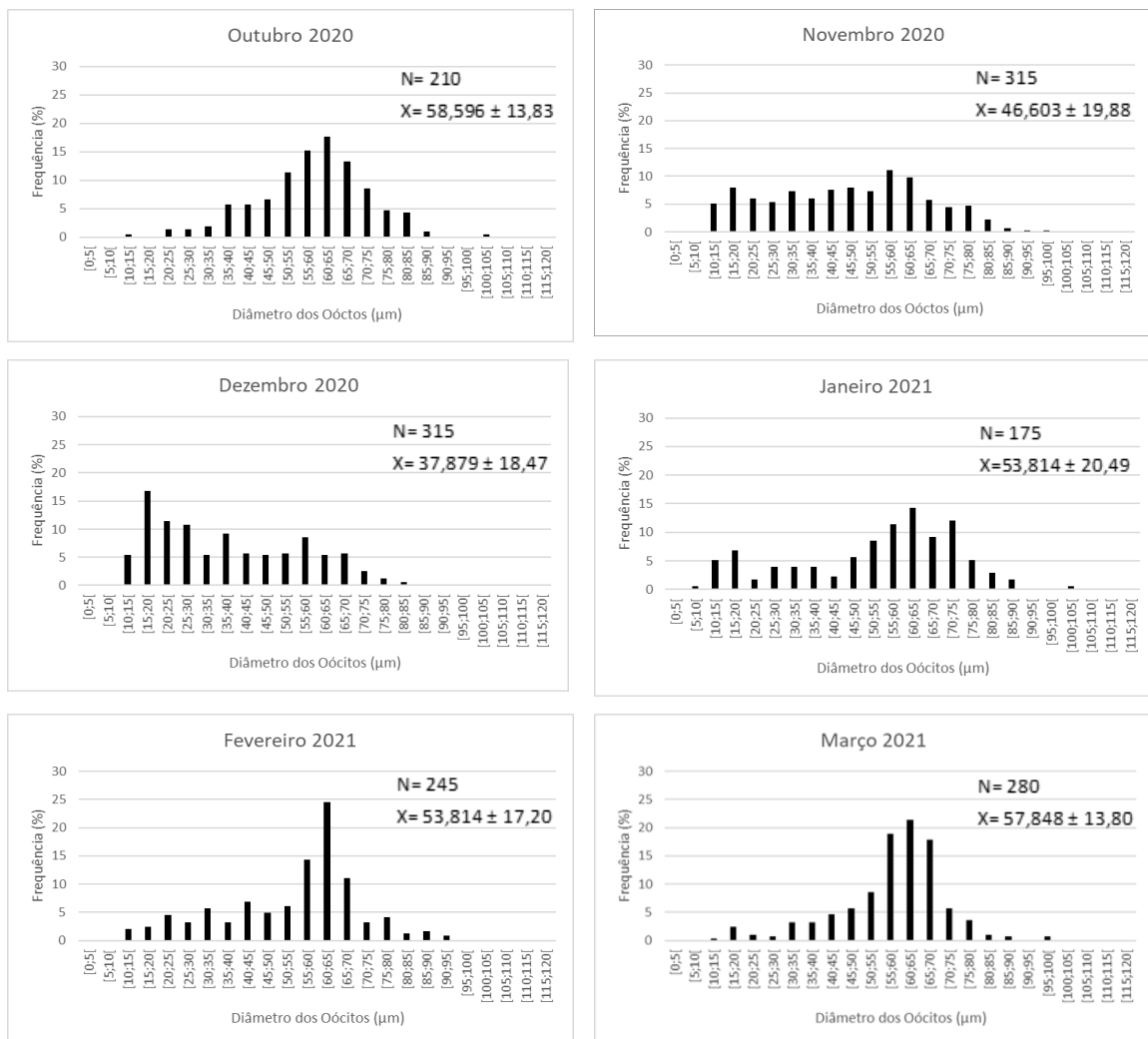


Figura 11. Variação mensal no índice gonadal populacional dos machos recolhidos de *Patella depressa*.

3.2 DIÂMETRO DOS OÓCITOS

A frequência da distribuição do diâmetro dos oócitos de acordo com o mês de amostragem está descrita na figura 12, as medições mensais variaram entre 7,43 μm (agosto) e 101,83 μm (maio). É possível observar um aumento gradual no valor do diâmetro médio dos oócitos a partir de janeiro (53,814 \pm 20,49 μm) a março (57,848 \pm 13,80 μm) e novamente de junho (49,475 \pm 17,68 μm) a agosto (52,038 \pm 21,92 μm) este último não tão evidente quando comparado com o primeiro. O mês com a maior média foi em outubro com 58,596 \pm 13,83 μm e o mês com menor média registada foi o mês de dezembro com 37,879 \pm 18,47 μm .



