



Influência de duas dietas (náuplios de Artemia e Artemia enriquecida) no crescimento e sobrevivência de larvas de Lavagante, Homarus gammarus

Paulo David Gaiolas Pereira

2011



Influência de duas dietas (náuplios de Artemia e Artemia enriquecida) no crescimento e sobrevivência de larvas de Lavagante, Homarus gammarus

Paulo David Gaiolas Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura realizada sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Miguel Franco Martins Leandro

2011

Influência de duas dietas (náuplios de Artemia e Artemia enriquecida) no crescimento e sobrevivência de larvas de Lavagante, Homarus gammarus

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

Agradecimentos

Ao longo do período em que se desenvolveu este trabalho, muitas foram as pessoas que de uma ou outra forma influenciaram e contribuíram para a sua conclusão. Assim com um reconhecido muito obrigado, agradeço:

Ao Professor Doutor Sérgio Leandro, meu orientador, pelo interesse que demonstrou pelo tema e pelo apoio constante e valiosas indicações, ao longo deste trabalho.

À Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche, pela disponibilização dos recursos do Laboratório de Aquacultura para realização da componente prática desta Tese de Mestrado.

Aos alunos da unidade de Projecto, Pedro Sá, Mónica Mateus e Inês Santos, pelo interesse que demonstraram pelo tema e pela sua disponibilidade e colaboração.

A António Fonseca, da empresa Frutos do Mar, que desde o primeiro momento se interessou pela ideia deste trabalho e que sempre mostrou disponibilidade e espírito de cooperação.

À Professora Doutora Susana Mendes, pela sua preciosa colaboração na análise estatística dos dados.

À Rita Sousa, ao Rúben Pinho, ao João Chambel, ao Pedro Ramalho, à Gina Neto e aos restantes colegas de Mestrado, pela simpatia, apoio e amizade demonstrados ao longo deste percurso.

Ao Jorge Bento pela conceção do sistema que foi utilizado na cultivo larvar.

Às mestres Vera Severiano e à Ângela Vicente, pelo seu contributo e indicações valiosas para a manutenção dos sistemas de cultivo.

E claro, à Sónia, ao David, ao Gonçalo e ao pequeno Tomás, que sem o seu apoio incondicional, compreensão e paciência, não me teria sido possível completar esta jornada.

Resumo

Nas últimas décadas, verificou-se a instalação em alguns países europeus de maternidades de Lavagante Europeu, *Homarus gammarus*, com o objectivo de produzir juvenis para repovoamento em zonas em que o stock natural sofreu uma acentuada depleção. No entanto, a definição de dietas bem ajustadas às larvas de *Homarus gammarus* e as taxas de sobrevivência relativamente baixas devido a canibalismo constituem desafios e continuam a originar estudos nesta matéria. Neste trabalho foram testadas duas dietas, náuplios de *Artemia salina* e *Artemia salina* enriquecida durante 24h com a microalga *Isochrysis galbana*, com o objectivo de avaliar a sua influência no crescimento e na sobrevivência larvar. Para o cultivo recorreu-se a um sistema de recirculação de água, em tanques de fundo cónico de 4 l. O trabalho foi iniciado com uma densidade de cultivo de 5 larvas/l e mantido a uma temperatura de 23-24°C, uma salinidade de 33 ‰ e com um fotoperíodo de 12h Luz: 12h Escuro. Nas condições de realização deste estudo, que foi desenvolvido até ao dia 10 pós eclosão, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas mortalidades das larvas entre as duas dietas. No entanto, em ambas as dietas verificou-se um aumento da mortalidade diária na fase final do ensaio, provavelmente devida a uma relativa fragilidade na transição do estágio III para o estágio IV. Neste trabalho, as taxas de sobrevivência verificadas no final do estudo foram menores que as observadas em outras referências bibliográficas. Relativamente à influência das duas dietas no crescimento, avaliado pelo comprimento do cefalotórax, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, sendo que as larvas de *Homarus gammarus* alimentadas com a dieta de náuplios de *Artemia* apresentaram um crescimento mais elevado, atingindo um tamanho médio maior (média 6,83mm) no final do estudo em relação às larvas alimentadas com a dieta de *Artemia* enriquecida (média 5,73mm).

Palavras-chave: *Homarus gammarus*, cultivo larvar, *Artemia*, *Isochrysis galbana*, sobrevivência, crescimento

Abstract

In the last decades, there has been an effort in some European countries to establish hatcheries of European clawed lobster, *Homarus gammarus*, in order to produce juveniles for stock enhancement in areas where the natural stock suffered a strong depletion. However, the lobster larvae diets and the relatively low survival rates due to cannibalism are challenges, continuing to lead research in this subject. In this paper we tested two diets, *Artemia salina* nauplii and *Artemia salina* enriched for 24 hours with microalgae *Isochrysis galbana*, in order to assess their influence on larval growth and survival. For larvae rearing we used a relatively inexpensive system with water recirculation in tanks of 4 L, with conical bottom. The study began with a newly hatched larvae density of 5 larvae / L and maintained at a temperature of 23-24° C, a salinity of 33 ‰ and a photoperiod of 12h Light:12h Dark. The clawed lobster larvae were counted and a sample was measured in a daily basis. Under this study conditions, which was developed till the 10th day after hatching, there were no statistically significant differences in larval mortality between the two diets. However, in both diets there was an increase in daily mortality in the final phase of the trial, probably due to a relative weakness in the transition from stage III to the post larval stage (IV). In the present study, survival rates observed at the end of the trial were lower than those observed in other references. Regarding growth performance, measured by the length of the carapace, were statistically significant differences. *Homarus gammarus* larvae fed with *Artemia* nauplii diet had higher growth, reaching a greater average size at the end of the trial, than the larvae of the other group (mean carapace length 6,83mm vs 5,73mm).

Keywords: *Homarus gammarus*, Larval culture, *Artemia*, *Isochrysis galbana*, Survival rate, Growth

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
1.Introdução.....	1
1.1.Biologia do Lavagante Europeu e interesse económico.....	1
1.2.Desenvolvimento larvar.....	5
1.2.1.Estádio larvar I (Zoea I).....	7
1.2.2.Estádio larvar II (Zoea II).....	8
1.2.3.Estádio larvar III (Zoea III).....	9
1.2.4.Estádio IV (Pós Larva).....	10
1.3.Maternidade de <i>Homarus gammarus</i>	11
1.3.1.Reprodutoras.....	11
1.3.2.Cultivo larvar.....	14
1.4.Objectivos.....	17
2. Material e Métodos.....	19
2.1.Aquisição e manutenção das reprodutoras.....	19
2.2.Obtenção das larvas.....	22
2.3.Sistema de cultivo larvar.....	22
2.4.Desenho Experimental.....	24
2.5.Tratamento estatístico.....	25

3. Resultados.....	27
3.1.Mortalidade larvar diária e Taxa de Sobrevivência.....	27
3.2.Crescimento larvar.....	29
3.3.Incremento no Crescimento.....	32
4. Discussão.....	35
4.1.Mortalidade larvar diária e Taxa de Sobrevivência.....	35
4.2.Crescimento larvar e Incremento.....	36
5. Conclusão.....	39
5.1.Perspectivas futuras.....	40
6. Bibliografia.....	41
7. Anexo.....	47

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Juvenil de <i>Homarus gammarus</i> com aproximadamente 30 mm de comprimento total, a alimentar-se de mexilhão (Lab de Aquacultura da ESTM-IPL).....	4
Figura 1.2– Juvenil de <i>Homarus gammarus</i> com aproximadamente 40 mm de comprimento total (Lab. de Aquacultura da ESTM-IPL).....	4
Figura 1.3 – Estádios larvares (Zoea I, II e III) e pós larva (estádio IV) de Lavagante Europeu (<i>Homarus gammarus</i>) (adaptado de Nicosia e Lavalli, 1999).....	5
Figura 1.4 – Efeito da temperatura no período intermuda (duração dos estádios larvares Zoea I, II e III) no desenvolvimento de <i>Homarus gammarus</i> (dias, média SD); regressão não-linear com coeficientes (r^2) (Adaptado de Schmalenbach e Franke, 2010).....	6
Figura 1.5 – Lavagante Europeu <i>Homarus gammarus</i> no estágio larvar I (zoea I) (Laboratório de Aquacultura ESTM-IPL).....	8
Figura 1.6 – Lavagante europeu, <i>Homarus gammarus</i> , estágio larvar III (zoea III) (Laboratório de Aquacultura ESTM-IPL).....	9
Figura 1.7 – Fêmea de Lavagante <i>Homarus gammarus</i> evidenciando ovos presos aos pleópodes (Laboratório Aquacultura da ESTM-IPL).....	12
Figura 2.1 – Desinfecção dos ovos com solução de iodopovidona por imersão do abdómen de fêmea de <i>Homarus gammarus</i>	19
Figura 2.2- Medição do olho de embrião de Lavagante europeu, <i>Homarus gammarus</i>	21
Figura 2.3 – Ovos de Lavagante Europeu, <i>Homarus gammarus</i> , na fase final do desenvolvimento embrionário.....	21
Figura 2.4 – Larvas de <i>Homarus gammarus</i> de estágio I (Zoea I).....	22
Figura 2.5 - Série de 5 tanques de 4 l, utilizada no cultivo larvar.....	23
Figura 2.6 – Sistema de recirculação de água utilizado no cultivo larvar. Com entrada de água no topo e arejamento de fundo.....	23

Figura 3.1 – Efeito das duas dietas, náuplios de artémia e artémia enriquecida na mortalidade diária média das larvas de <i>Homarus gammarus</i> . As colunas representam a mortalidade das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD). A diferença não é estatisticamente significativa.....	27
Figura 3.2 - Mortalidade diária das larvas de <i>Homarus gammarus</i> , para as duas dietas náuplios de artémia e Artémia enriquecida, em proporção. No gráfico estão representados a média e o desvio padrão (SD).....	28
Figura 3.3- Efeito da dieta, náuplios de Artémia e Artémia enriquecida com <i>Isochrysis galbana</i> , na Taxa de Sobrevivência (%) de larvas de <i>Homarus gammarus</i> ao longo do tempo do ensaio (até ao 10º dia pós eclosão).....	28
Figura 3.4 – Efeito das dietas, náuplios de artémia e artémia enriquecida, no tamanho médio (mm) do cefalotórax de larvas de <i>Homarus gammarus</i> . As colunas representam o tamanho médio das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD); a diferença média é significativa ao nível de 0,05 ($p < 0,05$).....	29
Figura 3.5 – Evolução diária do tamanho das larvas (mm) de lavagante <i>Homarus gammarus</i> ao longo do ensaio, alimentadas com a dieta náuplios de artémia e artémia enriquecida. As colunas ilustram o comprimento larvar médio. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD).....	30
Figura 3.6 - Efeito das dietas, náuplios de artémia e artémia enriquecida, no tamanho das larvas de <i>H. gammarus</i> , medido em comprimento do cefalotórax (mm), no dia um e no dia dez. As colunas representam o tamanho das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD); A diferença média é significativa ($p < 0,05$).....	31
Figura 3.7 - Análise da relação linear entre o tamanho do cefalotórax e o tempo de cultivo de larvas de <i>Homarus gammarus</i> , alimentadas com as dietas, Náuplios de artémia (NA) e Artémia enriquecida (AE). Declive da recta de crescimento para a dieta NA: $d_{NA}=0,318$ ($r_{pearson}=0,83$) e declive da recta de crescimento para a dieta AE: $d_{AE}=0,189$ ($r_{pearson}=0,75$).....	32
Figura 3.8- Efeito das duas dietas, náuplios de artémia e artémia enriquecida, no incremento de crescimento (em mm) no final do ensaio. As colunas representam o incremento final das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD).....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Evolução dos totais anuais de desembarque de Lavagante, em toneladas, em Portugal entre 2001 e 2010 e o valor médio anual em euro/kg (Fonte: Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura).....3

Tabela 1.2- Exemplos de regimes alimentares utilizados no cultivo de larvas de *Homarus*.
.....16

1. Introdução

1.1. Biologia do Lavagante Europeu e Interesse económico

O Lavagante Europeu, *Homarus gammarus*, é uma espécie de elevado valor que contribui substancialmente para a economia de algumas comunidades costeiras. Está distribuída desde as ilhas Lofoten na costa norte da Noruega até Marrocos. É também encontrada no Mediterrâneo incluindo o Mar Egeu (Jørstad et al., 2005). Habita normalmente águas pouco profundas e a maioria das capturas é realizada em armadilhas localizadas a profundidades inferiores a 30 m. No entanto, já foram encontrados lavagantes até 150m de profundidade (Mercer et al. 1998). Esta espécie apresenta um ciclo de vida relativamente longo e são animais com uma taxa de crescimento lenta (Wickins e Lee, 2002). Os indivíduos de *Homarus*, normalmente alcançam a maturidade sexual quando atingem um comprimento de cefalotórax de 85 mm (Aiken e Waddy, 1980). No entanto, Schmalenbach et al. (2011) refere que foram capturadas fêmeas ovadas com 83 mm de comprimento de cefalotórax e com 4 anos de idade. Segundo Tully et al. (2001) as fêmeas de *Homarus gammarus*, na costa da Irlanda atingem a maturidade com 92,5-96 mm de comprimento de cefalotórax. Dados genéticos parecem sugerir que a fêmea, no meio natural, é fecundada por apenas um macho. Contudo o que foi observado em tanques experimentais é que um indivíduo macho pode fecundar várias fêmeas numa mesma época, o que é provável que também ocorra em meio natural (Ferguson et al., 2002). A reprodução (desova) e o crescimento (muda) parecem ocorrer alternadamente num ciclo de 2 anos para a maioria das fêmeas (mais de 90%) (Agnalt et al. 2007).

