

**Acondicionamento e Valorização
de duas espécies de Pepino do mar:
Holothuria forskali (Delle Chiaje, 1823)
e *Stichopus regalis* (Cuvier, 1817)**

Ana Filipa Pinheiro dos Santos



**Acondicionamento e Valorização
de duas espécies de Pepino do mar:
Holothuria forskali (Delle Chiaje, 1823)
e *Stichopus regalis* (Cuvier, 1817)**

Ana Filipa Pinheiro dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora
Ana Margarida Violante Pombo e co-orientação da Professora Especialista
Teresa Maria Coelho Baptista

2017

Título: Acondicionamento e Valorização de duas espécies de Pepino do mar:
Holothuria forskali (Delle Chiaje, 1823) e *Stichopus regalis* (Cuvier, 1817)

Copyright © Ana Filipa Pinheiro dos Santos

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2017

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

Agradecimentos

Este trabalho decorreu no âmbito do projeto “Pepinos do Mar: Valorização Económica das Rejeições” financiado pelo Fundo Europeu das Pescas, programa PROMAR (GacOeste), (nº 31-04-01-FEP-188).

A dissertação de mestrado aqui apresentada não teria sido possível sem o apoio e dedicação de um conjunto de pessoas a quem devo o meu sincero agradecimento:

Agradeço em primeiro lugar, à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Pombo, pelo apoio académico e profissional durante todo o meu percurso, mostrando-se disponível com a sua ajuda e pela preocupação e incentivo em momentos fulcrais;

À co-orientadora Professora Especialista Teresa Baptista, pela sua colaboração, valiosas sugestões e enriquecimento de conhecimentos no desenvolvimento do meu trabalho, sendo a sua presença essencial para a realização deste estudo;

À tripulação da embarcação “Veneza” por toda a ajuda e cuidado prestados na recolha de organismos a bordo;

À Daniela Pratas, à Cristiana Gastão, à Rita Santos e ao Luís Assunção pela Amizade, disponibilidade e incentivo incondicionais durante o projeto e a fase de escrita da tese;

A todos meus amigos, pela motivação, compreensão e estímulo durante este trabalho e conclusão do mesmo;

Os meus agradecimentos mais ternos à minha Mãe, ao meu Pai e ao meu Irmão por toda a ajuda e paciência que revelaram ao longo de todo o meu percurso académico, fazendo-me acreditar que seria capaz de concretizar e alcançar os meus objetivos, por todo o esforço e apoio financeiro prestado, sem os quais não teria sido possível a realização desta etapa, contribuindo de forma inquestionável para a sua realização;

Por último, quero agradecer à Iris, que me deu um apoio incondicional e sempre presente.

A Todos, o meu Muito Obrigada!

Resumo

Os Pepinos do mar, ou holotúrias, incluídos no grupo dos equinodermes, caracterizam-se pelos seus movimentos lentos e alimentação detritívora. Estes invertebrados de ampla distribuição geográfica, são apreciados como uma espécie de fruto do mar e considerados uma iguaria, sendo utilizados há vários séculos, quer na medicina tradicional, quer como afrodisíacos, no continente asiático. A riqueza nutricional deste recurso marinho é ímpar, pelo que várias espécies são comercialmente exploradas, sendo a maioria delas espécies tropicais e subtropicais das famílias Holothuriidae e Stichopodidae. A costa atlântica portuguesa é habitat natural das espécies *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis*, alvo de rejeições de pesca, e até agora não introduzidas no mercado. O presente estudo teve como principais objetivos a otimização das condições de transporte e acondicionamento em cativeiro das duas espécies descritas, tendo em vista o seu cultivo em aquacultura e o apuramento da sua viabilidade económica, quantificando o teor proteico do músculo, e a sua aceitação global, em termos de consumo. Os pepinos do mar *H. forskali* e *S. regalis* revelaram grande adaptabilidade às condições de transporte e cultivo, com 100% de sobrevivência no decorrer do acondicionamento em tanques, e um incremento do teor proteico presente no músculo de ambas as espécies, comparando indivíduos pré e pós-acondicionamento, sendo para *H. forskali* $9,1\% \pm 1,1$ e $12,8\% \pm 1,6$, e para *S. regalis* de $12,3\% \pm 1,3$ e $12,6\% \pm 2,5$, respetivamente. A aceitação global foi positiva, tendo 95% dos inquiridos revelado satisfação após a prova.

Sendo a aquacultura de pepino do mar uma atividade quase inexplorada em regiões temperadas e inexistente em Portugal, serão necessários mais estudos baseados no ciclo de vida, dinâmica populacional e distribuição de espécies endémicas, no sentido de melhor entender o potencial da sua introdução na aquacultura e no mercado de consumo ocidental.

Palavras-chave: *H. forskali*, *S. regalis*, valorização económica, aquacultura, transporte, acondicionamento.

Abstract

Sea cucumbers, or holothurians, belonging to the echinoderms' group, are characterized by their slow movements and detritus feeding status. These invertebrates of wide geographical distribution, are considered a seafood and a delicacy, and have been used for several centuries, both in traditional medicine and as aphrodisiacs, in Asia. The nutritional value of this marine resource is unique, for this reason, several species are commercially exploited, most of which being tropical and subtropical species of the families Holothuriidae and Stichopodidae. The Portuguese Atlantic coast is the natural habitat of the species *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*, one of the *bycatch*, and so far, not introduced into the consumer market. The present study had as main objectives the assessment and optimization of transport and captive conditioning for these two species, in view of its aquaculture production, and the determination of its economic viability, quantifying the protein content present on their muscle, and the acceptance in terms of consumption. Thus, *H. forskali* and *S. regalis* showed great adaptability to transport and conditioning, with 100% survival over the study time, and an increase in the protein content present in the muscle, comparing pre and post-conditioning of both species: *H. forskali* $9.1\% \pm 1.1$ and $12.8\% \pm 1.6$, and *S. regalis* $12.3\% \pm 1.3$ and $12.6\% \pm 2.5$, respectively. The overall acceptance was positive, in which 95% of the tasters showed satisfactory judgment after the taste trial.

Sea cucumber aquaculture is an almost unexplored activity in temperate regions and non-existent in Portugal. Therefore, further studies based on the life cycle, population dynamics and distribution of sea cucumber endemic species will be necessary in order to better understand the potential of its introduction into aquaculture and in the Western European consumer market.

Keywords: *H. forskali*, *S. regalis*, economic assessment, aquaculture, transport, conditioning.