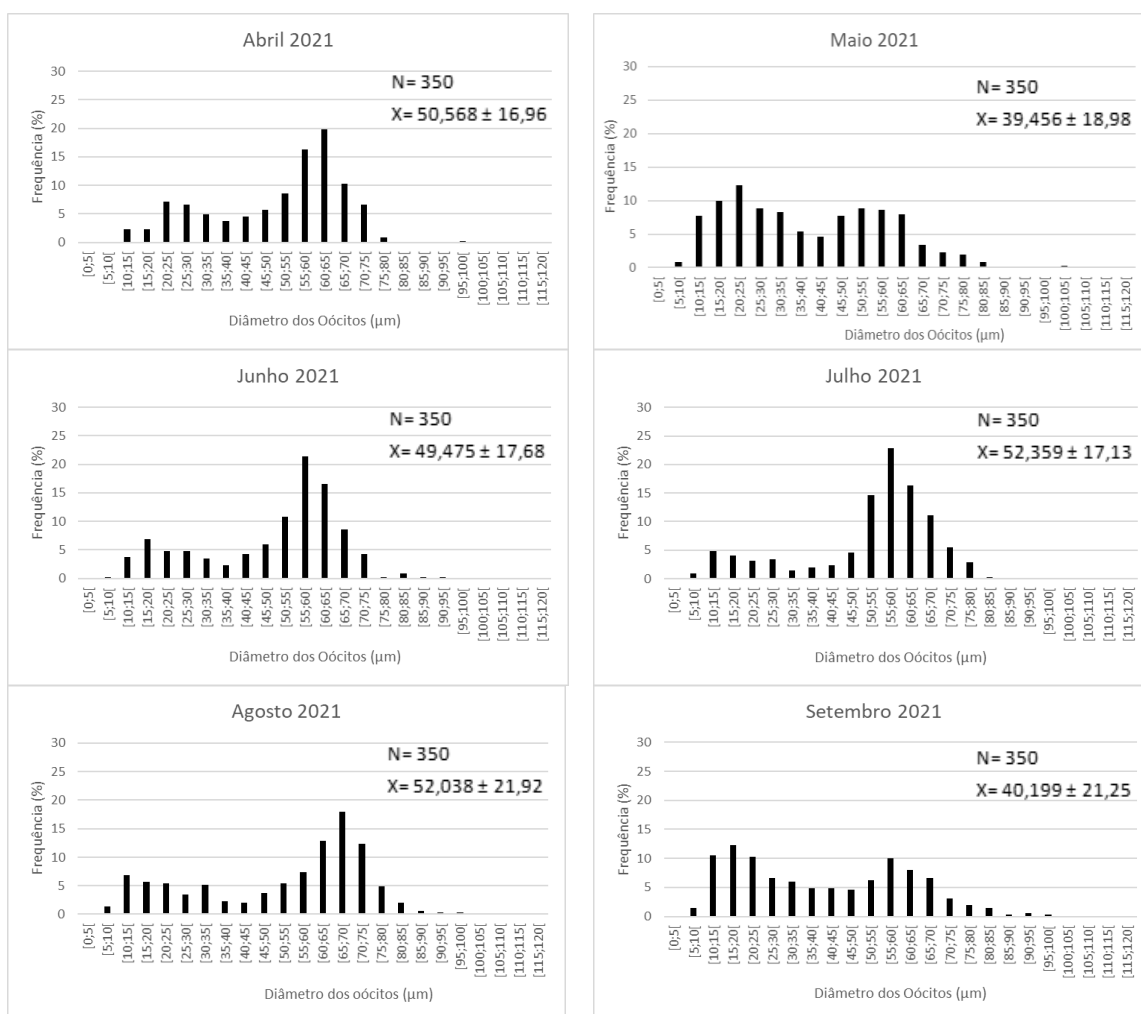


Figura 12. Variação mensal da frequência do diâmetro os oócitos de *Patella depressa* ao longo do ano. N, número de oócitos; X, média do diâmetro dos oócitos ± desvio-padrão.

3.3 ENSAIOS DE REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO

Na tabela 4 estão representados os resultados obtidos da taxa de fertilização, eclosão e sobrevivência larvar às 72h, nos diferentes ensaios. Pode-se observar que os valores da taxa de fertilização oscilam, embora pouco, de ensaio para ensaio, obtendo um valor máximo de 36,59%, no ensaio 2, e um mínimo de 8,59%, no ensaio 3.