Os ovos de lavagante desenvolvem-se internamente durante aproximadamente um ano (Aiken e Waddy, 1980; Waddy e Aiken, 1991) e após a extrusão, o desenvolvimento embrionário pode variar entre 9 e 12 meses, dependendo da temperatura (Waddy and Aiken, 1991, Burton, 1992). Durante o decorrer do desenvolvimento embrionário do lavagante europeu, ocorre um aumento progressivo no conteúdo em água (54,0 para 83,1%), em cinzas (2,7 para 16,7%), em proteína (47,4 para 50,9%) e em azoto não-proteico (1,0 para 2,4%) e um decréscimo no conteúdo em lípidos (43,8 para 25,4%) e energia (6343 para 5431 cal/g matéria orgânica seca) (Pandian, 1970). Relativamente aos aminoácidos (AA), a maior percentagem de utilização durante a embriogénese prende-se com os AA essenciais, devido à redução significativa de metionina e treonina. No entanto, o conteúdo em AA livres aumenta

durante o processo embrionário, sobretudo os AA não essenciais livres como a glicina, prolina, alanina e a taurina. Os AA essenciais livres mais abundantes no final da embriogênese são a arginina, a lisina e a leucina. No que diz respeito à fracção lipídica, observa-se uma redução substancial dos lípidos neutros, com uma utilização superior aos 80% (Rosa et al., 2005). A concentração de carotenóides da totalidade do ovo de *Homarus gammarus* em desenvolvimento, permanece constante durante a embriogênese. A diminuição da quantidade de pigmento no vitelino corresponde à transferência de carotenóides para o embrião em desenvolvimento (Mantiri et al., 1996).

Quando completo o desenvolvimento embrionário, a fêmea de *Homarus* liberta as larvas em “lotes” à noite por agitação dos pleópodes (Phillips, 2006). O momento de libertação/eclosão das larvas segue um ritmo endógeno (Ennis, 1973; Brandford, 1978). A duração do período de eclosão está influenciada pela temperatura da água e pode variar de poucos dias a várias semanas (Ennis, 1975). As datas e a temperatura da água aquando da eclosão e a duração do desenvolvimento embrionário revelam diferenças entre anos relacionadas com o regime de temperatura (Schmalenbach e Franke, 2010). Nos lavagantes, as primeiras semanas após a eclosão são caracterizadas por uma fase pelágica, onde ocorrem deslocações verticais. Foi observado que as larvas de lavagante são capazes de migrações verticais até profundidades de 30m em águas oceânicas, tendo o fototropismo influência nestas migrações verticais (Harding et al., 1987).

Os stocks naturais de *Homarus gammarus* nunca foram tão expressivos como os de *H. americanus* e as descargas totais chegaram a atingir as 3800 ton em 1932, sofrendo um declínio para 1800 ton em 1980. Depois foi observado um aumento errático até atingir um nível superior às 3000 ton em 1999, principalmente resultado dum incremento das capturas no Reino Unido e Irlanda (Bell et al. 2005). Os stocks de lavagante europeu sofreram um declínio até níveis muito baixos na Noruega, Suécia, Holanda, Alemanha e Dinamarca em meados dos anos 80 do Séc. XX (Van der Meeren, 1991; Browne et al., 2001). Da mesma forma foram observados colapsos dos stocks de lavagante em Itália, em especial no Adriático (Scovacricchi, 1999), assim como na Turquia, Argélia, Espanha e Portugal (Browne et al., 2001).

Tabela 1.1 – Evolução dos totais anuais de desembarque de Lavagante, em toneladas, em Portugal entre 2001 e 2010 e o valor médio anual em euro/kg (Fonte: Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura)

Ano	Total Anual Desembarque (ton)	Valor Médio (EUR/kg)
2001	1,8	25,08 ^x
2002	2,0	23,96
2003	2,7	24,23
2004	2,8	22,16
2005	2,1	22,82
2006	3,4	23,37
2007	3,3	24,91
2008	3,1	23,88
2009	4,2	19,38
2010	3,5	18,97

^x valor adaptado realizando a conversão do Escudo em Euro

Tanto o *Homarus gammarus* (Linnaeus, 1758) como o *Homarus americanus* (H. Milne Edwards, 1837), têm sido olhados com interesse pelo seu potencial para aquacultura e aumento de stock desde meados do século XIX (Aiken e Waddy, 1995; Agnalt et al., 1999; Nicosia e Lavalli, 1999; Wickens e Lee, 2002). Tanto na América do Norte como na Europa tem sido levado a cabo um trabalho considerável de desenvolvimento de técnicas de produção de juvenis com o objectivo de aumento dos stocks (Nicosia e Lavalli, 1999). Actualmente, recorre-se a uma de duas estratégias para aumentar os stocks selvagens de *Homarus* usando indivíduos criados em maternidade. Uma das estratégias é a repetida libertação de um grande número (>5000) de pós larvas (estádio IV e V; comprimento da carapaça de 5-7mm) em fundos seleccionados. Esta opção verifica-se sobretudo quando existem dificuldades de espaço, tempo ou financeiras para fazer o cultivo destes indivíduos até tamanhos maiores e que possibilitariam maiores taxas de sobrevivência. A outra estratégia é a de criar em condições controladas, durante 5-8 meses até ao estágio XII+ (comprimento da carapaça de 12-16 mm) e então libertar números menores (<1000) destes juvenis (Beal et al. 2002).



Figura 1.1 – Juvenil de *Homarus gammarus* com aproximadamente 30 mm de comprimento total, a alimentar-se de mexilhão (Laboratório de Aquacultura da ESTM-IPL)



Figura 1.2– Juvenil de *Homarus gammarus* com aproximadamente 40 mm de comprimento total (Laboratório de Aquacultura da ESTM-IPL)

O trabalho recente de Benavente et al. (2010) apresenta resultados interessantes, com a cultura de lavagantes do estágio V até juvenis com 40-50 mm de comprimento total, com taxas de sobrevivência elevadas (82-89%) e envolvendo baixo investimento financeiro. O cultivo dos juvenis foi levado a cabo recorrendo à utilização de caixas (cestos de ostras) submersas em estruturas de cultivo de bivalves. Os juvenis alimentaram-se de plâncton e de organismos que naturalmente cresciam no interior das estruturas. A estratégia de libertação de juvenis, para aumento de stock numa determinada região, parece ser eficaz. Observou-se que uma grande maioria das recapturas de fêmeas cultivadas em maternidade, foi efectuada dentro de um raio de 1 km da área onde foram libertadas (Agnalt et al., 2007).

1.2. Desenvolvimento larvar

O desenvolvimento larvar no lavagante europeu compreende três estádios larvares pelágicos (I, II e III). A sucessão dos estádios está marcada pela muda ou ecdise. Os três estádios larvares são considerados equivalentes aos estádios de zoea de outros decápodes pois utilizam os apêndices torácicos para locomoção. O estágio pós-larva IV é o primeiro estágio juvenil (Browne et al., 2009; Schmalenbach e Franke, 2010).

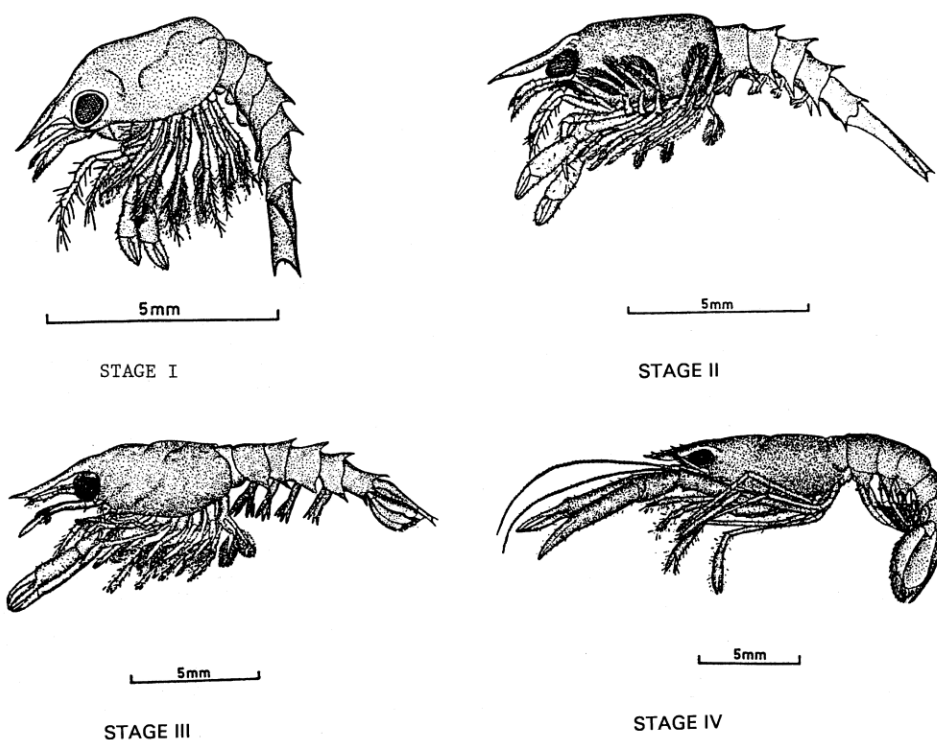


Figura 1.3 – Estádios larvares (Zoea I, II e III) e pós larva (estádio IV) de Lavagante Europeu (*Homarus gammarus*) (adaptado de Nicosia e Lavalli, 1999)

As fases larvares são distinguíveis pelo grau de desenvolvimento dos pleópodes que apresentam. A maioria da mortalidade nesta espécie, ocorre nas fases pelágicas. Na fase de estágio IV ou estágio pós-larva, iniciam a exploração do leito marinho procurando o substrato adequado para se alojarem (Browne et al., 2009). A larva de *Homarus gammarus* não se distingue da larva de *Homarus americanus* mas é 20-40% maior (Gruffydd et al., 1975). A duração desta fase está fortemente influenciada pela temperatura da água e está documentada entre 14 e 20 dias (Jørstad et al. 2001). De acordo com Nicosia e Lavalli (1999) dependendo da temperatura da água, o tempo necessário para que a larva evolua do estágio I até ao estágio IV pode variar consideravelmente de 11 a 42 dias. O período intermuda (figura 1.4) aumenta com o estágio larvar e diminui com o aumento da temperatura (Schmalenbach e Franke, 2010).

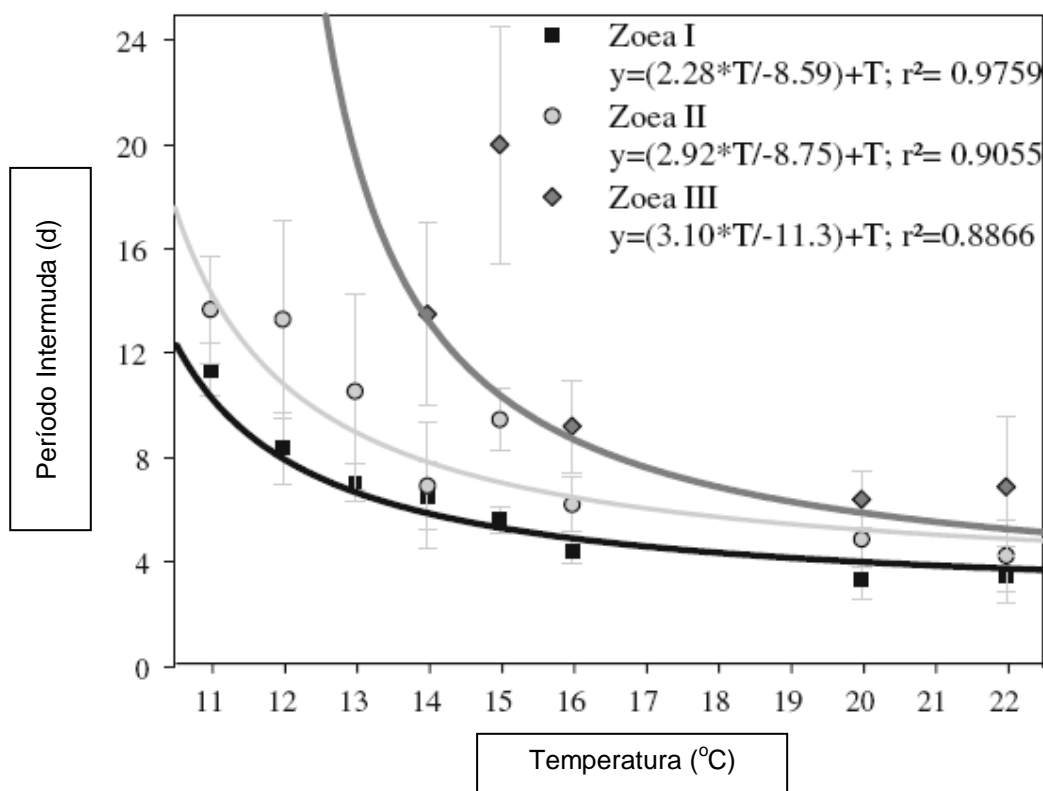


Figura 1.4 – Efeito da temperatura no período intermuda (duração dos estádios larvares Zoea I, II e III) no desenvolvimento de *Homarus gammarus* (dias, média SD); regressão não-linear com coeficientes (r^2) (Adaptado de Schmalenbach e Franke, 2010).

A temperatura desempenha assim um importante papel tanto na sobrevivência como na velocidade de crescimento. Ensaios de desenvolvimento larvar de *Homarus gammarus* a temperaturas constantes mostraram que não existe sucesso no

desenvolvimento larvar a temperaturas inferiores a 14°C, não sendo atingido o primeiro estágio juvenil. A sobrevivência das larvas aumenta de 9% a 14°C para 80% a 22°C, enquanto que a duração da fase larvar diminui, respectivamente, de 26,3 para 13,5 dias (Schmalenbach e Franke, 2010).