Índice de matérias

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1 Sobre-exploração e Aquacultura de Pepinos do mar.....	2
1.2 Biologia das espécies.....	5
1.2.1 <i>Holothuria forskali</i>	8
1.2.2 <i>Stichopus regalis</i>	9
1.3 Objetivos	10
2. Materiais e Métodos	13
2.1 Ensaio de transporte	13
2.1.1 Transporte de <i>H. forskali</i>	13
2.1.2 Transporte de <i>S. regalis</i>	14
2.2 Ensaio de Acondicionamento	15
2.2.1 Acondicionamento de <i>H. forskali</i>	15
2.2.2 Acondicionamento de <i>S. regalis</i>	16
2.2.3 Alimentação	17
2.3 Análise do teor proteico.....	17
2.4 Análise histológica.....	19
2.5 Análise sensorial	19
2.6 Análise Estatística	21
3. Resultados	23
3.1 Ensaio de transporte	23
3.1.1 Transporte de <i>H. forskali</i>	23
3.1.2 Transporte de <i>S. regalis</i>	24
3.2 Ensaio de acondicionamento.....	25
3.2.1 Acondicionamento de <i>H. forskali</i>	25
3.2.2 Acondicionamento de <i>S. regalis</i>	26
3.3 Análise do teor proteico.....	27
3.3.1 <i>H. forskali</i>	27
3.3.2 <i>S. regalis</i>	28
3.4 Análise Histológica.....	29
3.4.1 <i>H. forskali</i>	29
3.4.2 <i>S. regalis</i>	32

3.5 Análise sensorial	34
4. Discussão.....	37
5. Conclusão	43
6. Perspetivas Futuras.....	45
7. Referências Bibliográficas	47
8. Anexos.....	53
Anexo I.....	53
Anexo II.....	55
Anexo III.....	56
Anexo IV	57
Anexo V	59

Índice de Figuras

Figura 1.1 Anatomia interna de uma holotúria (Adaptado de Purcell, et al., 2012b).	6
Figura 1.2 Exemplar de <i>H. forskali</i> após amostragem para o presente estudo.....	8
Figura 1.3 Exemplar de <i>S. regalis</i> , após amostragem para o presente estudo.....	9
Figura 2.1 Península de Peniche, Portugal Continental. A zona delimitada corresponde à área geográfica onde foram realizadas as amostragens.....	13
Figura 2.2 Desenho experimental relativo ao ensaio de transporte de <i>H. forskali</i>	14
Figura 2.3 Tanque de acondicionamento de <i>H. forskali</i>	15
Figura 2.4 Tanque de acondicionamento de <i>S. regalis</i>	17
Figura 2.5 Indivíduo de <i>H. forskali</i> a) e <i>S. regalis</i> b), dissecados após o período de acondicionamento para recolha das bandas musculares (M).....	18
Figura 2.6 Pratos confeccionados com <i>H. forskali</i> , no estado selvagem: a) Sushi; b) Risotto; c) Caldo; d) Salteado.	20
Figura 2.7 Pratos confeccionados com <i>S. regalis</i> , no estado selvagem: a) Ceviche; b) Massada; c) Canellones; d) Panado; e) Salteado; f) Braseado.	21
Figura 3.1 Representação gráfica relativa aos valores dos pesos (g) dos indivíduos de <i>H. forskali</i> , no início e no final do período de acondicionamento (média ± desvio-padrão). *Diferenças estatisticamente significativas.....	25
Figura 3.2 Representação gráfica relativa aos valores dos pesos dos indivíduos (g) de <i>S. regalis</i> , no início e no final do período de acondicionamento (média ± desvio-padrão). ...	26
Figura 3.3 Representação gráfica relativa à análise do teor proteico (%) das bandas musculares de indivíduos de <i>H. forskali</i> no estado selvagem e após período de acondicionamento. *Diferenças estatisticamente significativas.	27

Figura 3.4 Representação gráfica relativa à análise do teor proteico (%) das bandas musculares de indivíduos de *S. regalis* no estado selvagem e após período de condicionamento.....**28**

Figura 3.5 Bandas musculares de *H. forskali*, no estado selvagem - a), b), e após 6 meses de condicionamento - c), d). Observação de corte histológico transversal - a) e b) e longitudinal - c) e d), ao MOC, após coloração com H&E, com ampliação de: a), c) 100x; b), d) 200x. Observa-se a presença abundante de células musculares com núcleos diferenciados (CM), e do tecido conjuntivo a limitar as fibras musculares: perimísio (PM) e epimísio (EP).**29**

Figura 3.6 Bandas musculares de *H. forskali*, no estado selvagem - a), b), e após 6 meses de condicionamento - c), d). Observação de corte histológico ao MOC, após coloração com Vermelho Picro-sírius, e ampliação de: a), c) 100x; b), d) 200x. A coloração Vermelho Picro-sírius comprova a abundância do colagénio no tecido muscular, corado a vermelho, e difundindo-se entre as células musculares (CM) associado ao tecido conjuntivo: endomísio (EM), perimísio (PM) e epimísio (EP).**30**

Figura 3.7 Bandas musculares de *H. forskali*, no estado selvagem. Observação de corte histológico transversal ao MOC, após coloração com Vermelho Picro-sírius, ampliação de 200x e feixe de luz polarizada. Células musculares (CM). Tecido conjuntivo: endomísio (EM), perimísio (PM) e epimísio (EP).**31**

Figura 3.8 Bandas musculares de *S. regalis*, no estado selvagem. Observação de corte histológico longitudinal de uma banda muscular, ao MOC, após coloração com H&E: a) e b); Vermelho Picro-sírius: c) e d); Vermelho Picro-sírius com luz polarizada: e) e f). Ampliação de: a), c), e): 100x; b), d), f): 200x. São visíveis as células musculares, longitudinais, que formam o tecido muscular (TM), limitado por tecido conjuntivo: perimísio (EP).**32**

Figura 3.9 Bandas musculares de *S. regalis*, após 1 mês de condicionamento. Observação de corte histológico longitudinal de uma banda muscular, ao MOC, após coloração com H&E: a) e b); Vermelho Picro-sírius: c) e d); Vermelho Picro-sírius com luz polarizada: e) e f). Ampliação de: a), c), e): 100x; b), d), f): 200x. São visíveis as células musculares, longitudinais, constituindo o tecido muscular (TM), limitado por tecido conjuntivo: perimísio (EP).**33**

Figura 3.10 Representação gráfica relativa à aceitação global (%) das espécies *S. regalis* (n=20) e *H. forskali* (n=20) num painel de 22 provadores.**35**