A taxa de eclosão, com exceção no ensaio 2 onde a taxa foi de 0%, que as taxas são apresentam resultados semelhantes em todos os ensaios sendo que o valor máximo obtido foi de 56,14%, no ensaio 4, e um valor mínimo de 42,86%, no ensaio 1.

Relativamente à sobrevivência larvar, os valores tendem a variar um pouco mais, com um máximo de 19,88%, no ensaio 4, e um mínimo de 3,72%, no ensaio 3. 96h após a fecundação a taxa de sobrevivência larvar foi de 0% em todos os ensaios.

Apenas no ensaio 3 foram observadas larvas anormais com uma percentagem de 11,11%, podendo ser resultado de polispermia, uma vez que a concentração de oócitos foi reduzida quando comparada aos restantes ensaios.

Tabela 4. Resultados obtidos nos diferentes ensaios.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Taxa de Fertilização (%)	12,62	36,59	8,58	23,81
Taxa de Eclosão (%)	42,86	0	43,90	56,14
Sobrevivência Larvar às 72h (%)	8,33	0	3,72	19,88
Sobrevivência Larvar às 96h (%)	0	0	0	0

Página intencionalmente deixada em branco

DISCUSSÃO

Com o aumento da importância na produção de proteína por aquacultura, várias espécies de moluscos têm sido estudadas por terem potencial como uma alternativa mais sustentável de produção, um dos grupos que se tem vindo a notar um aumento de interesse são as lapas *Patella* (Mau *et al.*, 2017 e 2018; Guallart *et al.*, 2020; Cañizares *et al.*, 2021; Pinheiro, *et al.* 2021).

Uma particularidade no ciclo reprodutivo de *Patella depressa*, e outras *Patella*, é as desovas serem influenciadas pela latitude onde se encontram (Moore *et al.*, 2007), estas tendem a ter épocas de desova mais tarde no ano quanto mais localizadas a norte (Moore *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 2008). Ribeiro *et al.* (2009) reporta o estudo do ciclo reprodutivo de quatro espécies de *Patella* no norte da costa portuguesa, *Patella rustica*, *Patella ulyssiponensis*, *Patella vulgata* e a *Patella depressa*, e mostrou oscilações nos intervalos de desova quando comparados os locais de recolha. Fatores atmosféricos como temperatura da água e velocidade do vento, esta última afetando a ondulação costeira, são fatores que têm influência no período de desova (Brazão *et al.*, 2003), entrando em concordância com o fator da latitude uma vez que locais mais a norte atingem temperaturas mais frias quando comparados com locais mais a sul. Noutro estudo de Ribeiro *et al.* (2007) foram observados intervalos de maior percentagem de gónadas maduras irregulares, não variando apenas da latitude, mas também de ano para ano.

No presente estudo foi investigado o ciclo reprodutivo de *Patella depressa* no centro de Portugal recorrendo a técnicas histológicas qualitativas pela avaliação visual das várias fases de maturação, e quantitativas pelo cálculo do índice gonadal populacional como realizado por McCarthy *et al.* (2008), Prusina *et al.* (2014), Vasconcelos *et al.* (2019) e Guallart *et al.* (2020), a partir dos resultados obtidos foram destacados dois intervalos de maturação. O primeiro de janeiro a abril, mostrando-se concordante com outros estudos (Brazão *et al.*, 2003; Casal *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2009 e Fernández *et al.*, 2016) e um segundo pico maturação entre os meses julho e agosto, também descrito por Ribeiro *et al.* (2009) e Amstutz *et al.* (2021).

A existência destes dois intervalos em simultâneo pode ser explicado pela inconsistência temporal da altura das desovas, derivada pela latitude em que se encontram, temperatura, e velocidade do vento o que resulta em diferenças evidentes até no mesmo local

de recolha, mas em anos diferentes (Ribeiro *et al.*, 2009). Outra particularidade observada durante a análise dos resultados é sua capacidade de desovar em taxas reduzidas, mas constantes ao longo de todos os meses do ano, o mesmo acontece em *Patella ulyssiponensis*, (Ribeiro *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2016 e Vasconcelos *et al.*, 2019), este fenómeno de reprodução constante ao longo ano apenas evidencia o potencial que esta espécie tem para a sua produção em aquacultura (Smith *et al.*, 2020).