1.2.1. Estádio larvar I (Zoea I)

A larva de estágio I é pelágica e apresenta uma resposta positiva à luz. (Browne et al., 2009). Tem um comprimento de aproximadamente 8mm. Nos estádios pelágicos a natação é acompanhada de batimentos metacrónicos dos exopoditos que estão em movimento contínuo durante a locomoção. Observa-se que quando abrandam em repouso, as larvas afundam. Estes períodos são normalmente de curta duração e são seguidos por novos batimentos activos. Normalmente, as Zoea I e II nadam em frente e para cima, com a superfície dorsal do corpo orientada na direcção do movimento e o abdómen ligeiramente curvado para baixo ou flectido debaixo do corpo. Outra forma frequente de natação é uma progressão directa para a frente, sendo formas menos comuns a flutuação vertical e movimentos para frente e para trás. Além da propulsão fornecida pelos apêndices, as larvas de *Homarus* são também capazes de se deslocar por rápidos movimentos da cauda (chicotear com a cauda). Estas flexões abdominais constituem uma reacção de escape, pois ocorrem apenas quando o animal contacta com um objecto sólido como a parede de um tanque ou outra larva (Neil et al., 1976). Schmalenbach e Buchholz (2011), observaram que numa coluna artificial de água, as larvas recém eclodidas apresentam fototropismo positivo para luz branca a intensidades próximas de $0,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O comportamento de fototropismo positivo diminui com a idade da larva e evolução do estágio larvar, sendo que as larvas mais velhas distribuem-se principalmente, nas camadas mais profundas e próximo do fundo. Segundo Øresland (2007), Zoea I foram encontradas entre e abaixo da termoclina e haloclina. Não tendo sido encontradas larvas nos 2 metros mais próximos da superfície. A resposta positiva à luz nos primeiros estádios larvares pode promover algum grau de dispersão das larvas (Schmalenbach e Buchholz, 2011). As larvas de lavagante apresentam reotaxia positiva, logo capazes de nadar em direcção contrária à corrente. Schmalenbach e Buchholz (2011), observaram uma velocidade de deslocação vertical das larvas Zoea I de $4,6 \pm 0,5 \text{ cm s}^{-1}$ e uma velocidade de deslocação horizontal de $0,7 \pm 1,0 \text{ cm s}^{-1}$.



Figura 1.5 – Lavagante Europeu *Homarus gammarus* no estágio larvar I (zoea I) (Laboratório de Aquacultura ESTM-IPL)

Este estágio larvar apresenta uma considerável variação na sua cor até 18 horas após a eclosão. A pigmentação vermelha e amarela é produzida por cromatóforos distribuídos por zonas específicas do corpo. A larva do primeiro estágio é segmentada, com a cutícula transparente deixando visíveis os órgãos internos. Aproximadamente 24 horas após a eclosão, a cutícula escurece e torna-se opaca (Browne et al., 2009). Trabalhos referidos por Nicosia e Lavalli (1999), referem que as larvas de estágio I e II de *Homarus americanus*, no meio natural, consomem *Podon sp.* (Cladocera) e copépodes. A dieta é composta por organismos com dimensões entre 210-610 μm , com o tamanho da presa a aumentar à medida que a larva cresce.

1.2.2. Estádio larvar II (Zoea II)

A larva deste estágio assemelha-se muito à larva de estágio I em comportamento e coloração. Nesta fase de desenvolvimento, os pleópodes projectam-se como processos bífidos, faltando uma franja de cerdas plumosas, característicos de fases mais avançadas. Os apêndices na cauda (urópodes) não são livres (Browne et al., 2009). Segundo Schmalenbach e Buchholz (2011), a capacidade de deslocação horizontal aumenta com o estágio larvar sendo a velocidade das zoea II de aproximadamente $1,5 \pm 0,9 \text{ cm s}^{-1}$.

1.2.3. Estádio Larvar III (Zoea III)

A larva de estágio III mantém a sua existência planctônica devido aos seus exopoditos. As pinças são relativamente maiores que na fase larvar anterior, assim como os pleópodes que consistem em dois processos em forma de remo que apresentam constrição na haste. Os ramos das margens distais possuem uma franja de cerdas. Esta fase larvar, na ausência de corrente de água ascendente, tende a depositar-se no fundo dos tanques de cultura. Se as larvas forem deixadas nestas condições ocorre um aumento da mortalidade devido a canibalismo e a depleção de O₂ (Browne et al., 2009). As Zoea III, são capazes dos mesmos tipos de locomoção que os descritos para a Zoea I, mas em tanques de cultivo são encontradas mais frequentemente a nadar próximas do fundo (Neil et al., 1976). A velocidade de deslocação horizontal das larvas de *H. gammarus* de estágio III é de $2,2 \pm 0,7 \text{ cm s}^{-1}$ (Schmalenbach e Buchholz, 2011).



Figura 1.6 – Lavagante europeu, *Homarus gammarus*, estágio larvar III (zoea III) (Laboratório de Aquacultura ESTM-IPL)

Nicosia e Lavalli (1999), referem que as larvas de estágio III de *Homarus americanus*, em meio selvagem, consomem larvas de gastrópodes, larvas de caranguejo e copépodes.

1.2.4. Estádio IV (pós Larva)

O estágio IV é referido como pós-larva (Browne et al., 2009) ou larva megalops. Diferem consideravelmente da larva de estágio III, assemelhando-se ao lavagante adulto. O estágio IV apresenta 1,5 a 2 cm de comprimento total (Beal et al. 2002) ou 4,5 mm de comprimento de carapaça (Phillips, 2006) e são nesta fase extremamente vulneráveis a predação. É o primeiro estágio bentônico (Uglen et al., 2006). São nadadores direccionais (Cobb et al. 1989) usando os seus pleópodes, enquanto os pereiópodes são utilizados para andar. O estágio IV é fortemente planctônico durante 4 a 5 dias após a metamorfose, mas tornam-se gradualmente bentônicas.

A metamorfose ocorre na muda do último estágio de zoea para o estágio pós-larva. Esta metamorfose envolve um conjunto de alterações: uma modificação no plano do corpo, pois a pós larva assemelha-se ao juvenil e ao adulto; uma modificação no comportamento pois começam a nadar utilizando os pleópodes em vez dos apêndices torácicos; e uma modificação no habitat, de pelágico para benthico. O conjunto de alterações não ocorre simultaneamente. Enquanto o movimento de natação se inicia imediatamente após a muda, a alteração comportamental demora alguns dias (Cobb et al. 1989). No *Homarus*, a metamorfose ocorrida entre o estágio larvar III e a pós-larva, parece ocorrer com maior frequência durante a fase escura do fotoperíodo, mas se submetidos a iluminação constante esta muda ocorre aleatoriamente ao longo do dia (Phillips, 2006). O trabalho de Waddy e Aiken (1999), mostra que larvas cultivadas sob um fotoperíodo cíclico tendem a apresentar as mudas durante a fase escura, mesmo quando as fases de luz e escuridão do ciclo são invertidas. Isto sugere que o ritmo das mudas ocorre sob a influência de um pacemaker endógeno que é influenciado pelo fotoperíodo.

Quanto ao assentamento, o trabalho de Boudreau et al. (1990), suporta a hipótese de que a pós larva de lavagante consegue fazer uma escolha activa do meio bentônico adequado e atrasará o assentamento se não encontrar as condições apropriadas. Relativamente à alimentação em meio selvagem, Juinio e Cobb (1992) observaram que a pós larva de *Homarus americanus* tem predominantemente hábitos alimentares carnívoros. Os itens encontrados com maior frequência nos estômagos foram copépodes, larvas de decápodes, ovos de peixes e partes de insectos. Observaram também que a desproporção da frequência de ocorrência no tracto digestivo de espécies de copépodes de maiores dimensões e de larvas de decápodes, relativamente à sua densidade no

plâncton sugere uma preferência por presas de maiores dimensões. Parece existir também uma actividade alimentar maior durante a noite. As tentativas de localizar em meio natural, juvenis de *Homarus gammarus* na Europa não têm sido bem sucedidas, quer devido a densidades extremamente baixas ou devido a falhas na identificação do habitat dos juvenis (Linnane et al., 2001). Contudo, o trabalho de Linnane et al. (2000) em mesocosmos revelou preferência do *Homarus gammarus* por colonizar substratos que forneçam abrigos pré-existentes em forma de espaços intersticiais como os de paralelepípedos ou de casca de mexilhão em vez de substrato de areia ou de algas coralinas. Estes autores confirmam que para um animal como o lavagante, a estrutura física do habitat é um factor chave na determinação tanto do tamanho como do número de animais instalados. Em várias espécies de invertebrados, o tamanho e a idade a que ocorre a metamorfose e o momento do assentamento influenciam o subsequente tamanho, condição e risco de predação dos juvenis. No *H. americanus*, as larvas que sofreram metamorfose e assentaram no início da estação, resultaram em juvenis 30-50% maiores e dois ou três estádios mais avançados do que os que assentaram mais tardiamente quando se instalou o inverno. A vantagem em termos de tamanho pode trazer um risco menor de predação para os indivíduos maiores (James-Pirri et al. 1998).

1.3. Maternidade de *Homarus gammarus*

1.3.1. Reprodutoras

A maioria dos trabalhos analisados (ou maternidades de lavagantes) refere a utilização de fêmeas selvagens ovadas, submetidas a períodos variáveis de adaptação. A segurança, em termos sanitários, das fêmeas a utilizar é muito importante para o sucesso do trabalho de maternidade. Assim, as fêmeas selvagens deverão ser capturadas em zona com baixo risco de incidência de patologias e as empresas onde são adquiridas devem apresentar elevados padrões de qualidade. Segundo Kristiansen et al. (2004), a manutenção de um efectivo de reprodutores de lavagante com origem na captura de exemplares selvagens é actualmente a forma mais segura de suprir a necessidade de juvenis para aquacultura. Em termos de capacidade produtiva, quanto maiores forem as fêmeas, maior será o número de ovos e mais pesadas serão as larvas produzidas (Contarini et al., 2008).

Após a aquisição, as fêmeas ovadas deverão ser transportadas para as instalações da maternidade, em tanques com água do mar e oxigenação (Uglem et al., 2006) e durante um período de tempo tão curto quanto o possível a fim de reduzir o stress a que estão submetidas. Normalmente as fêmeas adquiridas durante a primavera, apresentam ovos com um estágio avançado de desenvolvimento, com uma cor laranja/avermelhada e com o olho do embrião visível. As fêmeas obtidas durante o Outono, apresentam os ovos num estágio mais atrasado de desenvolvimento, possuindo ainda uma coloração negra e onde não é observável o olho.



Figura 1.7 – Fêmea de Lavagante *Homarus gammarus* evidenciando ovos presos aos pleópodes (Laboratório Aquacultura da ESTM-IPL)

Na maternidade normalmente são alojadas individualmente em tanques com capacidades que podem variar, sendo indicados alguns volumes entre 60 l e 77 l (Uglem et al., 2006; Schmalenbach e Buchholz, 2010) com circulação contínua de água (2l por min.) (Uglem et al., 2006). Se relativamente baixos, os tanques podem ser cobertos por uma rede para prevenir a fuga dos animais. No que se refere à salinidade, a água dos tanques das fêmeas adultas pode ser mantida com valores de 28-32 psu (Beard e Wickins, 1992), com uma salinidade média de 31 psu (Schmalenbach e Buchholz, 2010).

O fotoperíodo referido nos trabalhos analisados foi o ciclo natural (Schmalenbach e Buchholz, 2010).

Uma amostra das fêmeas deverá ser frequentemente (semanalmente) examinada durante o período de incubação para se monitorizar o desenvolvimento embrionário e verificar se ocorreram perdas de ovos. Poderão ser recolhidos alguns ovos para mensuração do olho. O estado de desenvolvimento pode ser determinado pela medição do tamanho do olho dos embriões (Ejemo et al., 2008; Uglem et al. 2006). A capacidade de produção de larvas das fêmeas está relacionada com o seu tamanho. Contarini et al. (2008) apresentam uma equação que relaciona o comprimento do cefalotórax (CL) com o número de larvas produzido:

$$\text{Número de Larvas} = 1.2171\text{CL}^2 - 21.777 \text{CL} - 6281.12$$

$$R^2 = 0.743$$

As fêmeas podem ser alimentadas com uma quantidade equivalente a cerca de 1% do peso corporal por dia (Beard e Wickins, 1992). Alimentadas com camarão *Crangon* spp congelado e mexilhão fresco (*Mytilus*) (Beard e Wickins, 1992), ou mexilhão fresco e congelado e lula congelada (Uglem et al., 2006). Alguns trabalhos indicam a utilização de um regime *ad libitum*, onde as fêmeas adultas foram alimentadas com uma mistura de crustáceos (*Carcinus maenas*, *Crangon* spp., *Liocarcinus* spp.) e de pequenos peixes (*Myoxocephalus scorpius*, *Pholis gunellus* e *Pleuronectes platessa*) (Schmalenbach e Buchholz, 2010; Schmalenbach e Franke, 2010). No seu trabalho, Arnold et al. (2009) alimentaram as fêmeas ovadas num regime *ad libitum* com mexilhão (*Mytilus edulis*).

A temperatura da água nos tanques de manutenção das fêmeas reprodutoras varia entre 14 e 16°C (Beard e Wickins, 1992), entre 13,7 e 15,9°C (Contarini et al., 2008), entre 18 e 20°C (Arnold et al., 2009), entre 13,1 e 15,2°C (Schmalenbach e Franke, 2010). As lavagantes atingem rapidamente a maturidade a 20°C, porém a esta temperatura o desempenho reprodutivo é pobre tanto na produção de ovos (aproximadamente 5% de desova) como na fixação dos mesmos (Aiken e Waddy 1995; Wickens e Lee 2002). Quanto ao tempo dispendido numa maternidade de lavagantes nas operações relacionadas com as reprodutoras ovadas, Beard e Wickins (1992) estimam que o tempo

para preparar o alimento e distribuí-lo às fêmeas, remover detritos e alimento não consumido dos tanques é de aproximadamente 1 h/dia, e que 1h mais é dispendida cada quinzena na limpeza de outras partes do sistema (reservatórios, tubagens,...).