Índice de Tabelas

Tabela I - Resumo dos métodos usados no ensaio de transporte realizado, no sentido de avaliar os seus efeitos na condição física dos indivíduos de *H. forskali*.....**23**

Tabela II - Resumo do método aplicado no ensaio de transporte realizado, no sentido de avaliar os seus efeitos na condição física dos indivíduos de *S. regalis*.....**24**

Tabela III - Valores relativos à apreciação das espécies *H. forskali* e *S. regalis*, após confeção, por parte do painel de provadores participantes, contemplando os diferentes atributos de avaliação aplicados no decorrer da análise sensorial, apresentados na forma média \pm desvio padrão (SD).....**34**

Lista de Abreviaturas

ESTM - Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

EUA - Estados Unidos da América

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

H&E - Hematoxilina-Eosina

NH₃ - Amónia

NH₄⁺ - Nitratos

NO₂⁻ - Nitritos

O₂ - Oxigénio dissolvido

RAS - Sistema aquícola de recirculação de água

T°C - Temperatura

1. Introdução

Nos últimos anos, o aumento exponencial da população humana tem levado, cada vez mais, à produção intensiva de recursos que satisfaçam as necessidades alimentares, da qual se destaca a produção de proteína, constituinte fundamental de uma alimentação saudável. Desta forma, assiste-se, cada vez mais, à sobre-exploração dos recursos disponíveis, com maior incidência nos *stocks* naturais de pescado. As pescas raramente têm sido "sustentáveis", pelo contrário, a pesca induziu a sobre-exploração em série, disfarçada por tecnologia aprimorada, expansão geográfica e depleção de espécies de níveis tróficos inferiores, anteriormente desprezadas (Pauly *et al.*, 2002).

Dado que o rendimento global da pesca é limitado pela produtividade dos ecossistemas e pela eficácia da sua gestão, o consumo de pescado *per capita* só pode ser mantido ou aumentado através do contributo crescente da aquacultura para o *stock* de pescado a nível global (Merino *et al.*, 2012). A aposta na Aquacultura é, cada vez mais, uma solução, produzindo proteína de qualidade e, simultaneamente, evitando a continua sobre-exploração dos recursos naturais. O consumo mundial de pescado *per capita* atingiu um novo recorde, de 20 kg em 2014, graças ao vigoroso crescimento da aquacultura, que agora fornece quase metade do pescado consumido a nível global, e a um ligeiro progresso no estado de determinadas populações devido à melhoria da gestão da pesca. Deste modo, o pescado continua a ser um dos produtos alimentares mais comercializados em todo o mundo, com mais de metade das exportações provenientes de países em desenvolvimento. Relatórios recentes de especialistas, organizações internacionais, representantes da indústria e da sociedade civil, destacam o enorme potencial dos oceanos e águas interiores, que contribuem significativamente para a segurança alimentar e nutrição adequadas de uma população global que deverá atingir 9,7 biliões até 2050 (FAO, 2016).

Em 2014, a produção de pescado em aquacultura totalizou 73,8 milhões de toneladas, das quais 49,8 milhões dizem respeito a peixes ósseos, 16,1 milhões a moluscos, 6,9 milhões a crustáceos, e 7,3 milhões a outros animais aquáticos. Quase todo o pescado produzido a partir de aquacultura é destinado ao consumo humano, embora os subprodutos possam ser utilizados para fins não alimentares. A produção aquícola mundial de pescado, em termos económicos, representou 44,1% da produção total de pescado em 2014, acima dos 42,1% em 2012, e dos 31,1% em 2004. No que diz respeito ao volume de produção global, em 2013, o cultivo de pescado e algas superou a pesca comercial,

embora em termos de abastecimento alimentar, a superação se tenha verificado pela primeira vez em 2014, já que a aquacultura forneceu, nesse ano, mais pescado do que a pesca comercial (FAO, 2016).

1.1 Sobre-exploração e Aquacultura de Pepinos do mar

Vulgarmente conhecidos no oriente como *bêche-de-mer*, *trepang* ou *namako*, os pepinos do mar, ou holotúrias, são considerados uma iguaria, e reconhecidos como alimento terapêutico na medicina tradicional, e mesmo como afrodisíaco. Este reconhecimento deve-se ao facto de serem bastante ricos do ponto de vista nutricional, já que apresentam um elevado teor em proteína, considerada de elevada qualidade, e baixo teor de gordura, comparativamente à grande maioria dos alimentos (Ozer *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2007; Salarzadeh *et al.*, 2012). O interesse por este recurso marinho, tem levado à sua crescente e intensa procura, maioritariamente por parte do mercado asiático, que associada à ineficiente gestão dos *stocks* de pesca, tem resultado na drástica diminuição das populações naturais de holotúrias, um pouco por todo o mundo, ainda que com maior incidência no Indo-Pacífico, para fazer face ao mercado de *bêche-de-mer*, em contínuo crescimento, fazendo com que inúmeras espécies tenham sido atingidas pelo flagelo da sobre-exploração, à escala global (Toral-Granda & Vasconcellos, 2008; Purcell *et al.*, 2013; Domínguez-Godino *et al.*, 2015; FAO, 2015).

Em todo o mundo, as capturas de pepino do mar são extremamente diversas em termos de métodos e espécies-alvo. Estas variam desde as capturas artesanais, em que os organismos são capturados à mão em áreas de águas pouco profundas, até à pesca em escala industrial usando mergulho combinado com pesca de arrasto. As populações de pepinos de mar exploradas provaram ser altamente susceptíveis à sobrepesca, tanto a nível local como regional, com ciclos de elevada produção seguida de descida abrupta, que caracterizam a maioria destas capturas. A sobrepesca aumentou o seu valor de mercado, ao mesmo tempo que estimulou os esforços para desenvolver a produção aquícola de várias espécies de pepinos do mar (Zamora *et al.*, 2016).