Quando analisados os intervalos de maturação obtidos e cruzando com os resultados obtidos das medições dos oócitos é possível verificar que as épocas onde a média mensal do diâmetro dos oócitos aumenta gradualmente de janeiro até abril e de junho a agosto, estes aumentos coincidem com as épocas com maior concentração de fêmeas maduras. O diâmetro dos oócitos é um parâmetro de grande importância, pois pode indicar sensivelmente o estado de maturação, e, como Thorson *et al.* (1950) indicou, podem também estar relacionados diretamente com a taxa de fertilização e a duração do estado larvar. Os oócitos de *P. depressa* neste estudo apresentaram um tamanho diâmetro mínimo de 7,43 µm em agosto, e um máximo de 101,83 µm sendo este substancialmente inferior quando comparado a outras espécies do mesmo género, como *P. ferruginea* e *P. vulgata* que apresentaram oócitos com um diâmetro máximo de 150 µm (Guallart *et al.*, 2020), enquanto as espécies *P. pelucida*, *P. rustica* e *P. caerulea* apresentam valores máximos que rondam os 160, 135 e 120 µm, respetivamente, quando medidos ao longo do ano (Lebour *et al.*, 1937; Espinosa *et al.*, 2006; Ferranti *et al.*, 2018). Este valor inferior pode, segundo Levitan *et al.* (2000) resultar numa menor quantidade de reservas lipídicas e resultar num desenvolvimento larvar mais demorado.

No estudo de Guallart (2020) onde trabalhou com a espécie *P. ferruginea* (com um diâmetro máximo de 150 µm) foi observado a primeira velígera com início de formação da protoconcha às 23h, enquanto neste estudo no mesmo tempo apenas foram encontradas trocóforas, a primeira velígera só foi observada às 48h, o que indica que o desenvolvimento larvar de *P. depressa* tem uma maior duração que a *P. ferruginea*. Já na *P. caerulea*, que tem um diâmetro máximo mais perto de *P. depressa* mostra que a primeira velígera apenas apareceu às 42h (Ferranti *et al.*, 2018) mostrando concordância com os resultados obtidos neste estudo.

Um dos parâmetros mais estudados é a concentração ideal de espermatozoides, sendo esta de 6×10^5 a 10^8 /ml (Smaldon & Duffus 1985; Souza *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2019;

Guallart *et al.*, 2020), de forma a obter elevadas taxas fertilização e evitar o surgimento de larvas anormais por consequência de polispermia. No presente estudo houve apenas um ensaio onde foram encontradas larvas anormais (Ensaio 3) onde foi utilizada uma concentração de oócitos 10x mais baixa que nos restantes ensaios (30,33 oócitos/ml). Apesar de a concentração de espermatozoides se encontrar dentro do intervalo da concentração ideal, poucos estudos mencionam a relação de espermatozoides por oócito, havendo apenas referência ao número de fêmeas utilizadas (Souza *et al.*, 2009).

As taxas de fertilização obtidas neste estudo foram de 12,62% (Ensaio 1), 36,59% (Ensaio 2), 8,58% (Ensaio 3) e 23,81% (Ensaio 4), apresentando valores superiores (Ensaio 2 e 4), quando comparados ao estudo de Aquino *et al.* (2009), onde recorreu à técnica de maturação artificial dos oócitos, realizada com a adição de NaOH, levando à subida do pH até 9,5 e assim fragilizando o córion do oócito antes da fecundação. A razão de a taxa de fertilização no ensaio 3, sendo este já dentro do período de maturação, ser tão reduzido deve-se à baixa concentração de oócitos utilizada nesse mesmo ensaio (Peréz *et al.*, 2016)

Dos quatro ensaios realizados, três foram feitos em meses onde não foram encontradas fêmeas maduras na análise histológica, no entanto, foram os que apresentaram maiores taxas de fertilização, neste estudo durante a obtenção dos gametas, que iriam posteriormente ser utilizados nos ensaios, foram observados ao microscópio ótico e apenas gónadas que se mostrassem maduras foram utilizadas, isto foi possível por haver desovas ao longo de todo o ano, e havendo desovas ao longo do ano deve de haver, se bem que reduzida, um número de fêmeas maduras, o facto de não terem sido observadas durante a análise histológica pode significar que o número de indivíduos recolhidos mensalmente poderá ter sido inferior ao necessário. As taxas de eclosão observadas neste estudo mostraram-se semelhantes em todos ensaios com valores de 42,86% (Ensaio 1), 43,90% (Ensaio 3) e 56,14% (Ensaio 4) que se encontram semelhantes aos obtidos por de Ferranti *et al.* (2018) e Guallart *et al.* (2020).