1.3.2. Cultivo Larvar

O cultivo larvar de lavagantes requer a manutenção de bons padrões de higiene das instalações e equipamentos e de isolamento de outras actividades de aquícolas para prevenir a introdução de agentes patogénicos e de água com qualidade sub óptima (Uglem et al., 2006).

Quando se observa que os ovos apresentam o seu desenvolvimento embrionário praticamente completo, as fêmeas poderão ser transferidas para tanques de eclosão. No trabalho de Kristiansen et al. (2004), as estruturas para a eclosão das larvas consistiam em tanques de polietileno com a capacidade de 70 l. Nestes tanques era mantido um fluxo de 2-3 l/min de água salgada filtrada e tratada por radiação Ultravioleta (UV). Estes sistemas possuíam uma tubagem na parte superior do tanque que conduz a água a recipientes equipados com um filtro para reterem as larvas. No trabalho de Uglem et al. (2006), os sistemas de eclosão consistiam em tanques cilíndricos com um volume de 130 l. Estes tanques eram moderadamente arejados com recurso a bomba de baixa pressão e a pedras difusoras. As larvas recentemente eclodidas são então, cada manhã, recolhidas dos tanques de eclosão ou dos colectores de larvas (nos sistemas que os possuem) seleccionadas e contadas. São então transferidas para os tanques de cultivo larvar. Normalmente só larvas de uma fêmea são cultivadas em cada tanque de cultivo (Kristiansen et al., 2004). De forma a reduzir as diferenças de tamanho e evitar o canibalismo durante os últimos estádios de cultivo, em cada tanque de crescimento larvar devem apenas ser colocadas larvas que tenham eclodido dentro de um período de dois dias (Beard e Wickins, 1992; Browne et al., 2009).

Nos sistemas de crescimento larvar podem ser usados tanques cónicos ou cilindrocónicos com arejamento e com entrada de água na parte inferior do tanque a fim de evitar a deposição das larvas de lavagante no fundo do tanque e permitindo mantê-las em suspensão (National Lobster Hatchery) com um volume de 40 l e com circulação de água de 10 l/min (Kristiansen et al., 2004), com 70l de capacidade (National Lobster Hatchery) ou de 90l (Browne et al., 2009). No seu trabalho Uglem et al. (2006), utilizaram tanques cilindrocónicos com 90l capacidade e um diâmetro interno superior de 35cm.

Normalmente recorre-se a recirculação de água, com sistemas de filtração (filtro de 1 micron) e tratamento UV da água. Arnold et al. (2009), referem um pré-tratamento da água com passagem em filtro de areia, em carvão activado e sujeita a radiação Ultravioleta para controlo de microrganismos. O nível de temperatura óptimo para sobrevivência das larvas de *Homarus gammarus* ocorre no intervalo entre 16 e 22 °C (Schmalenbach e Franke, 2010). Relativamente à temperatura de cultivo, esta foi de 17 – 19 °C (Schmalenbach et al. 2009), de 18 - 20 °C (Arnold et al, 2009; Kristiansen et al., 2004; Uglem et al. 2006), de 18 °C (Schmalenbach e Buchholz, 2010), de 20 °C (Schmalenbach et al. 2011). Outras condições de cultivo foram de salinidade de 31 psu e fotoperíodo artificial de 12:12h de ciclo luz:escuridão (Schmalenbach e Buchholz, 2010).

Relativamente a densidades praticadas no cultivo larvar de *Homarus gammarus* observa-se uma tentativa de equilíbrio entre densidades mais elevadas que permitam obter um número elevado de indivíduos juvenis e rentabilizar o investimento feito nas estruturas, equipamentos e mão-de-obra das maternidades e o cultivo praticado com densidades mais baixas que permitem obter menores mortalidades por canibalismo e patologia. Os estádios larvares e pós-larvas de lavagantes ocorrem no meio natural em densidades tão baixas, que situações de sobredensidade intra-específica têm pouca probabilidade de ser um factor limitante ao crescimento. Mas em cultivo, os efeitos da densidade são bem conhecidos, com a limitação do alimento, o canibalismo e surtos de doença a serem mais frequentes em cultivos realizados a altas densidades (Phillips, 2006). Segundo Contarini et al. (2008), é observada uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência das larvas quando se aumenta a densidade de cultivo. Assim, nos trabalhos consultados verificam-se densidades de cultivo de 7 a 11 larvas/l (Browne et al. 2009), de 20 a 25 larvas/l (National Lobster Hatchery), de 25 e de 37 larvas/l (Beard e Wickins, 1992) até 37 larvas/l (Kristiansen et al., 2004); entre 11 e 150 larvas/l (Contarini et al. 2008). Quanto às dietas normalmente utilizadas no cultivo das larvas de *Homarus gammarus*, estas assentam muito na utilização de *Artemia* sp.. A tabela 1.2 apresenta alguns exemplos de regimes alimentares utilizados no cultivo destas larvas.

Tabela 1.2- Exemplos de regimes alimentares utilizados no cultivo de larvas de *Homarus*.

Alimentação das larvas de <i>Homarus</i>	Fonte
Cistos descapsulados e náuplios de <i>Artemia</i> e microalga viva (<i>Isochrysis galbana</i> e T-ISO) a cada 2 dias	Uglem et al. (2006)
Mysis congeladas de camarão (<i>Neomysis</i> sp.) duas vezes ao dia, suplementada com náuplios recém eclodidos de <i>Artemia</i> três vezes por semana	Beard e Wickins (1992)
Náuplios de <i>Artemia</i> (densidade de 5 indivíduos ml ⁻¹ água salgada)	Arnold et al. (2009)
<i>Artemia</i> congelada e mysis congeladas, duas vezes ao dia	Kristiansen et al. (2004)
Náuplios recém eclodidos de <i>Artemia</i> sp. (30 náuplios/ larva lavagante) diariamente	Schmalenbach e Buchholz, (2010); Schmalenbach e Franke, (2010)
Cistos descapsulados e náuplios de <i>Artemia</i> e microalga viva (<i>Isochrysis galbana</i> e <i>Chaetoceros</i>)	Browne et al. (2009)
Náuplios recém eclodidos de <i>Artemia franciscana</i> e com sapateira (<i>Cancer pagurus</i> , Linnaeus, 1758) triturada a cada dois dias.	Schmalenbach et al. (2009); Schmalenbach et al. (2011)
Adultos congelados de <i>Artemia salina</i> .	Mantiri et al. (1995)
Estádios I e II – náuplios vivos de <i>Artemia</i> enriquecidos Estádio II mais avançado e estágio III – náuplios vivos de <i>Artemia</i> , copépodes congelados, krill e mysis de camarão.	National Lobster Hatchery
Náuplios vivos de <i>Artemia</i> (densidade de 25/ml) preservados com pasta de algas (<i>Isochrysis</i> e <i>Chaetoceros</i>)	Castro e Cobb (2005) ^a
Metanáuplios de <i>Artemia</i> e microalgas (<i>Tetraselmis</i> , <i>Isochrysis</i> sp), a cada dois dias	Contarini et al. (2008)

^a*Homarus americanus*

As larvas de *Homarus gammarus* atingiram o primeiro estágio juvenil (estádio IV) em aproximadamente 12 dias (Kristiansen et al., 2004), ou 15 dias (Schmalenbach et al. 2011). Normalmente, no final do desenvolvimento larvar, os indivíduos de estágio IV (pós larva) são recolhidos um a um e transferidos para compartimentos individuais o mais cedo possível após a muda, a fim de evitar perda de pinças e canibalismo (Kristiansen et al., 2004).

1.4. Objectivos

O presente estudo teve como objectivo principal avaliar o efeito de duas dietas sobre a taxa de sobrevivência e sobre o crescimento de larvas de *Homarus gammarus*. As duas dietas em teste foram náuplios recém eclodidos de *Artemia* e *Artemia* mantida em meio de enriquecimento com *Isochrysis galbana*, durante 24h. O cultivo foi realizado com uma densidade inicial de 5 larvas/litro e em tanques de fundo cónico de baixo volume (4L).

2. Material e Métodos

2.1. Aquisição e manutenção das reprodutoras

Este trabalho experimental foi desenvolvido entre Janeiro e Junho de 2011, no âmbito da tese de mestrado em Aquacultura.

Para a obtenção das larvas recém eclodidas de lavagante europeu, *Homarus gammarus*, foram adquiridas fêmeas ovadas. Atendendo à dificuldade de conseguir obter fêmeas com origem local, optou-se por adquirir as reprodutoras a uma empresa de importação, Viveiros Frutos do Mar, sita na localidade de Porto Novo (Lourinhã). As fêmeas ovadas utilizadas tinham origem em capturas efectuadas na região do Canal da Mancha. Estas foram mantidas em tanques no laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Aquando da recepção das reprodutoras, estas foram pesadas e procedeu-se à desinfeção das mesmas, mergulhando o abdómen numa solução a 1% de iodopovidona (Betadine®) (Uglem et al., 2006). Segundo Uglem et al. (1996) o tratamento dos ovos com uma solução iodada pode ser uma estratégia para reduzir o desenvolvimento bacteriano nos ovos de lavagante de forma a reduzir a mortalidade dos embriões devido a contaminações bacterianas.



Figura 2.1 – Desinfeção dos ovos com solução de iodopovidona por imersão do abdómen de fêmea de *Homarus gammarus*.

As fêmeas adquiridas apresentavam um peso corporal de 1010g ± 105g. Foram colocadas, individualmente, em tanques com a capacidade de 500 l, num sistema fechado de recirculação de água, TMC System 2500. A qualidade da água foi monitorizada durante o decorrer do ensaio, sendo observados os parâmetros de temperatura, salinidade, pH e amónia. A temperatura à chegada das reprodutoras ovadas foi de 18°C, tendo sido realizado um aumento gradual até aos 21°C, a fim de promover o desenvolvimento embrionário e de reduzir o diferencial térmico para as larvas aquando da eclosão e posterior transferência para os tanques de crescimento larvar. Os parâmetros salinidade, pH e a amónia nos tanques foram mantidos relativamente constantes e dentro de valores aceitáveis para a espécie durante todo o ensaio. Ao sistema foi acrescentado arejamento e adicionadas estruturas cilíndricas para serem utilizadas pelas fêmeas como abrigos, a fim de criar uma área de refúgio para reduzir o stress das fêmeas. Trabalhos com *H. gammarus* (Beard e Wickins 1992) indicam que a utilização de abrigos desenhados de acordo com os requisitos comportamentais das fêmeas selvagens durante a incubação, aumentam a proporção de ovos que atingem o desenvolvimento completo e por conseguinte o número de larvas produzidas por fêmea. Durante o período em que decorreu o trabalho experimental, as fêmeas estiveram sujeitas a um fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro. As fêmeas de *H. gammarus* foram alimentadas diariamente e de forma alternada com mexilhão (*Mytilus* sp.) ou camarão congelado, sendo a quantidade administrada equivalente a 2-3% do peso corporal de cada fêmea. Aproximadamente, três vezes por semana, os tanques das reprodutoras foram sifonados e eram retirados os restos de alimento não ingeridos. Para monitorizar o estado de maturação embrionário e prever o tempo esperado para a eclosão foi realizada periodicamente uma medição dos olhos de embriões numa amostra de ovos (Figura 2.2) e avaliado o aspecto geral dos embriões (Figura 2.3). Nesta espécie, um índice de olho embrionário de 600-620 µm indica um desenvolvimento embrionário completo (Beard e Wickins, 1992). Para uma estimativa do tempo necessário para a eclosão, utilizou-se a seguinte equação (Evjemo et al., 2008):

$$\text{Diâmetro médio do olho (D)} = (H+W)/2$$

$$\text{Semanas até eclosão} = (600 \mu\text{m} - D) / [(2,6 \times T) - 8,3]$$

(H- altura do olho do embrião; W – largura do olho do embrião; T- Temperatura da água)



Figura 2.2- Medição do olho de embrião de Lavagante europeu, *Homarus gammarus*

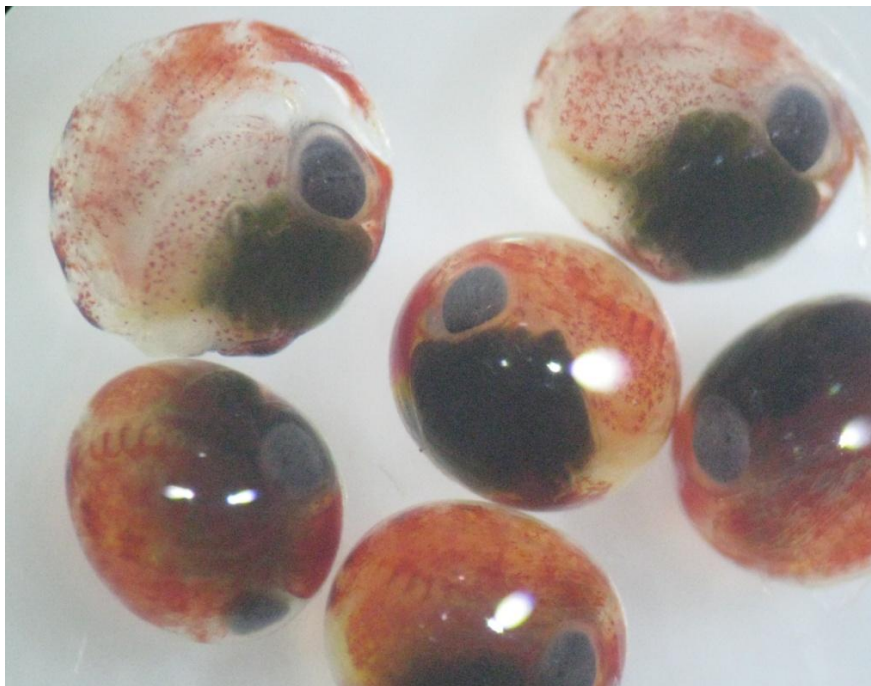


Figura 2.3 – Ovos de Lavagante Europeu, *Homarus gammarus*, na fase final do desenvolvimento embrionário.