Os aspetos fundamentais da biologia e ecologia das holotúrias tornam estes espécimes muito vulneráveis à sobre-exploração, uma vez que a sua locomoção lenta os torna presas fáceis, para além de evidências moleculares que sugerem que estes animais podem viver até aos 100 anos (Uthicke *et al.*, 2003). Geralmente de crescimento lento, as

holotúrias realizam desovas externas, pelo que necessitam de elevadas densidades de gâmetas para garantir a fertilização, sendo que o potencial de sobre-exploração é ainda agravado pelo fato de que a maioria dos países atualmente a explorar este recurso, não recorrem ainda a qualquer gestão dos *stocks* de pesca (Lawrence *et al.*, 2004). Ainda que insuficiente, o cultivo de holotúrias é feito um pouco por todo o mundo, maioritariamente destinado ao consumo humano, sendo o continente asiático o principal importador deste produto, após processamento, em bandas de músculo congeladas e pele seca. O músculo é removido da pele, seguindo para congelação, e a pele é semi-processada em fábricas onde é sujeita a um processo de cozedura e salga. Ambos os produtos seguem maioritariamente para exportação, satisfazendo as crescentes necessidades dos mercados asiáticos. A pele é ainda seca ao ar livre ou em máquinas de secagem no local de destino, sendo que o sistema digestivo é também edível, revelando uma composição nutricional bastante rica, de acordo com o apurado para o restante corpo destes animais, sendo normalmente removido logo após captura, de modo a evitar a degradação microbiológica (Duan *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2012). Deste modo, pode dizer-se que o pepino do mar tem um forte potencial de comercialização, uma vez que é fácil de obter, tem baixo custo de produção e é fácil de cozinhar (Saito *et al.*, 2002), encontrando-se maioria das espécies edíveis distribuídas nas regiões sub-tropicais e tropicais, embora também existam em regiões temperadas do globo (Chen, 2004).

No Ocidente, este recurso marinho é até agora pouco explorado, à exceção de regiões como o Atlântico Nordeste e Mar Mediterrâneo, onde várias espécies são capturadas, embora ainda não tenham sido desenvolvidas técnicas de cultivo aquícola. A costa portuguesa é, frequentemente, habitat natural destes invertebrados, mas à exceção do que acontece na Catalunha e Ilhas Baleares, onde são consumidos e bastante apreciados, apesar do seu elevado valor comercial, são rejeições de pesca na região Oeste, acidentalmente capturados em redes de arrasto e outras artes de pesca, ainda que algumas das espécies sejam edíveis (Pombo, com. pess.). As rejeições de pesca consistem, de uma forma geral, em espécies não comercializáveis, e/ou não aceites no mercado local por parte dos consumidores, maioritariamente por desconhecimento da população. A aposta em ações de divulgação junto das populações locais, tendo em vista o consumo de novas espécies, é essencial para a concretização de um objetivo comum: o aproveitamento de todo o pescado edível, para que, cada vez mais, esteja acessível a todos. Contudo, a pressão sobre estes recursos é já visível noutras regiões de Portugal, como na Ria Formosa, onde os pepinos do mar são capturados ilegalmente e exportados para mercados externos (Domínguez-Godino *et al.*, 2015). Esta pressão sobre os *stocks*

coloca em risco a sua sustentabilidade na natureza. A produção em aquacultura tem sido incentivada pelas autoridades responsáveis, constituindo uma solução para a sua sobre-exploração, e tornando possível o combate ao declínio das populações selvagens, podendo ser também direcionada para o repovoamento (Battaglione *et al.*, 2002; Chen, 2004; Giraspy & Ivy, 2008; Giraspy & Walsalam, 2010; Hu *et al.*, 2010; Sicuro & Levine, 2011; Pangkey *et al.*, 2012).

De acordo com Anderson *et al.* (2011 a,b), a exploração de invertebrados de níveis tróficos inferiores, como é o caso das holotúrias, está a ocorrer a uma velocidade muito mais rápida que a gestão desses mesmos recursos, pelo que a contínua aposta na aquacultura é essencial, embora o cultivo de holotúrias seja já uma atividade tradicional em muitos países asiáticos, onde, vulgarmente, os reprodutores são acondicionados em zonas costeiras de baixa profundidade antes da indução da reprodução em maternidades, aumentando o sucesso da desova (Chen, 2004; Bell *et al.*, 2007; Sicuro & Levine, 2011; Purcell *et al.*, 2012a; FAO, 2015).

Os pepinos do mar são cultivados na China, maior produtor mundial, desde meados da década de 1980. Nas regiões da Ásia e do Pacífico, as explorações de pepinos de mar são, predominantemente, extensivas, sendo que a maior parte da produção é exportada para o mercado chinês, incidindo, com maior expressão, nas espécies *Holothuria scabra* e *Apostichopus japonicus*, consideradas as espécies de pepino do mar de maior valor económico nos mercados atuais (Allan & Burnell, 2013; Yang *et al.*, 2015). Existem mais de 134 espécies edíveis de pepino do mar com interesse comercial ao longo da costa da China, no entanto, apesar de *A. japonicus* ser a principal espécie cultivada, dado o seu elevado valor comercial, existem mais de 30 espécies incluídas nas famílias Holothuriidae e Stichopodidae, não cultivadas atualmente, mas que são potenciais candidatas à produção em aquacultura. No norte da China, os pepinos do mar atingem o tamanho de mercado entre os 10 e os 18 meses, sendo o cultivo em águas pouco profundas, em suspensão na coluna de água, e em profundidade, os três principais métodos utilizados com sucesso pelos produtores de pepino do mar (Sicuro & Levine, 2011). A desova de espécies tropicais e temperadas de pepinos do mar é, geralmente, induzida através de stress ambiental em curtos períodos de tempo. A alteração de temperatura, intensidade da luz, fotoperíodo, salinidade, fluxo de marés, disponibilidade e alteração do tipo de alimento são os principais fatores ambientais envolvidos no controlo da gametogénese e da desova de holotúrias. A estimulação térmica é a mais comumente utilizada, embora os animais

sexualmente maduros desovam, muitas vezes, de forma espontânea em resposta ao *stress* da captura e transporte (Eeckhaut *et al.*, 2012; Kumara *et al.*, 2013).

A aquacultura destes organismos tem-se direcionado, nos últimos anos, também para a indústria farmacêutica e cosmética, existindo, atualmente, vários suplementos alimentares no mercado, já que é um alimento com inúmeras propriedades terapêuticas, entre as quais se destacam propriedades anti-tumorais, anti-virais, anti-coagulantes, anti-inflamatórias e anti-microbianas (Poh-Sze, 2004; Sicuro & Levine, 2011; Pangkey *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015a).

Sendo organismos detritívoros, as holotúrias assumem grande relevância em termos ecológicos, pois são responsáveis pela reciclagem de cerca de 90% da biomassa dos fundos marinhos, contribuindo deste modo, para a oxigenação dos sedimentos (Bell *et al.*, 2007). Assim, a introdução do pepino do mar em sistemas aquícolas multi-tróficos, torna-se muito atrativa, onde estas espécies, de nível trófico inferior, podem ser cultivadas em tanques integrados na produção de peixes ou crustáceos, alimentando-se da matéria orgânica produzida pelo nível trófico superior, rentabilizando recursos e diminuindo o impacto ambiental, culminando num aumento da sustentabilidade dos cultivos (Sicuro & Levine, 2011; Han *et al.*, 2016).