No ensaio 2 não foi encontrada nenhuma larva eclodida, sendo que a taxa de fertilização foi a mais alta de todos os ensaios, a explicação mais lógica para este fenómeno foi uma alteração drástica no meio de cultivo seja esta pela adição do alimento demasiado cedo criando condições desfavoráveis para o desenvolvimento embrionário ou algum tipo de avaria no sistema de ar ou temperatura. Uma vez que não houve eclosão a taxa de sobrevivência larvar é nula. Nos restantes ensaios a taxa de sobrevivência larvar às 72h

atingiu valores de 8,33% (Ensaio 1), 3,72 (Ensaio 3) e 19,88% (Ensaio 4) sendo estes consideravelmente baixos quando comparados a outros moluscos, mas normais quando comparados a outras *Patella* (Espinosa *et al.*, 2010). A mortalidade elevada às 96h, deve-se ao facto de se tratar de organismos extremamente sensíveis e complexos, dificultando a sua manutenção em laboratório (Espinosa *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2016 Seabra *et al.*, 2019).

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A crescente necessidade de novos produtos proteicos sustentáveis, levou a uma necessidade de procura de novas espécies que possam ser cultivadas em aquacultura. Populações saudáveis de espécies do género *Patella* no meio selvagem mostram-se resistentes a condições ambientais adversas e têm ainda a capacidade de manter densidades e taxas de fertilização elevadas, tornando este género de lapas o seu potencial para a produção em aquacultura.

No presente estudo observou-se que populações de *P. depressa*, têm a capacidade de realizar pequenas desovas ao longo de todo o ano como ocorre na *P. ulysiponensis*, apresentando duas épocas por ano de maior concentração de indivíduos com gónadas maduras. Os resultados relativos ao diâmetro dos oócitos tornam este facto evidente havendo oócitos de várias dimensões ao longo do tempo, mostrando um aumento gradual nos intervalos de maturação sexual, contrariamente ao que acontece em outras *Patella*, onde só são observados oócitos de maiores dimensões, perto de e em épocas de desova, enquanto no resto do ano são apenas observados oócitos de tamanho inferior a 10 µm ou fêmeas com gónadas em estado inativo. No entanto para uma melhor compreensão sobre o seu ciclo reprodutivo seria interessante cruzar os valores da temperatura, o nível de ondulação ou um combinação dos dois, com os períodos de maturação principais, de modo a conseguir delinear mais precisamente os seus intervalos de maturação seria também útil, após um estudo da dinâmica de população, a recolha de uma maior amostra para análise histológica.

Foi ainda possível comprovar que não há necessidade de maturação artificial dos oócitos para obter taxas de fertilização acima dos 20%, mediante as técnicas de reprodução e fecundação utilizadas, podendo assim ser evitado o uso desta prática e tornando o possível cultivo em aquacultura mais sustentável.

Em algumas espécies de *Patella* a indução de desova em laboratório ainda não está completamente dominada, e por isso a obtenção de gâmetas é realizada por escarificação, o que é desaconselhada por alguns autores, por poder resultar em consequências nefastas para a eclosão, no entanto observando os resultados obtidos este não parece ser o caso para a *P. depressa*. A taxa de eclosão mostrou ainda ser pouco influenciada pelas variáveis testadas, mostrando valores similares em todos os ensaios onde houve eclosões, os oócitos fecundados mostram uma resiliência inata, o que, em aquacultura será vantajoso.

Em estudos futuros, propõe-se o estudo de como a temperatura e ondulação marinha (locais abrigados/ não abrigados) influenciam a maturação das gónadas e altura de desovas em termos populacionais, realizando amostragens mensalmente com registo diária destas variáveis. Poderá ainda ser estudado, se a altura da coluna de água tem também influência no desenvolvimento larvar, semelhante ao que acontece a algumas espécies de crustáceos, auxiliando assim o cultivo destes em aquacultura. E por ultimo o substrato, esta variável poderá ser a mais importante no bom desenvolvimento juvenil uma vez que caso não haja um substrato favorável para o assentamento a larva não se desenvolve o que poderá ter sido a razão da mortalidade elevada na sobrevivência larvar às 96h, e por isso, percebe-se a necessidade de realizar estudos para testar vários tipos de substratos de modo a perceber a que tipo, seja de origem natural ou antropogénica, as larvas assentam melhor, bem como a constituição do biofilme que os cobre.