2.2. Obtenção das larvas

As larvas de estágio I (Zoea I) recém eclodidas (Figura 2.4) iam sendo recolhidas de manhã, dos tanques das fêmeas ovadas, uma vez que normalmente a eclosão ocorre à noite, seguindo um ritmo endógeno (Ennis, 1973) A recolha foi realizada pelo método do copo (com recurso a um goblet) para reduzir o risco de lesões físicas nas larvas. Estas foram contadas e foram aclimatizadas para introdução nos tanques de crescimento larvar.



Figura 2.4 – Larvas de *Homarus gammarus* de estágio I (Zoea I)

2.3. Sistema de cultivo larvar

Para o cultivo larvar foi construído um sistema composto por 10 tanques de fundo cónico de 4 l (Figura 2.5), com sistema fechado de recirculação de água. Este foi preparado com entrada de água no topo dos tanques e com arejamento proveniente de fundo e mantido com um caudal de 19 l/h (Figura 2.6). O arejamento de fundo visa manter as larvas e o alimento em suspensão de forma a reduzir a probabilidade de contacto entre as larvas e assim reduzir o canibalismo.



Figura 2.5 - Série de 5 tanques de 4 l, utilizada no cultivo larvar



Figura 2.6 – Sistema de recirculação de água utilizado no cultivo larvar. Com entrada de água no topo e arejamento de fundo

Os parâmetros de qualidade da água do sistema de cultivo larvar foram monitorizados diariamente. A temperatura da água neste sistema foi mantida entre os 23-24°C, a salinidade rondou os 33 ‰ e os parâmetros de pH entre 8,1 e 8,2. O oxigênio dissolvido apresentou valores entre 6 e 6,8 mg/l e a amônia e os nitritos foram mantidos durante todo o ensaio, dentro dos valores indicados para *Homarus* sp. (van OIst et al. 1980; Wickins e Lee, 2002).

Este trabalho envolveu a utilização de duas dietas: náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida com a microalga *Isochrysis galbana*. Anteriormente à eclosão das larvas de lavagante, foi preparada uma manga com *Isochrysis galbana* para se poder proceder ao enriquecimento da *Artemia*. Para este ensaio foi utilizada *Artemia salina*, Salt Lake City. Para a descapsulação da artémia foi seguido o protocolo habitualmente utilizado no laboratório de Aquacultura da ESTM (em anexo). Diariamente, para a preparação da dieta de artémia enriquecida, a quantidade de artémia necessária à alimentação dos 5 tanques alocados a esta dieta, era colocada a enriquecer com *Isochrysis galbana* durante aproximadamente 24 h, com arejamento contínuo.

2.4.Desenho experimental

Para cada uma das dietas em estudo (Náuplios recém eclodidos de *Artemia* e *Artemia* enriquecida durante 24h com *Isochrysis galbana*) foi utilizado um total de 100 larvas de *Homarus gammarus*. Estas foram distribuídas por 5 tanques de fundo cônicos de 4l (20 larvas/tanque), resultando uma densidade de cultivo de 5 larvas/l. As larvas utilizadas foram resultado da eclosão de duas fêmeas e foram agrupadas aleatoriamente. Diariamente, foi realizada a manutenção dos tanques e a alimentação das larvas sendo administrado 0,7 g de artémia a cada tanque. Com esta quantidade de artémia pretendeu-se manter o alimento em elevada densidade no sistema de cultivo larvar de forma a reduzir o canibalismo que pode ocorrer em larvas desta espécie e a não limitar, por via da quantidade de alimento, a velocidade de crescimento. Para ambas as dietas, procedeu-se diariamente à contagem das larvas existentes em cada tanque para cálculo da taxa de sobrevivência e mortalidade diária. Realizou-se também a medição do cefalotórax de uma amostra de 5 larvas/tanque, para avaliar a taxa de crescimento. A medição do cefalotórax foi realizada com recurso a um lupa binocular com régua milimétrica (Zeiss Stemi DV4).

2.5.Tratamento Estatístico

Os cálculos realizados na análise estatística dos resultados foram efectuados utilizando o software SPSS para 18.0. Na análise estatística, todos os pressupostos, homogeneidade de variâncias e normalidade foram validados. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de 5%, ou seja, $p < 0,05$. Para analisar o efeito das duas dietas utilizadas, náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida, sobre a mortalidade, no crescimento e nos incrementos no início e no final do trabalho experimental recorreu-se ao teste t-student (ou t-test).

3. Resultados

3.1 Mortalidade larvar diária e Taxa de Sobrevivência

Quando analisado o efeito das duas dietas testadas, na mortalidade diária média das larvas de *Homarus gammarus*, (figura 3.1) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os valores de mortalidade diária (Média \pm desvio-padrão), em termos de proporção, foram para as dietas de naúplios de artémia e para a dieta de artémia enriquecida de $0,21 \pm 0,104$ e de $0,24 \pm 0,152$, respectivamente.

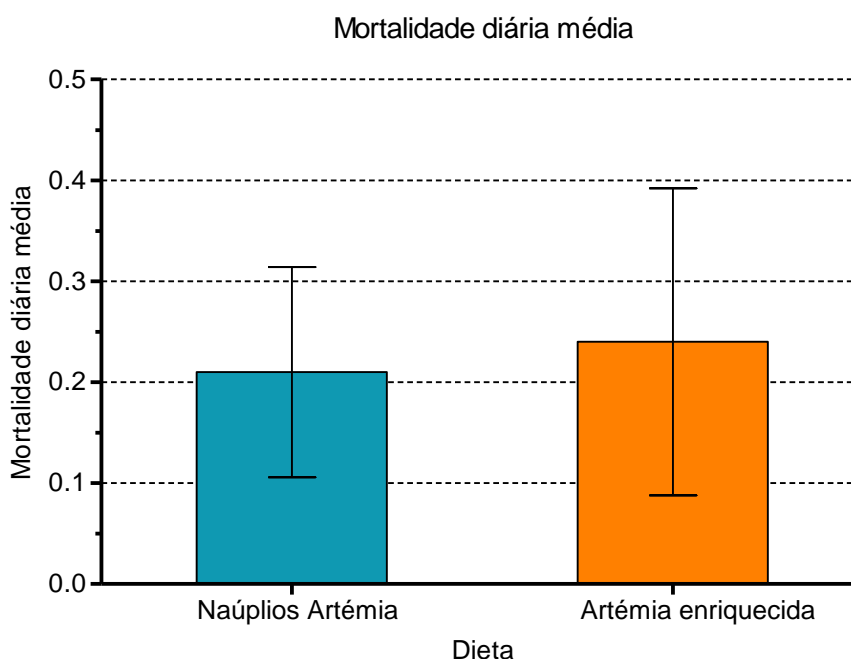


Figura 3.1 – Efeito das duas dietas, naúplios de artémia e artémia enriquecida na mortalidade diária média das larvas de *Homarus gammarus*. As colunas representam a mortalidade das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD). A diferença não é estatisticamente significativa.

Ao incluirmos o factor tempo na análise verifica-se que em ambas as dietas, a mortalidade diária aumenta significativamente. A figura 3.2 ilustra as mortalidades diárias das larvas verificadas ao longo do ensaio e são visíveis taxas de mortalidade diária mais elevadas no final para ambas as dietas.

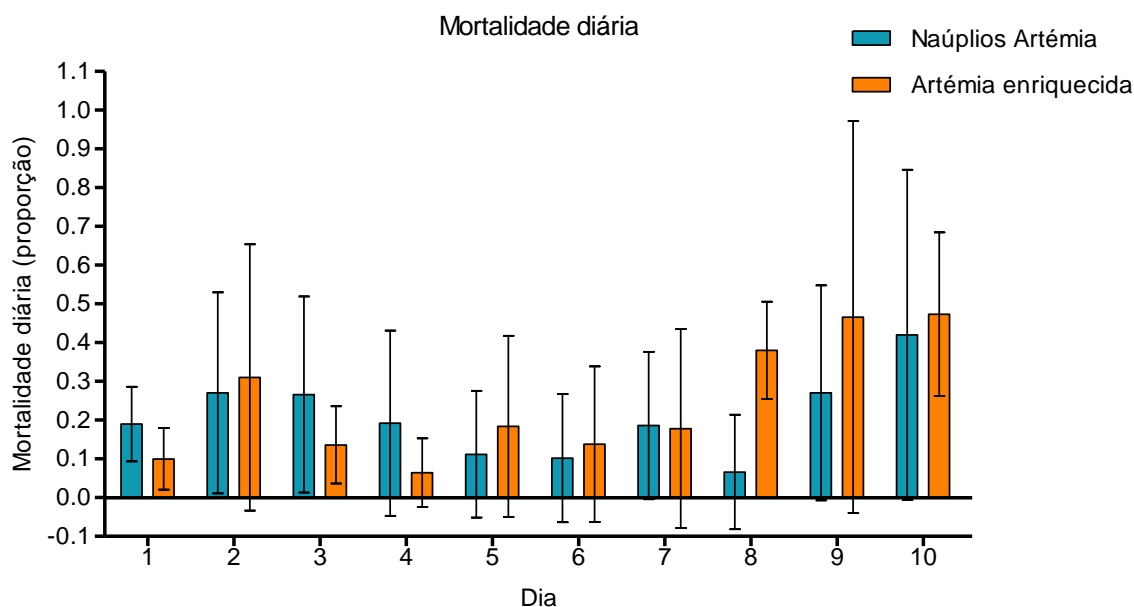


Figura 3.2 - Mortalidade diária das larvas de *Homarus gammarus*, para as duas dietas náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida, em proporção. No gráfico estão representados a média e o desvio padrão (SD)

Quando analisada a taxa de sobrevivência das larvas ao longo do tempo (figura 3.3), verifica-se que no final do ensaio (dia 10) as taxas de sobrevivência para as duas dietas são muito próximas (6% para dieta náuplios de *Artemia* e 5% para dieta *Artemia* enriquecida).

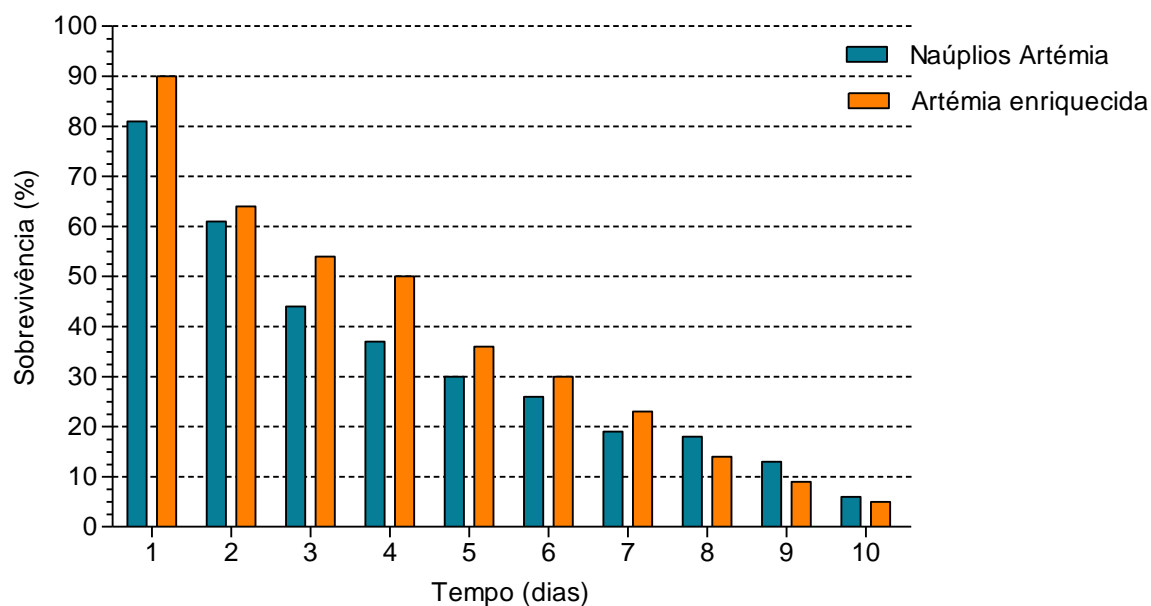


Figura 3.3- Efeito da dieta, náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida com *Isochrysis galbana*, na Taxa de sobrevivência (%) de larvas de *Homarus gammarus* ao longo do tempo do ensaio (até ao 10º dia pós eclosão).

3.2. Crescimento Larvar

Os tamanhos médio das larvas de *H. gammarus* alimentadas com as duas dietas, náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida, estão representados graficamente na figura 3.4. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas no tamanho médio destes indivíduos quando comparadas as duas dietas ($t=4,384$; $p<0,05$). Observou-se que o tamanho médio, avaliando o comprimento do cefalotórax, das larvas com a dieta náuplios de *Artemia* foi superior ao tamanho médio verificado com a dieta *Artemia* enriquecida (5,65mm vs 5,10mm).