1.2 Biologia das espécies

Os pepinos do mar, ou holotúrias, pertencem a um grupo bastante diversificado de invertebrados marinhos, e representam uma das cinco classes do filo Echinodermata, onde se incluem os ouriços e as estrelas-do-mar. Datados de 460 milhões de anos, caracterizam-se pela falta de segmentação, endosqueleto de ossículos calcários e um extenso celoma, encerrado pelo sistema ambulacrário ou vascular, em que a respiração, a locomoção e a função sensorial são combinadas. A simetria do corpo é tipicamente pentarradiada, com uma simetria bilateral secundária. Possuem sistema digestivo completo, o sistema nervoso não é centralizado, e o sistema reprodutivo é simples (Figura 1.1). As holotúrias partilham de uma morfologia típica, possuindo corpo mole, cilíndrico e alongado, da boca ao ânus. Existem cerca de 1500 espécies, no entanto, a cada ano, são descritas novas espécies (Bruckner, 2006).

Os pepinos do mar estão presentes em todas as regiões do oceano, do intertidal ao batial, e do polar ao tropical. Distribuem-se numa ampla variedade de substratos, mas são

encontrados com maior frequência em zonas de corrente moderada, apesar de, geralmente, realizarem migrações sazonais para diferentes profundidades, especialmente durante a época reprodutiva. (Saldanha, 2003; Bruckner, 2006). Os indivíduos movem-se a uma velocidade de cerca de 4 metros por dia, enquanto se alimentam, recolhendo detritos orgânicos com os seus tentáculos adesivos em forma de árvore, desempenhando, deste modo, no ecossistema, a função de recicladores de nutrientes.

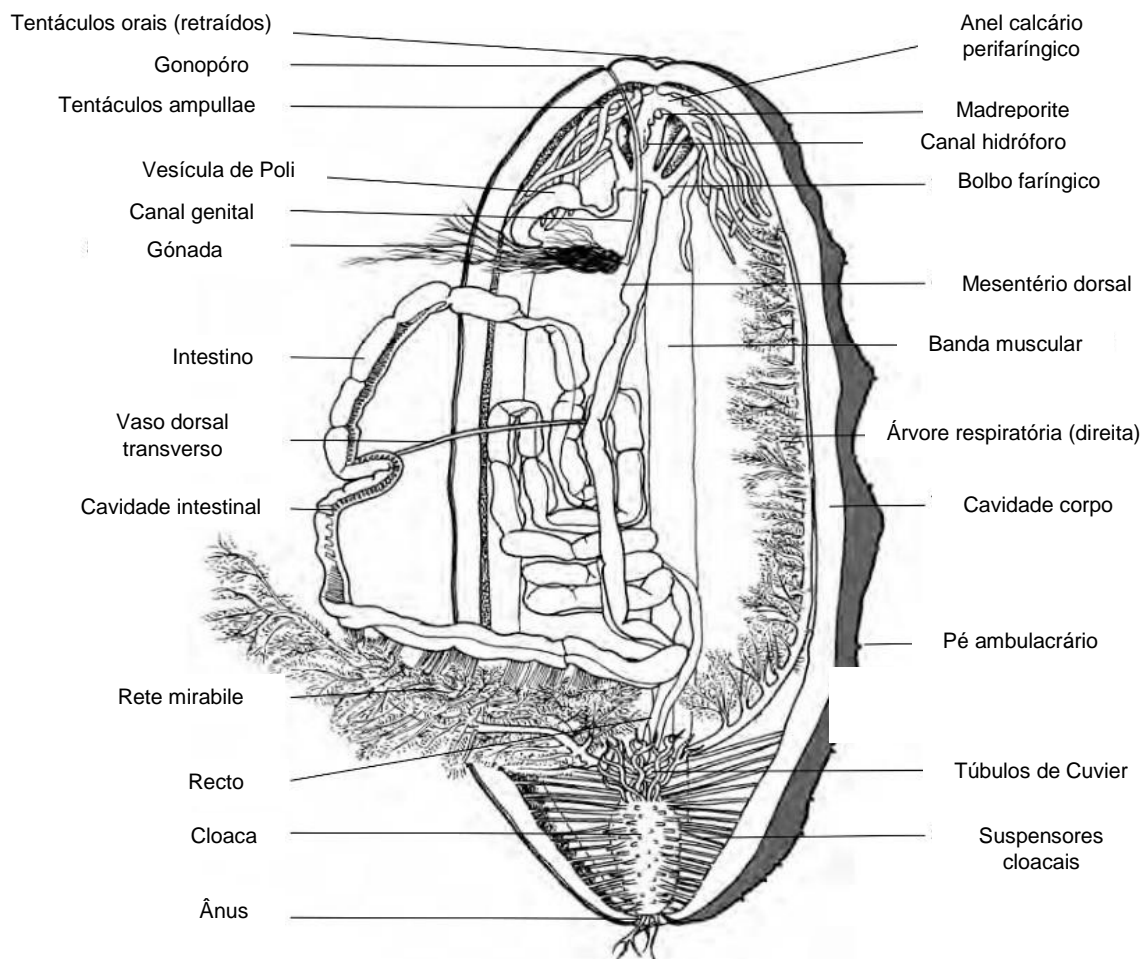


Figura 1.1 Anatomia interna de uma holotúria (Adaptado de Purcell, *et al.*, 2012b).

Assim, os mecanismos usados pelas holotúrias para se alimentarem resultam na troca de grandes quantidades de matéria e energia entre os ecossistemas pelágico e bentónico, bem como na oxigenação dos fundos oceânicos, que se traduz num incremento da produção primária, desempenhando um papel bastante importante na cadeia alimentar. Por outro lado, além da componente detritica, as holotúrias alimentam-se de microalgas, protozoários, nemátodes e copépodes, sendo que, em sistemas aquícolas fechados, vários

estudos recomendam a conjugação de 2 a 3 espécies de microalgas, a fornecer como alimento, de modo a obter um maior equilíbrio nutricional (Singh *et al.*, 1999; Battaglione *et al.*, 2002; Chen, 2003; Saldanha, 2003; Pangkey *et al.*, 2012).