REFERÊNCIAS

- Asche, F. & Smith, M.D. (2018). Viewpoint: Induced innovation in fisheries and aquaculture. *Food Policy* 76 : 1-7.
- Amstutz, A. ; Firth, L.B. ; Spicer, J.I. ; Hanley, M.E. (2021). Fcing up to climate change : community composition varies with aspect and surface temperature in the rocky intertidal. *Marine Environmental Research* 172.
- Brazão, S.; Boaventura, D.; Morais, S.; Narciso, L.; Ré, P. (2003). Reproduction of *Patella depressa* Pennant, 1777 on the central Portuguese coast. *Boletim – Instituto Espanol de Oceanografia* 19 8pp.
- Brazão, S.E. (2009). Biochemical studies of the limpet *Patella depressa* Pennant, 1777 from marinas and rocky shores of the Portuguese coast: a marker approach. Dissertação. Universidade do Algarve. 131 pp.
- Carroll, J.M.; Riddle, K.; Woods, K.E.; Finelli, C.M. (2015). Recruitment of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in response to settlement cues and predation in North Carolina. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 463 7pp.
- Cañizares, J.M.; Castejón, D.; Haroun, R.; Nogueira, N.; Andrade, C.A.P. (2021). Enhancing oocyte maturation and fertilisation in the black-foot limpet *Patella candei* d’Orbigny, 1840 (Paellidae, Mollusca). *Aquaculture Reports*. 21: 100856.
- Casal, G.; Aceña-Matarranz, S.; Fernández-Márquez, D.; Fernández, N. (2018). Distribution and abundance patters of three coexisting species of *Patella* (Molusca Gastropoda) in the intertidal areas of the NW Iberian Peninsula: Implications for management. *Fisheries Research* 198: 86-98.
- Chen, N.; Shen, Y.; Yu, F.; You, W.; Ke, C. (2020). A new indicator of hypoxia tolerance in abalone developed based on heart rate fluctuations. *Aquaculture* 519: 734903.
- Clarke, A.; Prothero-Thomas, E.; Beaumont, J.C.; Chapman, A.L.; Brey, T. (2004). Growth in the limpet *Nacella concinna* from contrasting sites in Antarctica. *Polar Biology* 28: 62-71.

- Coleman, R.A.; Underwood, A.J.; Benedetti-Cecchi, L.; Aberg, P.; Arenas, F.; Arrontes, J.; Castro J.; Hartnoll, R.; Jenkins, S. R.; Paula J.; Santana P.D.; Hawkins S.J. (2006). A continental scale evaluation of the role of limpet grazing on rocky shores. *Oecologia* 147: 556-564.
- DGRM. (2021). *Estatísticas da Pesca – 2020* (Instituto Nacional de Estatística (Ed.)).
- Erlandson, J.M.; Braje, T.J.; Rick, T.C.; Jew, N.P.; Kennett, D.J.; Dwyer, N.; Ainin, A.F.; Vellanoweth, R.L.; Watts, J. (2010). 10,000 years of human predation and size changes in the owl limpet (*Lottia gigantea*) on San Miguel Island, California. *Journal of Archaeological Science* 38: 1127-1134.
- Espinosa, F.; Guerra-García, J.; Fa, D.; García-Gómez, C. (2006). Aspects of reproduction and their implications for the conservation of the endangered limpet, *Patella ferruginea*. *Invertebrate Reproduction and Development* 49:1-2.
- FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. 224 pp.
- Fenberg, P.B. & Roy, K. (2008). Ecological and evolutionary consequences of size-selective harvesting: How much do we know? *Molecular Ecology* 17: 209-220.
- Ferranti, M.P.; Monteggia, D.; Asnaghi, V.; Chiantore, M. (2018). Artificial reproduction protocol, from spawning to metamorphosis, through noninvasive methods in *Patella caerulea* Linnæus, 1758. *Aquaculture Research* 49: 3386-3391.
- Ferranti, M.P.; Guallart, J.; Fanciulli, G.; Panzalis, P.A.; Chiantore, M. (2021). Advancements towards restoration of the endangered limpet *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 through controlled reproduction. *Aquaculture Research* 00, 1-17.
- Ferreira, P.M.P.; *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para larvicultura de peixes marinhos* (2009). Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P.. IPIMAR 978-972-9372-37-7.
- Fernández, N.; Alborés, I.; Aceña-Matarranz, S. (2016). Spatial variability of the reproductive cycle and physiological condition of *Patella* spp. (Mollusca