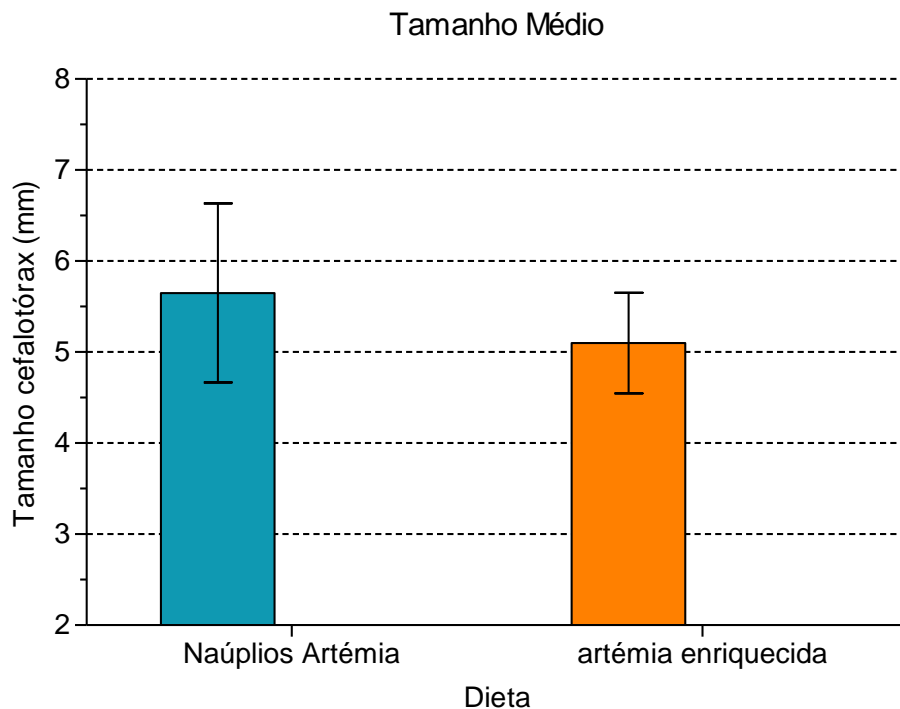


Figura 3.4 – Efeito das dietas, náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida, no tamanho médio (mm) do cefalotórax de larvas de *Homarus gammarus*. As colunas representam o tamanho médio das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD); a diferença média é significativa ao nível de 0,05 ($p<0,05$).

A figura 3.5 ilustra a evolução do tamanho diário (comprimento cefalotórax) das larvas para ambas as dietas. É possível observar que a partir do dia 4 do ensaio se verifica uma vantagem numérica em termos de tamanho para as larvas cultivadas com a dieta náuplios de *Artemia*.

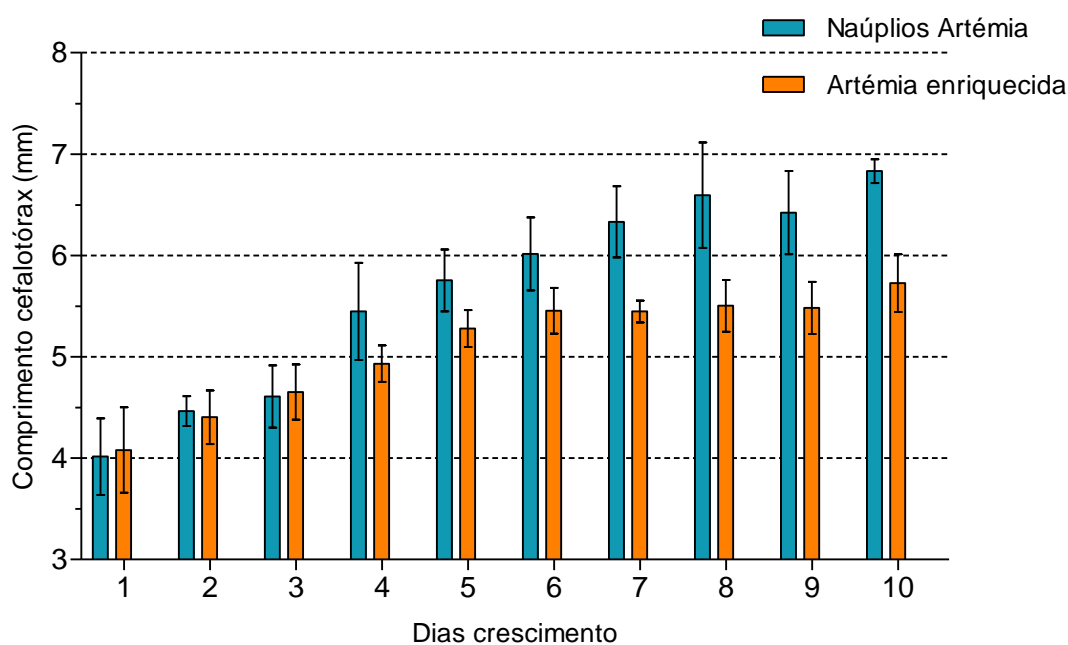


Figura 3.5 – Evolução diária do tamanho das larvas (mm) de lavagante *Homarus gammarus* ao longo do ensaio, alimentadas com a dieta náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida. As colunas ilustram o comprimento larvar médio. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD).

Na análise do crescimento, avaliando o tamanho das larvas no início (dia 1) e final (dia 10) do ensaio (figura 3.6) e comparando as duas dietas, observaram-se apenas diferenças estatisticamente significativas para o dia 10 ($p < 0,05$), com as larvas alimentadas com a dieta de náuplios de *Artemia* a apresentar um maior tamanho (média 6,83mm) que as da dieta de *Artemia* enriquecida (média 5,73mm).

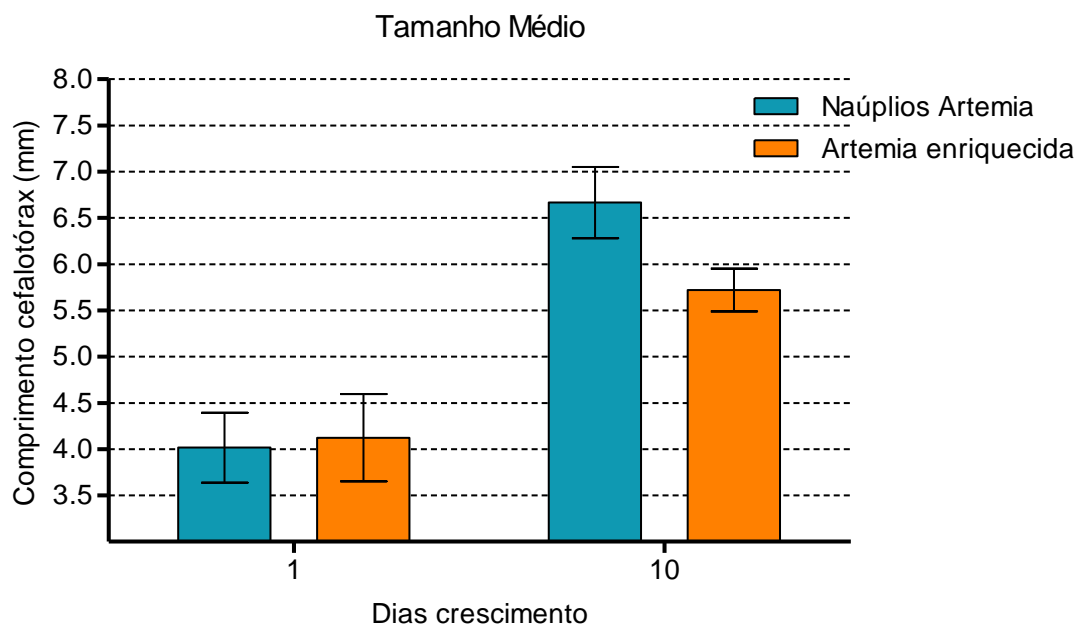


Figura 3.6 - Efeito das dietas, náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida, no tamanho das larvas de *H. gammarus*, medido em comprimento do cefalotórax (mm), no dia um e no dia dez. As colunas representam o tamanho das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD); A diferença média é significativa ($p < 0,05$).

Quando comparados os efeitos do tipo de dieta e do tempo (dias) sobre o tamanho das larvas, foi possível verificar que ambos os factores influenciaram de forma significativa o seu crescimento ($F_{dieta}=577,2$; $p < 0,05$; $F_{dias}=49,51$; $p < 0,05$). É assim possível observar que das duas dietas em ensaio, a dieta de náuplios de artémia proporcionou um tamanho superior que a dieta de artémia enriquecida com *Isochrysis galbana*.

Da observação da relação linear (figura 3.7) do crescimento das larvas (tamanho das larvas/tempo) é possível constatar que o declive da recta de crescimento para a dieta de náuplios de artémia (0,318) é superior ao declive da recta de crescimento das larvas alimentadas com a dieta de artémia enriquecida (0,189). Esta análise reforça a observação de que as larvas apresentaram um crescimento mais elevado com a dieta de náuplios de artémia.

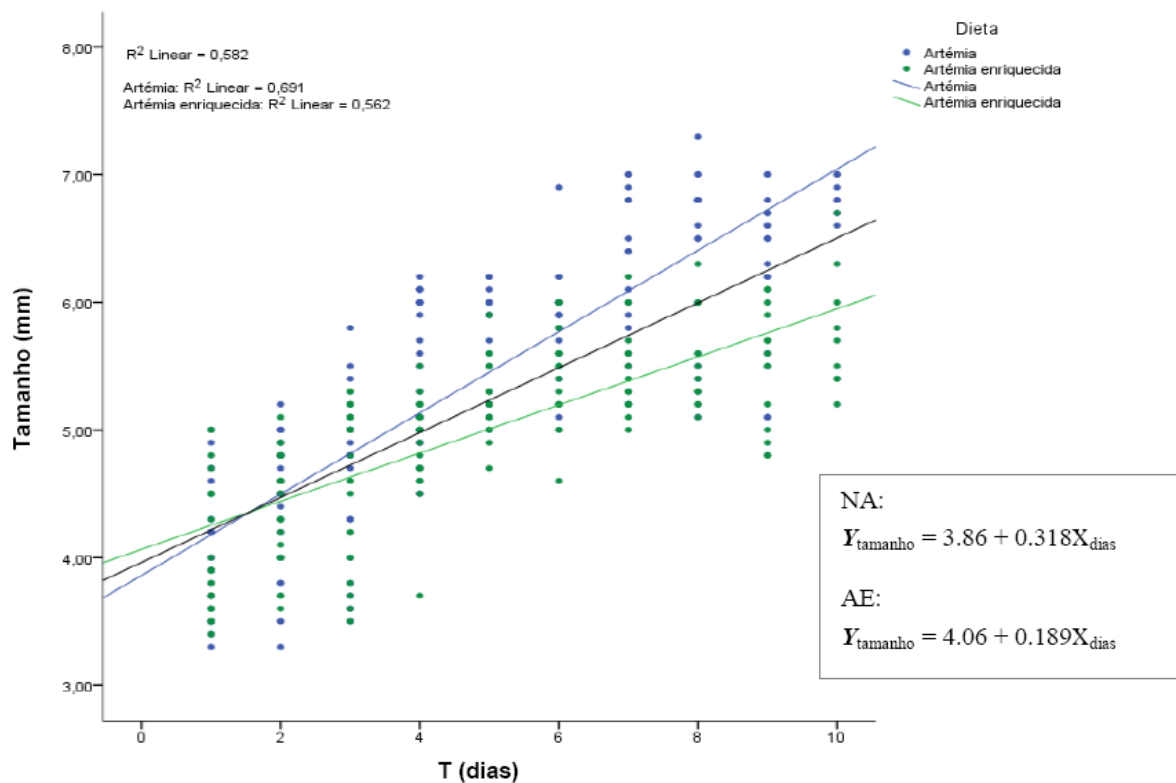


Figura 3.7 - Análise da relação linear entre o tamanho do cefalotórax e o tempo de cultivo de larvas de *Homarus gammarus*, alimentadas com as dietas, Náuplios de *Artemia* (NA) e *Artemia* enriquecida (AE). Declive da recta de crescimento para a dieta NA: $d_{NA}=0,318$ ($r_{\text{pearson}}=0,83$) e declive da recta de crescimento para a dieta AE: $d_{AE}=0,189$ ($r_{\text{pearson}}=0,75$).

3.3. Incremento no Crescimento

No t-test realizado para comparar os incrementos testaram-se as diferenças no início e no dia dez, verificando-se que não existem diferenças estatisticamente significativas para o dia zero, enquanto para o dia dez, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Foram assim verificados valores médios de incrementos finais para as dietas de náuplios recém eclodidos de *Artemia* e de *Artemia* enriquecida de 2,65mm e de 1,596mm, respectivamente (Figura 3.8). Confirma-se assim que a dieta de náuplios de *Artemia* possibilitou um maior crescimento das larvas de *Homarus gammarus* durante o período em estudo.

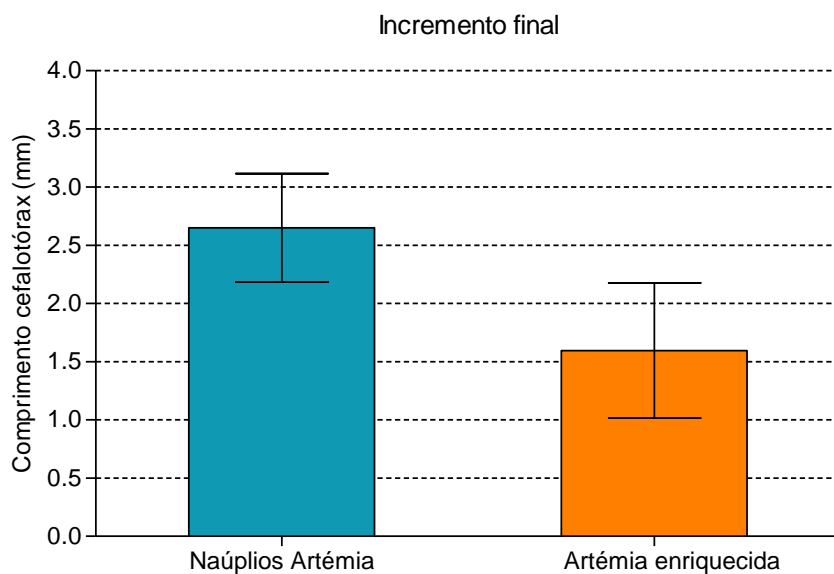


Figura 3.8- Efeito das duas dietas, náuplios de *Artemia* e *Artemia* enriquecida, no incremento de crescimento (em mm) no final do ensaio. As colunas representam o incremento final das larvas. As linhas verticais representam a média \pm desvio-padrão (SD)

4. Discussão

4.1. Mortalidade larvar diária e Taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevivência larvar obtida no final deste ensaio, ou seja ao 10^o dia, de 6% para a dieta náuplios de *Artemia* e de 5% para dieta *Artemia* enriquecida, é inferior à verificada em ensaios de outros autores. No seu trabalho Contarini et al. (2008), verificaram uma taxa de sobrevivência média para a fase larvar de 32,69 %. No entanto, esta taxa foi de 77,86% para os cultivos realizados a baixas densidades. Segundo Evjemo et al. (2008), a densidade de larvas no cultivo (22-2 larvas/L) influencia fortemente a taxa de sobrevivência (35 – 83%). Uglem et al. (2006), obtiveram também em cultivos até ao estágio IV, com dietas de cistos e náuplios de *Artemia* e microalga *Isochrysis galbana*, taxas de sobrevivência que variaram entre 2,8 e 93% (média 29,5%). Com o objectivo de que a densidade de cultivo não fosse influenciar na análise do efeito das dietas, optou-se por utilizar neste trabalho uma densidade baixa, de 5 larvas/litro. Além disso, em ambas as dietas optou-se por um fornecimento diário de um elevado número de indivíduos de *Artemia*/larva, pois a sobrealimentação pode reduzir o canibalismo (Evjemo et al. 2008) e um baixo número de náuplios de *Artemia* disponível por larva pode limitar o crescimento (Tong et al., 1997). Efectivamente para as baixas taxas de sobrevivência verificadas no presente estudo pode ter influído o facto de as larvas estarem inevitavelmente sujeitas a um nível elevado de stress devido à manipulação para medição do cefalotórax, pois durante o procedimento de medição, foram retiradas do tanque, colocadas na lupa para medição e novamente colocadas no tanque. Outro aspecto técnico que pode ter influenciado negativamente a sobrevivência das larvas neste estudo, foi o facto de que no sistema de recirculação utilizado, a entrada de água nos tanques se fazer na parte superior do tanque e não no fundo (em upstream / Kreisel) como em outros estudos (Kristiansen et al., 2004; Browne, et al., 2009)). Verificase que uma acumulação de larvas na parte inferior do tanque conduz a um aumento das perdas por canibalismo. Assim, um sistema com a entrada de água no fundo promoveria uma melhor suspensão das larvas e do alimento vivo no meio de cultivo, reduzindo a mortalidade.