Os pepinos do mar são organismos dióicos, ou seja, possuem sexos separados em indivíduos diferentes, sendo o género identificado apenas através de dissecação e observação microscópica dos gametas. A desova é anual ou bi-anual, dependendo da espécie, e ocorre através do gonópore, que se localiza na parte posterior da cabeça, e pelo qual óvulos e espermatozoides são libertados diretamente na coluna de água, dando origem a larvas planctónicas. As fêmeas são bastante férteis, libertando entre 1 a 2 milhões de óvulos numa única desova. O ciclo de vida destes animais começa na fertilização externa dos ovos, que eclodem cerca de dois dias depois. Vários estudos indicam que o tempo entre o primeiro estágio larvar – Auricularia – e o juvenil oscila entre 7 a 10 dias, intervalo de tempo em que são muito sensíveis às condições ambientais, cruciais para a sua sobrevivência. (Pangkey *et al.*, 2012).

Os juvenis desenvolvem-se a partir de 0,25 mm de comprimento, chegando ao estado adulto cerca de 2 anos após a eclosão. No entanto, as suas dimensões são difíceis de obter, já que o corpo da holotúria é bastante elástico, o que causa dúvidas quanto ao seu real comprimento. Com efeito, estes animais passam por flutuações na massa corporal, espessura da pele e massa muscular, durante o ciclo anual de reabsorção e regeneração dos seus órgãos internos, que evidencia a sua enorme capacidade regenerativa. Deste modo, no caso de existirem episódios de *stress* contínuos ou sucessivos, os animais chegam mesmo à evisceração completa, expulsando, em primeiro lugar, a gónada, seguida dos outros órgãos, sobrevivendo mesmo assim, desde que as condições de *stress* extremo não se mantenham. No estado adulto, têm poucos predadores conhecidos, à exceção de lontras marinhas e várias espécies de estrelas do mar. Os juvenis, sendo naturalmente mais vulneráveis, refugiam-se debaixo de rochas (Pangkey *et al.*, 2012).

As características do ciclo de vida das espécies mais abundantes na costa atlântica portuguesa, *H. forskali* e *S. regalis*, são ainda pouco conhecidas, mas de extrema importância para a avaliação dos *stocks* de pesca locais, já que a concentração do esforço de pesca em áreas relativamente pequenas pode levar à drástica diminuição dos *stocks* de pepino do mar (Santos *et al.*, 2015a). O impacto da redução localizada de populações de pepino do mar, sobre o ecossistema em geral, e os mecanismos envolvidos no

restabelecimento de populações não estão ainda esclarecidos. Assim, e tendo em conta a ocorrência destas duas espécies a profundidades variáveis, estão facilmente acessíveis às artes de pesca praticadas, sendo a sua captura acidental recorrente e já bem reconhecida pelos pescadores locais (Saldanha, 2003).

1.2.1 *Holothuria forskali*

H. forskali (Delle Chiaje, 1823) pertence à família Holothuroidae e habita essencialmente substratos rochosos, geralmente na zona entre marés e a baixas profundidades, no infra e circalitoral, tolerando uma vasta gama de temperaturas e podendo mesmo sobreviver a longos períodos de emersão, durante a baixa-mar (Saldanha, 2003; Campbell, 2006).

A espécie apresenta-se de coloração negra ou amarelo-acastanhada, exibindo tegumento com a extremidade das papilas dorsais branca, e fraca abundância de espículas – pequenas placas calcárias com dois a quatro orifícios (Figura 1.2). Possui inúmeros pés ambulacrários, e cerca de 20 tentáculos em forma de árvore ao redor da boca, que usa para se alimentar e como órgãos sensoriais. Quando é induzido *stress*, seja por captura ou predação, expelle os túbulos de Cuvier – cordões transparentes e viscosos unidos à cloaca - imobilizando a ameaça, podendo estes constituir um meio de defesa. Pode atingir os 25 cm de comprimento (Tuwo & Conand, 1992; Saldanha, 2003).



Figura 1.2 Exemplar de *H. forskali* após amostragem para o presente estudo.

Embora sejam escassos, os estudos realizados até ao presente permitiram compreender alguns aspetos do ciclo reprodutivo da espécie, que se assume como dióica, possuindo caracteristicamente uma única gónada, e se reproduz sexuadamente uma vez por ano, de forma sincronizada, no período entre abril e junho, após o período de maturação sexual, entre novembro e fevereiro. A reabsorção da gónada vazia ocorre logo após a desova (Tuwo & Conand, 1992; Santos *et al.*, 2015a). Esta espécie distribui-se geograficamente ao longo de toda a costa mediterrânica e atlântica (Saldanha, 2003).

1.2.2 *Stichopus regalis*

A espécie *S. regalis* (Cuvier, 1817), também conhecida por *Parastichopus regalis*, está incluída na família Stichopodidae. É uma espécie bentónica, que se caracteriza pelo corpo deprimido, com papilas na margem inferior da face dorsal, face que apresenta séries de tubérculos terminadas em papilas cónicas. De cor castanho-amarelada, manchada de branco, atinge os 35 cm de comprimento (Figura 1.3). O seu habitat compreende o circalitoral, mais concretamente zonas de fundos móveis ou arenosos, ocorrendo também no infralitoral e no batial, sendo encontrada a partir dos 50m de profundidade (Ramón *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2015b).



Figura 1.3 Exemplar de *S. regalis*, após amostragem para o presente estudo.

A sua distribuição geográfica é bastante ampla, e inclui o Mediterrâneo Noroeste, o Atlântico Este desde o sul das Ilhas Canárias até ao Norte da Irlanda, e o Atlântico Oeste, compreendendo as Antilhas e o Golfo do México (Saldanha, 2003; Vannuccini, 2004; Campbell, 2006; Ramón *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2015b).

1.3 Objetivos

Os Pepinos do mar possuem várias características fundamentais, tendo em vista a sua produção em Aquacultura:

1. Muito apreciados na Ásia, mas também na Austrália e em algumas zonas de Espanha (Sicuro & Levine, 2011);
2. Têm um elevado preço de venda, podendo atingir 130 €.kg⁻¹ (peso seco), (Ramón *et al.*, 2010; Sicuro & Levine, 2011; Santos *et al.*, 2015a);
3. São considerados uma iguaria - "*trepang*" ou "*bêche-de-mer*" - com potencialidade para serem exportados para outros países da Europa e para a Ásia (Torral-Granda & Vasconcellos, 2008; Purcell *et al.*, 2012b, 2013; Domínguez-Godino *et al.*, 2015; FAO, 2015);
4. O *stock* natural deste recurso tem, aparentemente, uma tendência negativa em Portugal, à semelhança do que tem acontecido noutros países (Domínguez-Godino *et al.*, 2015);
5. É passível de ser cultivado de forma ecologicamente sustentável, pois está situado num nível baixo da cadeia trófica, podendo ser integrado em outros cultivos de peixes teleósteos marinhos, como por exemplo de dourada ou de robalo, ou moluscos bivalves, como a ostra.