- Gastropoda) in the NW of the Iberian Peninsula: Implications for exploitation. *Fisheries Research* 179: 76-85.
- Fry, J.P.; Mailloux, N.A.; Love, D.C.; Milli, M.C.; Cao, L. (2018). Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly? *Environmental Research Letters* 13: 024017.
- Guallart, J.; Luque, A.; Templado, J. (2020). Filling gaps: Closing the life cycle of the endangered Mediterranean limpet *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Gastropoda, Patellidae). *Mediterranean Marine Science* 21: 400-419.
- Guo, X. (2009). Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 251-259 .
- Hawkins, S.J.; Corte-Real, H.B.S.M.; Pannacciulli, F.G.; Weber, L.C.; Bishop, J.D.D. (2000). Thoughts on ecology and evolution of the intertidal biota of the Azores and other Atlantic islands. *Island, Ocean and Deep-Sea Biology* 152: 3-17.
- Henriques, P.; Delgado, J.; Sousa, R. (2017). Patellid Limpets: Na Overview of the Biology and Conservation of Keystone Species of Rocky Shores. *Organismal and Molecular Malacology*. InTech. 27 pp.
- Hua, N.T. & Ako, H. (2012). Maturation and spawning induction in hawaiian opihi *Cellana* spp. By hormone GNRH. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 78: 194-197.
- Hua, N.T. (2014). Development of aquaculture technology for the Hawaiian Opihi *Cellana* spp. PhD Dissertation. University of Hawaii, Mānoa. 184 pp.
- Huchette, S.M.H.; Koh, C.S.; Day, R.W. (2002). Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: effects of density and ammonia. *Aquaculture* 219: 457-470.
- Jenkins, S.R.; Coleman, R.A.; Santana, A.D.; Hawkins, S.J.; Burrows, M.T.; Hartnoll, R.G. (2005). Regional scale differences in the determinism of grazing effects in the rocky intertidal. *Marine Ecology Progress Series* 287: 77-86

- Kay, M.C. & Emlet, R.B. (2002). Laboratory spawning, larval development, and metamorphosis of the limpets *Lottia digitalis* and *Lottia asmi* (Patellogastropoda, Lottidae). *Invertebrate Biology* 121: 11-24.
- Lebour, M (1937). The Eggs and Larvae of British Prosobranchs with Special Reference to those Living in the Plankton. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 22:1
- Leighton, P. (2008). *Aquaculture Explained- Abalone Hatchery Manual*. Ireland's Seafood Development Agency. No.25: 95 pp.
- Levitan, D.R. (2000). Optimal Egg size in Marine Invertebrates: Theory and Phylogenetic Analysis of the Critical Relationship between Egg Size and Development Time in Echinoides. *The American Naturalist* 156: 2.
- Love, D.C.; Silva, P.P.S; Olson, J; Fry, J.P.; Clay, P.M. (2017). Fisheries, food, and health in the USA: the importance of aligning fisheries and health policies. *Agriculture & Food Security* 6: 16.
- Lorenzen, S. (2007). The limpet *Patella vulgata* L. at night in air: Effective feeding on *Ascophyllum nodosum* monocultures and stranded seaweeds. *Journal of Molluscan Studies* 73: 267-274.
- Lucas, J.S. & Southgate, P.C. (2012). *Aquaculture Farming Aquatic Animals and Plants*. Blackwell Publishing Ltd. 643pp.
- Mau, A. & Jha, R. (2017). Aquaculture of two commercially important molluscs (abalone and limpet): existing knowledge and future prospects. *Reviews in Aquaculture* 10: 611-625.
- Mau, A. & Jha, R. (2018). Effects of dietary protein to energy ratios on growth performance of yellowfoot limpet (*Cellana sanwicensis* Pease, 1861)
- McCarthy, M.; Woosnam, P.; Culloty, S.C. (2008) Histological investigation of the reproductive cycles of the limpets *Patella vulgata* and *Patella ulyssiponensis*. *Springer* 153:871-877.