A mortalidade verificada durante o período larvar, foi principalmente devido a canibalismo (larvas não encontradas ou encontrados apenas fragmentos). Quanto aos

valores da mortalidade diária quando se compara o efeito das dietas introduzindo o factor tempo, verificou-se que as dietas não afectam os valores de mortalidade, no entanto o factor tempo teve influência neste acontecimento, com a mortalidade diária a ter um valor mais elevado na fase final do estudo. Uglem et al. (2006) verificaram que a taxa de sobrevivência das larvas em alguns lotes era muito elevada até ao estágio III. Contudo, normalmente a mortalidade aumentava de forma abrupta imediatamente antes do estágio III (zoea III) sofrer metamorfose para o estágio IV. Estes autores sugerem que este aumento de mortalidade poderia decorrer de infecções com *Vibrio*.

4.2. Crescimento larvar e Incremento

As larvas de Lavagante dos estádios I a III possuem idênticos requisitos energéticos, com os lípidos a assumirem um papel importante como substrato energético. Para que se obtenha um bom crescimento, torna-se fundamental que as larvas recebam um alimento rico em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e com quantidades adequadas de ácidos gordos essenciais (Browne et al., 2009; Capuzzo, 1989) A *Artemia* é um alimento muito importante para os primeiros estádios de desenvolvimento (Evjemo et al., 2008; Fiore e Tlusty, 2005). O seu conteúdo em HUFA (DHA e EPA) é importante na sobrevivência e provavelmente também no crescimento. A opção por *Artemia* viva, prende-se com o facto de que as larvas de *Homarus* apresentam melhores crescimentos e taxas de sobrevivência, além de melhor desempenho como pós larvas no assentamento quando alimentadas com artémia viva (náuplios e adultos) do que com alimentos inertes (Thériault e Pernet, 2007). Os náuplios recém eclodidos de *Artemia salina* possuem um padrão em ácidos gordos de zooplâncton herbívoro, com elevadas concentrações de 18:2 (n-6), 18:3 (n-3) e 20:5 (n-3) (EPA) e uma quase ausência de 22:6 (n-3) (DHA). A microalga *Isochrysis galbana* apresenta uma predominância dos ácidos gordos 22:6 (n-3) e 18:4 (n-3) e pequenas quantidades de 20:5 (n-3) (Zhukova et al., 1998). Contudo, a *Artemia* sofre alterações significativas na sua composição bioquímica durante o seu desenvolvimento. Verifica-se que náuplios recém eclodidos (Instar I) mantidos sem enriquecimento, sofrem para a fase de Instar II e III uma redução do peso seco em 20% e do valor calórico em 27% (Benijts et al., 1975). A redução da composição em lípidos (em % de peso seco) da fase de náuplio para a fase de metanáuplio está associada à depleção das reservas vitelinas. Apesar de o ratio n-3:n-6 manter-se constante ao longo dos estádios, em termos absolutos, os ácidos gordos seguem a

tendência dos lípidos totais, reduzindo do estágio de náuplio para metanáuplio (Navarro et al., 1991). Quando se realiza enriquecimento, a *Artemia* tem capacidade de incorporar e concentrar de uma forma selectiva alguns dos lípidos da dieta. Assim, a composição em ácidos gordos varia com a da dieta, sobretudo a proporção de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) n-3. Em meio de enriquecimento com *Isochrysis galbana*, a *Artemia* revela uma alteração na composição em 20:5 (n-3) o que sugere alguma capacidade de alongação e desaturação de PUFA's C18 (abundantes na microalga) em 20:5 (n-3). Mas não se observa aumento na composição da *Artemia* em 22:6 (n-3) devido à dieta (Zhukova et al., 1998).

Estudos realizados em cultivo larvar de outros crustáceos decápodes, mostram alguma variação na resposta ao enriquecimento. Larvas de Lagosta *Panulirus homarus* alimentadas com náuplios de *Artemia* enriquecida com microalgas, como a *Chlorella vulgaris*, apresentaram índices de crescimento e taxas de sobrevivência mais elevadas do que larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* sem enriquecimento (Leema et al., 2010). Também no trabalho de Chakraborty et al. (2010), se verificou um efeito positivo, no crescimento e no conteúdo em ácidos gordos essenciais das larvas de *Panulirus homarus*, com a utilização da microalga *Nannochloropsis salina* no cultivo larvar. Pelo contrário, a adição das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*, isoladamente ou em conjunto ao meio de cultivo não produziu nenhum efeito no crescimento e taxa de sobrevivência de larvas do caranguejo *Scylla serrata* (Mann et al., 2001). Também Johns et al. (1981), observaram que o enriquecimento de náuplios de *Artemia* durante 24h com *Isochrysis galbana*, não influenciou positivamente a sobrevivência de larvas do caranguejo *Rhithropanopeus harrisi*.

Neste estudo, quando avaliado os tamanhos médios das larvas de *Homarus gammarus*, no dia um não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. No entanto, ao 10º dia pós eclosão, as larvas com a dieta de náuplios de *Artemia* apresentaram um crescimento maior do que as larvas alimentadas com a dieta de *Artemia* enriquecida durante 24 h com *Isochrysis galbana*. Este resultado sugere que os náuplios de *Artemia* recém eclodidos são, em termos nutricionais, mais adequados para suprir as necessidades das larvas de *Homarus gammarus* em crescimento, do que náuplios enriquecidos durante 24h com a microalga utilizada. Contudo, as condições de cultivo das microalgas e a fase de crescimento em que são utilizadas para

enriquecimento afectam a sua composição em lípidos e ácidos gordos (Browne et al., 2009). Também poderá ter tido influenciado no resultado obtido, o facto de termos fornecido apenas uma vez ao dia *Artemia* enriquecida, em vez de se ter utilizado a técnica da água verde (green water) com adição da microalga ao meio o que possibilitaria manter um enriquecimento da *Artemia* mais consistente.

5. Conclusão

Nas condições de realização deste trabalho experimental foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas no crescimento proporcionado pelas duas dietas. Assim, as larvas de *Homarus gammarus* alimentadas com náuplios recém eclodidos de *Artemia* exibiram um crescimento superior ao das larvas alimentadas com *Artemia* mantida durante 24 h num meio com *Isochrysis galbana* para enriquecimento. O desenvolvimento depende muito das reservas energéticas, principalmente dos triglicéridos. A diminuição do conteúdo de triglicéridos em *Artemia* da fase de náuplios recém eclodidos para metanaúplios com enriquecimento, evidencia a depleção das reservas vitelinas (Zhukova et al., 1998). Por conseguinte e com base nos resultados do presente estudo, poderá ser mais vantajoso fornecer às larvas de *Homarus gammarus* nas fases iniciais do seu desenvolvimento, náuplios de *Artemia* recém eclodidos, do que promover o seu enriquecimento. Diversos autores referem que os camarões podem requerer algumas combinações de ácidos gordos (n-3 e n-6) na sua dieta de forma a otimizar o seu crescimento. Este aspecto foi evidenciado para *Fenneropenaeus chinensis* e *F. indicus* alimentados com os ácidos linoleico e linolénico (contendo 0,5% de cada na dieta), para *P. monodon* definiu-se um rácio óptimo de 2:3 de ácido linoleico e linolénico (González-Felix e Perez-Velazquez, 2002). A opção pelo enriquecimento da *Artemia* como forma de alterar o seu perfil em ácidos gordos e valor nutricional, para ir ao encontro dos requisitos nutricionais das larvas em cultivo, deve sempre considerar as características da espécie de microalga ou uma mistura de microalgas com perfis complementares, tal como considerar a fase de crescimento em que cada microalga se encontra.

No que diz respeito à mortalidade diária e à taxa de sobrevivência, apesar da resposta obtida no crescimento larvar, o efeito das dietas não apresentou diferenças significativas. Contudo, verificou-se que factores que geram situações de stress às larvas, como a manipulação para medição ou contagem, podem influenciar negativamente a taxa de sobrevivência larvar. Provavelmente, também terá contribuído para a baixa taxa de sobrevivência observada, o facto de a entrada de água no tanque se fazer pela parte superior e não pelo fundo. No entanto, importa referir que se tentou-se compensar este aspecto com arejamento de fundo. Este visou, além de promover uma maior oxigenação da água, reduzir a deposição de larvas na parte inferior do tanque. Esta acumulação

ocasiona o aumento do contacto entre larvas e conseqüentemente eleva as perdas por canibalismo.

5.1.Perspectivas Futuras

A pesquisa da dieta com o valor nutricional mais ajustado aos requisitos das larvas, que lhes permita expressar os melhores índices de crescimento e de sobrevivência, continuará a gerar mais trabalhos. Surgem, recentemente, outras hipóteses de enriquecimento da *Artemia* com a utilização de prebióticos e de probióticos. Foram já observados efeitos positivos no crescimento e no índice de conversão alimentar de larvas de lavagante europeu, utilizando no enriquecimento dos naúplios de *Artemia* um probiótico (*Bacillus* spp) e Mananoligossacarídeos (MOS) (Daniels et al., 2010). Além disso, apesar da frequente utilização da *Artemia* como alimento base no cultivo larvar do lavagante europeu, algumas espécies de copépodes marinhos poderão constituir uma alternativa interessante devido à sua composição bioquímica. Verifica-se um elevado potencial na utilização destes organismos como alimento vivo para cultivo larvar. Algumas espécies como *Temora longicornis*, a *Acartia* sp. ou a *Eurytemora* sp. apresentam um conteúdo proteico significativamente mais elevado que a *Artemia*, além de um elevado conteúdo em HUFA n-3 (Evjemo et al.,2003). Provavelmente, no futuro além dos parâmetros geralmente analisados, irá ser dada maior ênfase a outros como o índice de conversão alimentar, a carga bacteriana no meio e a susceptibilidade a patologias.

6. Bibliografia

- Agnalt, A.-L., Van der Meeren, G.I., Jørstad, K.E., Næss, H., Farestveit, E., Nøstvold, E., Svåsand, T., Korsøen, E., Ydstebø, L., 1999. Stock enhancement of European lobster (*Homarus gammarus*): a large-scale experiment off south-western Norway (Kvitsøy). In: Howell, B., Moksness, E., Svåsand, T. (Eds.), *Stock Enhancement and Sea Ranching*. Fishing News Books. Blackwell Science Oxford, UK, pp. 401–419.
- Agnalt, A.-L., Kristiansen T. S., and Jorstad K. E., 2007. Growth, reproductive cycle, and movement of berried European lobsters (*Homarus gammarus*) in a local stock off southwestern Norway. *ICES Journal of Marine Science*, 64: 288–297.
- Aiken, D.E., Waddy, S.L., 1980. Reproductive Biology. In: J.S. Cobb and B.F. Phillips (eds.) *The Biology and Management of Lobster*. Academic Press. Inc., New York, NY, USA, pp 215-276.
- Aiken, D.E., Waddy, S.L., 1995. Aquaculture. In: Factor, J.R. (Ed.), *Biology of the Lobster Homarus americanus*. Academic Press, pp. 153–175.
- Arnold, K.E., Findlay, H.S., Spicer, J.I., Daniels, C.L., Boothroyd D., 2009. Effect of CO₂-related acidification on aspects of the larval development of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). *Biogeosciences Discussions*, 6, 3087–3107.
- Beal, B.F.; Mercer, J.P.; O’Conghaile, A. 2002. Survival and growth of Hatchery-reared individuals of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.), in field-based nursery cages on the Irish west coast. *Aquaculture* 210. 137–157
- Beard, T., Wickins, J., 1992. Techniques for the production of juvenile lobsters (*Homarus gammarus* (L.)). Fisheries Research Technical Report. n° 92. Lowestoft: 22
- Bell, J.D., Rothlisberg, P.C., Munro, J.L., Loneragan, N.R., Nash, W.J., Ward, R.D., Andrew, N.L. 2005. *Advances in Marine Biology - Restocking and Stock Enhancement of Marine Invertebrate Fisheries*
- Benavente, G. P., Uglem, I., Browne, R., Balsa, C. M., 2010. Culture of juvenile European lobster (*Homarus gammarus* L.) in submerged cages. *Aquac Int* 18:1177–1189
- Benijts, F., Van Voorden, E., Sorgeloos, P., 1975. Changes in the biochemical composition of the early life stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L. In Persoone, G. & Jaspers, E. (Eds.) 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend, Belgium. Sept. 17-23. Vol. 1: 1-9.
- Boudreau, B., E. Bourget, and Y. Simard. 1990. Benthic invertebrate larval response to substrate characteristics at settlement: Shelter preference of the American lobster, *Homarus americanus*. *Mar. Biol.* 106:191–198.
- Browne, R., Mercer, J. P. and Duncan, M. J. (2001). A historical overview of the Republic of Ireland’s lobster (*Homarus gammarus* L.) fishery, with reference to European and North American (*Homarus americanus* Milne-Edwards) landings. *Hydrobiologia* 465, 49–62.