Apesar das singularidades que possuem, tendo em vista a sua produção em aquacultura, estas espécies não são ainda produzidas na Europa. Este facto abre caminho para novos estudos, com vista à sua adaptação ao cativeiro, e exigindo, para isso, o desenvolvimento de técnicas específicas para as espécies endógenas existentes. Neste trabalho pretende-se realizar o estudo do transporte e acondicionamento de reprodutores de duas espécies de pepinos do mar da costa atlântica portuguesa, *H. forskali* e *S. regalis*. Com efeito, um dos objetivos específicos deste trabalho é a avaliação do método de transporte, no sentido de minimizar o *stress* provocado por esta prática. Como segundo objetivo específico, pretende-se avaliar o impacto do acondicionamento no teor proteico destes indivíduos, sujeitos a uma dieta composta por microalgas, bem como na organização e densidade do tecido muscular, por meio de técnicas histológicas. Outro

objetivo deste trabalho consiste em apurar a aceitabilidade dos pepinos do mar estudados, por meio de análise sensorial, tendo em vista a sua introdução no mercado de consumo ocidental.

transporte e chegada ao Laboratório de Aquacultura do MARE - IPLeiria do Instituto Politécnico de Leiria, de 7h. À chegada ao laboratório e nos três dias seguintes, foi realizada uma observação dos exemplares registrando:

- a) Ocorrência de evisceração total ou parcial;
- b) Alteração de comportamento;
- c) Lesões no tegumento;
- d) Mortalidade.

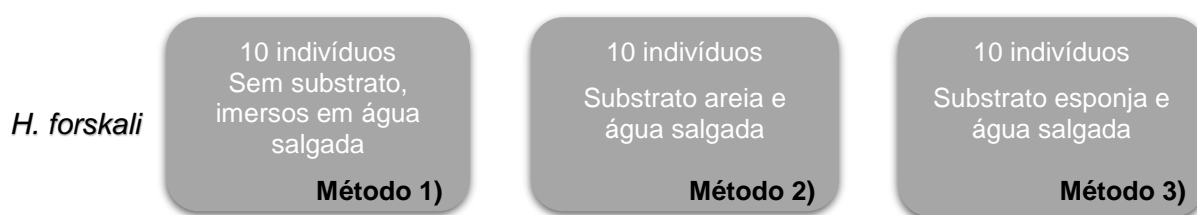


Figura 2.2 Desenho experimental relativo ao ensaio de transporte de *H. forskali*.

2.1.2 Transporte de *S. regalis*

Os 30 indivíduos amostrados foram capturados pela embarcação “Veneza”, utilizando a arte de pesca de arrasto, ao largo da costa de Peniche (39°21'21.5"N 9°25'45.6"O), em abril de 2015. Após a captura, os animais foram transportados num tanque com recirculação de água procedente do local de captura, até ao porto de Peniche. À chegada da embarcação, foi feita a transferência dos animais para arcas térmicas, com 0,03 m³ de capacidade cada, em grupos de 10 indivíduos (n=30), bem como de água salgada do local de captura, suficiente para a imersão dos organismos, praticando-se o Método 1, similar ao realizado para o transporte de *H. forskali*. As arcas térmicas foram mantidas fechadas, sem arejamento, até à chegada ao Laboratório de Aquacultura do MARE - IPLeiria. O intervalo de tempo entre a recolha na embarcação e o acondicionamento em cativeiro foi de 30 minutos.

2.2 Ensaio de Acondicionamento

2.2.1 Acondicionamento de *H. forskali*

O acondicionamento foi realizado durante 6 meses, para 90 *H. forskali*, com um peso médio (\pm SD) de 139,10 \pm 13,26 g, capturados através da técnica de mergulho autónomo, na costa de Peniche (39° 21' 16"N, 9° 23' 41"O). Todos os indivíduos foram pesados individualmente, numa balança analítica (ADAM PGL Precision Balance NDPGL4001, EUA) e distribuídos, de modo aleatório, em grupos de 30 indivíduos e em 3 tanques de 1 m³, integrados num sistema de recirculação de água (RAS), com arejamento contínuo, filtração biológica, sistema de refrigeração (Frimar 300, Portugal) e substrato arenoso (Figura 2.3). O fotoperíodo praticado foi de 12h de luz e 12h escuro.

Durante a distribuição dos animais nos tanques, evitou-se a transferência de areia ou material eviscerado contido nas arcas térmicas. Diariamente, foi feita a observação dos espécimes, no sentido de verificar a existência de alterações fisiológicas, e removidos os produtos resultantes da excreção, através de sifonagem, para reduzir a contaminação bacteriana e prevenir alterações significativas da qualidade da água.



Figura 2.3 Tanque de acondicionamento de *H. forskali*.

Os parâmetros físico-químicos da água foram ajustados às condições do habitat natural, realizando-se medições diárias de temperatura (T°C) e oxigénio dissolvido (O₂) por meio de um oxímetro (INNOVAQUA, Espanha), de pH, amónia, nitratos e nitritos (NH₃, NH₄⁺ e NO₂⁻) através de kits de testes rápidos colorimétricos (API, EUA), bem como de

salinidade, medida com um refratómetro (TMC V2, Espanha), de modo a evitar oscilações consideráveis que pudessem por em causa a sobrevivência dos animais em estudo. Deste modo, a temperatura (T°C) foi mantida entre 16 e 18 °C, o oxigénio dissolvido (O₂) variou entre 7,4 e 7,9 mg.L⁻¹, sendo o valor limite máximo estabelecido para a concentração de amónia, nitratos e nitritos (NH₃, NH₄⁺ e NO₂⁻) de 0,25 mg L⁻¹. A salinidade variou entre 33 e 35, e o pH entre 7,8 e 8,2. No final dos 6 meses de acondicionamento, os animais em estudo foram todos pesados e dissecados longitudinalmente, recolhendo-se o músculo integralmente para posterior análise.