- Moore, P.; Thompson, R.C.; Hawkins, S.J. (2007). Effects of grazer identity on the probability of escapes a canopy-forming macroalga. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 344, 170-180.
- Morais, S.; Boaventura, D.; Narciso L.; Ré, P.; Hawkins, S.J. (2003). Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 294: 61-80.
- Morse, D.E. (1984). Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. *Aquaculture* 39: 263-282.
- Morrisson, A. & Hunt, T.L. (2007). Human Impacts on the Nearshore Environment: An Archaeological Case Study from Kaua’I, Hawaiian Islands. *Pacific Science* 61 (3): 325-345.
- Neumann, B.; Vafeidis, A.T.; Zimmermann, J.; Nicholls, R.J. (2015). Future Coastal Population Growth and Exposure to Sea-level Rise and Coastal Flooding- A Global Assessment. *PLOS ONE* 10: 3-37.
- Olivares.Paz, A.; Quinteiro, J.; Rey-Méndez, M. (2006). Authentication of *Fissurela* species (Mollusca: Vetigastropoda), harvested in the Chilean coast, by PCR-RFLP. *Invest. Mar.* 34: 113-118.
- Pérez, S.; Fernández, N.; Ribeiro, P.A. (2016). Standardization of a *Patella* spp. (Mollusca, Gastropoda) embryo-larvar bioassay and advantages of its use in marine ecotoxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 127: 175-186.
- Pérez, S.; Sánchez-Marín, P.; Bellas, J.; Viñas, L.; Besada, V. (2019). Limpets (*Patella* spp. Mollusca, Gastropoda) as model organisms for biomonitoring environmental quality. *Ecological Indicators* 101: 150-162.
- Pinheiro, J.; Rodrigues, S.; Maranhão, P.; Mendes, S.; Ganhão, R. (2021) Sustainability and Value-Added Products as na Opportunity: Global Acceptability and Sensory Quality of Limpet (*Patella* Spp.) Pâté Enriched with Strawberry-Tree (*Arbutus unedo*) Fruit Extract. *Sustainable Innovation in Food Product Design* 67-85.

- Reguera, P.; Couceiro, L.; Fernández, N. (2018). A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 593-600.
- Ribeiro, P.M.A (2008). Dispersal and connectivity of northeastern Atlantic Patellid limpets: a multidisciplinary approach. PhD Dissertation. University of Southampton, United Kingdom. 254 pp.
- Ribeiro, P.A.; Xavier, R.; Santos, A. M.; Hawkins, S.J. (2009). Reproductive cycles of four species of *Patella* (Mollusca: Gastropoda) on the northern and central Portugal coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89 (6): 1215-1221.
- Seabra, M.I.; Cruz, T.; Fernandes, J.N.; Silva, T.; Hawkins, S.J. (2019). Recruitment of the limpet *Patella ulyssiponensis* and its relationship with crustose coralline algae: patterns of juvenile distribution and larval settlement. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1: 10.
- Silva, A.; Boaventura, D.; Ré, P. (2003). Population structure, recruitment and distribution patterns of *Patella depressa* Pennant, 1777 on the central Portuguese coast. *Boletim – Instituto Español de Oceanografía* 19: 461-471.
- Sinervo, B. & McEdward, L.R. (1988). Developmental Consequences of an Evolutionary Change in Egg Size: an Experimental Test. *Evolution* 42(5) 885-899.
- Smaldon, P.R. & Duffus, J.H. (1984). An Ultrastructural study of gametes and fertilization in *Patella vulgata* L.. *Department of Brewing and Biological Sciences* 51: 116-132.
- Smith, I.F. (2020). *Patella depressa* Pennant, 1777 Identification and Biology.
- Souza, R.A.; Tyler, P.; Hawkins, S.J. (2009). Artificial oocyte maturation in *Patella depressa* and *Patella vulgata* using NaOH-alkalinized seawater. *Marine Biology Research* 5: 503-510.
- Stewart, P.; Soonklang, N.; Stewart, M.J.; Wanichanon, C.; Hanna, P.J.; Poomtong, T.; Sobhon, P. (2008). Larval settlement of the tropical abalone, *Haliotis asinina*

- Linnaeus, using natural and artificial and artificial chemical inducers. *Aquaculture Research* 39: 1181-1189.
- Thorson, G. (1950) Reproductive and Larval Ecology of Marine Bottom Invertebrates. *Biological Reviews* 25:1.
- Trigo, J.E.; Agras, G.J.D.; Alvarez, O.L.G.; Guerra, A.; Moreira, J.; Pérez, J.; Rolán, E.; Troncoso, J.S.; Urgorri, V. (2018) Guia de los moluscos Marinos de Galicia. Servicio de Publicacións da Universidade de Vigo.
- Vafidis, D.; Drosou, I.; Dimitriou, K.; Klaoudatos, D. (2020). Population Characteristics of the Limpet *Patella caerulea* (Linnaeus, 1758) in Eastern Mediterranean (Central Greece). *Water* 12: 1186-1205.
- Vasconcelos, P.; Umapathy, U.; Moura, P.; Ferreira, F.; Carvalho, A.N.; Gaspar, M.B. (2019). Size at sex change and reproductive cycle of the limpets *Patella vulgata* and *Patella ulyssiponensis* (Mollusca: Patellogastropoda) from intertidal rocky shores of the Algarve coast (southern Portugal). *Invertebrate Reproduction & Development* 63: 294-308.
- Wallace, R.K.; Waters, P.; Rikard, F.S. (2008). Oyster Hatchery Techniques. Southern Regional Aquaculture Center 6pp.