Browne, R.; Benavente, G. P.; Uglem, I.; Balsa, J. C. M., 2009. An illustrated hatchery guide for the production of clawed lobsters.(Using a green water technique). *Aquaculture Explained* 23

Burton, C. A., 1992. Techniques of lobster stock enhancement. Sea Fish Ind. Authority, Mar.Farm. Unit, Ardtoe, Scotl., 36 p.

Capuzzo, J.M., 1989. Comparative physiology and biochemistry of larval lobsters. *The Lobster Newsletter*, Vol. 2, N° 1 pp 3

Castro, K. M., Cobb, J. S., 2005. Behaviour of hatchery-reared and wild-caught 4th and 5th stage American lobsters, *Homarus americanus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. 39: 963–972

Chakraborty, K., Chakraborty, R. D., Radhakrishnan, V., Vijayan, K. K., 2010. Fatty acid profiles of spiny lobster (*Panulirus homarus*) phyllosoma fed enriched *Artemia*. *Aquaculture Research*. Vol 41, 393–403

Cobb, J. S., Wang, D., Campbell, D. B., 1989. Timing of settlement by postlarval lobsters (*Homarus americanus*): field and laboratory evidence. *J. Crust. Biol.*, 9(1): 60-66.

Contarini, G., Perrella, N., Hickey, J., Ballestrazzi, R. 2008. Hatchery production of European lobster (*Homarus gammarus*, L.): broodstock management and effects of different holding systems on larval survival. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 7, 351-362

Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R., Arnold, K.E. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota

Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura

http://www.dgpa.min-agricultura.pt/xportal/xmain?xpid=dgpa&xpgid=detPublicacao&detPublicacao_qry=boui=224736 (Pesquisado em 3 de Novembro de 2011)

Ennis, G.P. 1973. Endogenous rhythmicity associated with larval hatching in the lobster *Homarus gammarus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53, 531–8.

Ennis, G.P. 1975. Observations on hatching and larval release in the lobster, *Homarus americanus*. *J. Fish. Res. Board Can.* 32:2210–2213.

Evjemo, J.O., Reitan, K.I., Olsen, Y. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227 (1-4): 191-210

Evjemo, J.O., Gruven, K., Sigstadto, E., Johnsen, K., Andersen, M., Olsen, Y. 2008. Intensive production of lobster (*Homarus Gammarus*). www.aquaculture.ugent.be/larvi/larvi09/PDF/Thursday/Evjemo.pdf (pesquisado em 10 Setembro de 2011)

Ferguson A. 2002. Genetic diversity in the European lobster (*Homarus gammarus*): population structure and impacts of stock enhancement. <http://www.qub.ac.uk/bb/prodoh/GEL/gel.html>. (pesquisado em 15 Setembro de 2011)

Fiore, D. R., Tlustý, M. F. 2005. Use of commercial *Artemia* replacement diets in culturing larval American lobsters (*Homarus americanus*). *Aquaculture* 243 :291– 303

González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M. 2002. Current status of lipid nutrition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. In González-Ortegón, E., Cuesta, J., 2006. An illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 86, 93-102

Gruffydd, L., Rieser, R.A. & Machin, D., 1975. A comparison of growth and temperature tolerance in the larvae of the lobsters *Homarus gammarus* (L.) and *Homarus americanus* H. Milne Edwards (Decapoda, Nephropidae). *Crustaceana*, 28, 23–32.

Harding, G. C., Pringle, J.D., Vass, W. P., Pearre, Jr., S. , Smith, S. J. 1987. Vertical distribution and daily movements of larval lobsters, *Homarus americanus*, over Browns Bank, N.S. Mar. Ecol. Prog. Ser. 41:29–41.

James-Pirri, M.J., Cobb, J.S., Wahle, R.A., 1998. Influence of settlement time and size on postsettlement growth in the American lobster (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55, 2436–46

Johns, D.M., W.J. Berry, McLean, S., 1981. International study on *Artemia*: XXI. Investigations into why some strains of *Artemia* are better food sources than others. Further nutritional work with larvae of the mud crab, *Rhithropanopeus harrisi*. *Journal of World Mariculture Society* 12(1):303-314.

Jørstad, K. E.; Agnalt, A.-L.; Kristiansen, T. S.; Nøstvold, E., 2001. High survival and growth of European lobster juveniles (*Homarus gammarus*), reared communally with natural bottom substrate. *Marine and Freshwater Research* 52: 1431–1438.

Jørstad, K. E.; Farestveit, E.; Kelly, E.; Triantaphyllidis, C. 2005. Allozyme variation in European lobster (*Homarus gammarus*) throughout its distribution range. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. 39: 515–526

Juinio, M. A. R., Cobb, J. S. 1992. Natural diet and feeding habits of the postlarval lobster *Homarus americanus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 85:83–91

Leema, J. T. M., Vijayakumaran, M., Kirubakaran, R., Jayaraj, K. 2010. Effects of *Artemia* enrichment with microalgae on the survival and growth of *Panulirus homarus* phyllosoma larvae. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 52 (2) : 208 - 214

Linnane, A., Mazzoni, D., Mercer J.P., 2000. A long-term mesocosm study on the settlement and survival of juvenile European lobster *Homarus gammarus* L. in four natural substrata. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249: 51–64

Linnane, A., Ball, B., Mercer, J.P., Browne, R., van der Meeren, G., Ringvold, H, Bannister, C., Mazzoni, D., Munday, B., 2001. Searching for the early benthic phase (EBP) of the European lobster: a trans-European study of cobble fauna. *Hydrobiologia* 465: 63–72.

Kristiansen, T., Drengstig, A., Bergheim, A., Drengstig, T., Kollsgård, I., Svendsen, R.,

Nøstvold, E., Farestveit, E., Aardal, L., 2004. Development of methods for intensive farming of European lobster in recirculated seawater. Results from experiments conducted at Kvitsøy lobster hatchery from 2000 to 2004. *Fisken og havet*, num 6

Mann, D.L., Asakawa, T., Pizzutto, M., Keenan, C.P., Brock, I.J., 2001. Investigation of an *Artemia*-based Diet for Larvae of the Mud Crab *Scylla serrata*. *Asian Fisheries Science* 14: 175-184

Mantiri, D.M.H., Négre-Sadargues, G., Charmantier, G., Trilles, J.P., Milicua J. G., Castillo R., 1996. Nature and Metabolism of Carotenoid Pigments during the embryogenesis of the European Lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 115A. No. 3. pp. 237-241

Mercer, J. P.; Browne, R.; Duncan, M. J., 1998. Research leads to more effective management of lobster stocks, *Homarus gammarus*. *Aquaculture Ireland* 81: 38.

Navarro, J.C., Amat, E., Sargent, J.R. 1991. A study of the variations in lipid levels, lipid class composition and fatty acid composition in the first stages of *Artemia* sp.. *Marine Biology* 111,461-465

National Lobster Hatchery

<http://www.nationallobsterhatchery.co.uk/conservation/hatchery.htm> (pesquisado em 10 Setembro de 2011)

Neil, D.M., MacMillan, D.L., Robertson, R.M., Laverack, M.S. 1976. The structure and function of thoracic exopodites in the larvae of the lobster *Homarus gammarus* (L.). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 274, 53-68

Nicosia, F., Lavalli, K., 1999. Homarid lobster hatcheries: their history and role in research, management, and aquaculture. *Mar. Fish. Rev.* 61, 1–57.

Øresland, V. 2007. Description of the IMR Standard Light Trap and the Vertical Distribution of Some Decapod Larvae (*Homarus* and *Nephrops*). *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* Vol. 6, No. 2, pp. 225–231

Pandian, T.J., 1970. Ecophysiological studies on the developing eggs and embryos of the European lobster *Homarus gammarus*. *Marine Biology* 5: 154-167

Phillips, B. F. 2006. *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*. Blackwell Publishing Ltd

Rosa, R., Calado, R., Andrade, A.M., Narciso, L., Nunes, M.L. 2005. Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 140: 241–249

Schmalenbach, I., Buchholz, F., Franke, H-D, Saborowski, R., 2009. Improvement of rearing conditions for juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) by co-culturing with juvenile isopods (*Idotea emarginata*). *Aquaculture* 289: 297–303

Schmalenbach, I., Buchholz, F., 2010. Vertical positioning and swimming performance of lobster larvae (*Homarus gammarus*) in an artificial water column at Helgoland, North Sea. *Marine Biology Research*, 6: 89-99

Schmalenbach, I; Franke, H-D 2010. Potential impact of climate warming on the recruitment of an economically and ecologically important species, the European lobster (*Homarus gammarus*) at Helgoland, North Sea. *Mar Biol*, 157:1127–1135

Schmalenbach, I., Mehrtens, F., Janke, M., Buchholz, F. 2011. A mark-recapture study of hatchery-reared juvenile European lobsters, *Homarus gammarus*, released at the rocky island of Helgoland (German Bight, North Sea) from 2000 to 2009. *Fisheries Research* 108: 22–30

Scovacricchi, T. 1999. Preliminary studies on stocking depleted populations of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda, Nephropsidae), onto the natural beachrock outcrops in the northern Adriatic Sea. In “Stock Enhancement and Sea Ranching” (B. R. Howell, E. Moksness and T. Svasand, eds), pp. 393–400. Fishing News Books, Blackwell, Oxford.

Thériault, I., Pernet, F., 2007. Lipid nutrition and settlement behaviour in American lobster *Homarus americanus*. *Aquat Biol*. Vol. 1: 121–133

Tong, L. J. Moss, G. A., Paewai M. M., Pickering T. D. 1997. Effect of brine-shrimp numbers on growth and survival of early-stage phyllosoma larvae of the rock lobster *Jasus edwardsii*. *Marine and Freshwater Research* 48(8) 935 - 940

Tully, O., Roantree, V. e Robinson, M. 2001. Maturity, fecundity and reproductive potential of the European lobster (*Homarus gammarus*) in Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81, 61–68.

Uglem, I., Uksnoy L.E., Bergh, O. 1996. Chemical treatment of lobster eggs against epibiotic bacteria. *Aquaculture International* 4, 1-8

Uglem, I.; Benavente, G.P.; Browne, R. 2006. A regional development strategy for stock enhancement of clawed lobsters (*Homarus gammarus*) – Development of juvenile lobster production methodologies. Norwegian Institute for Nature Research (NINA) Report 211

Van der Meeren, G. 1991. Out-of-water transportation effects on behavior in newly released juvenile Atlantic lobsters *Homarus gammarus*. *Aquacultural Engineering* 10, 55–64.

Van Olst, J.C., Carlberg J.M.e Hughes J.T., 1980. Chapter 10: Aquaculture. pp. 333-384 in: Cobb, J.S. & B.F. Phillips (eds.). *The biology and management of lobsters*. Vol II. Ecology and management. Academic Press, Inc.,

Waddy, S.L., Aiken, D. E. 1991. Egg production in the American lobster, *Homarus americanus*. In A. Wenner, and A. Kuris (Editors), *Crustacean issues*, vol. 7, Crustacean egg production, p. 267–290. A. A. Balkema, Amst.

Waddy, S.L., Aiken, D.E., 1999. Timing of the metamorphic molt of the American lobster (*Homarus americanus*) governed by a population-based photoperiodically entrained daily rhythm. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 2324–30.

Wickins, J.F., Lee, D. O’C., 2002. *Crustacean Farming – Ranching and Culture*. Blackwell Science. 446 pp.

Zhukova, N. V., Imbs, A. B., Yi, L. F. 1998. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 120: 499–506

7. Anexo

Protocolo de descapsulação de *Artemia* sp. (Laboratório de Aquacultura Ornamental da ESTM-IPL)

1 - Coloque 1,8g de cistos de *Artemia* em 1500ml de água doce (numa garrafa de eclosão) com arejamento de fundo. Deixar 1 hora.

Observar quando os cistos estão hidratados, o que se verifica quando adquirem uma forma arredondada, antes de passar ao passo seguinte.

2 - Filtrar por um filtro de 125m

3 - Fazer 500 ml de uma solução de descapsulante, lixívia comercial e água salgada (50:50)

4- Coloque os cistos numa garrafa de eclosão e junte a solução descapsulante. Coloque arejamento forte (5-10 min).

Observe a mudança de cor dos cistos, que passam de cor acastanhada a alaranjada, indicando que a descapsulação se iniciou.

A descapsulação está pronta quando ao parar o arejamento se verificar que os cistos se depositam, indicando que o córion já foi destruído (ver justificação para este facto na estrutura da composição do córion dos cistos).

6 - Filtre os cistos por uma rede de 125m e lave em água corrente até que o cheiro a lixívia desaparecer.

7 - Junte os cistos a 250 ml de água doce e junte 5 ml de uma solução de tiosulfato de sódio (5%), a fim de neutralizar os eventuais resíduos de hipoclorito de sódio que possam existir. Agite vigorosamente (3-5 min).

8 - Filtre novamente pela rede e lave.

10 - Os cistos assim descapsulados podem ser guardados em frigorífico para utilização posterior (2 a 3 dias) ou postos a incubar directamente.

11 - Incubação de *Artemia* sp.