2.2.2 Acondicionamento de *S. regalis*

Para *S. regalis*, o acondicionamento foi realizado durante 1 mês para 30 indivíduos, com peso médio (\pm SD) de 251,14 \pm 7,50 g. Todos os indivíduos foram pesados individualmente, numa balança analítica (ADAM PGL Precision Balance NDPGL4001, EUA) e distribuídos num tanque de 1 m³, integrado num sistema de recirculação de água (RAS), com arejamento contínuo e substrato arenoso (Figura 2.4). Relativamente ao fotoperíodo, que nesta espécie foi de 8h luz /16h escuro, o período de escuro foi simulado através da cobertura do respetivo tanque. A distribuição dos animais no tanque foi feita de modo a evitar a transferência de areia ou material eviscerado contido nas arcas de transporte.

Previamente, foi realizada a adaptação dos parâmetros físico-químicos da água às condições do habitat natural, realizando-se, durante o período de acondicionamento, medições diárias de temperatura (T°C) e oxigénio dissolvido (O₂) por meio de um oxímetro (INNOVAQUA, Espanha), de pH, amónia, nitratos e nitritos (NH₃, NH₄⁺ e NO₂⁻) através de kits de testes rápidos colorimétricos (API, EUA), bem como de salinidade, medida com um refratómetro (TMC V2, Espanha), de modo a evitar oscilações consideráveis, que pudessem por em causa a sobrevivência dos animais em estudo, dada a elevada intolerância desta espécie a alterações do meio. Assim, a temperatura foi mantida entre 13 e 16 °C, através da instalação de um sistema de refrigeração (Frimar 300, Portugal). O oxigénio dissolvido (O₂) variou entre 7,4 e 7,9 mg.L⁻¹, sendo o valor limite máximo estabelecido para a concentração de amónia, nitratos e nitritos (NH₃, NH₄⁺ e NO₂⁻) de 0,25 mg.L⁻¹. A salinidade variou entre 33 e 35, e o pH entre 7,8 e 8,2. A observação dos espécimes, no sentido de verificar possíveis alterações fisiológicas, e a remoção dos

produtos de excreção, através de sifonagem, para limitar a contaminação bacteriana e prevenir alterações dos parâmetros da água, fizeram parte da rotina diária.

No final do tempo de acondicionamento, todos os animais foram novamente pesados, dissecados longitudinalmente, e recolhidas as bandas musculares, para análise posterior.



Figura 2.4 Tanque de acondicionamento de *S. regalis*.

2.2.3 Alimentação

A alimentação, constituída por três espécies de microalgas nativas da costa atlântica portuguesa – *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp., *Phaeodactylum tricorutum* -, foi fornecida em regime bi-diário, a uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células mL^{-1} , em igual proporção das várias espécies. As microalgas foram escolhidas tendo em conta o seu elevado valor nutricional e distribuição geográfica, sendo o seu cultivo realizado na sala de cultivos auxiliares do Laboratório de Aquacultura do MARE-IPLeiria, no decorrer do ensaio de acondicionamento (Battaglione, 2002; Brown, 2002; Ferreira, 2009).

2.3 Análise do teor proteico

A análise do teor proteico foi realizada através do método Kjeldahl (1883), a partir do músculo de três indivíduos no estado selvagem ou recém-capturados, e de três indivíduos após acondicionamento, para cada espécie em estudo, tendo em vista a comparação dos valores obtidos entre os dois grupos da mesma espécie e entre as duas espécies. Para a

análise dos indivíduos recém-capturados, foi realizada nova amostragem de 3 indivíduos de *H. forskali* e de 3 indivíduos de *S. regalis*, em Maio de 2015.

Previamente à análise, e por dissecação longitudinal (Figura 2.5), foi feita a recolha integral do músculo reservando-se este a - 80°C, durante 24 horas.

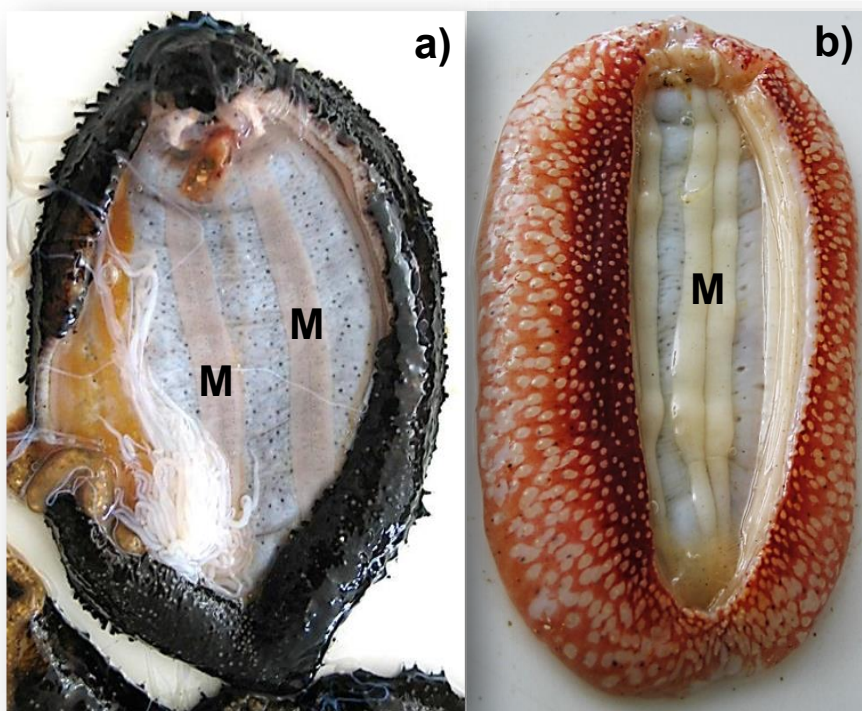


Figura 2.5 Indivíduo de *H. forskali* a) e *S. regalis* b), dissecados após o período de acondicionamento para recolha das bandas musculares (M).

Os valores de proteína bruta contidos nas amostras de músculo foram calculados a partir da medição, em duplicado, do teor de azoto contido em todas as amostras, utilizando para o efeito a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = [(Va - Vb) * [HCl] * 6,25 * 0,014] / m \text{ amostra} * 100$$

Deste modo, foi verificada a evolução da condição física dos espécimes, relativamente ao acondicionamento de reprodutores em cativeiro, e em termos nutricionais, no que diz respeito à aplicabilidade das condições praticadas ao cultivo aquícola, das duas espécies em estudo.

2.4 Análise histológica

O músculo dos indivíduos no estado selvagem e após acondicionamento, foi ainda analisado através de técnicas histológicas, com duas diferentes colorações, H&E, utilizada para evidenciar os núcleos e o citoplasma das células musculares, e, por conseguinte, a sua presença (Anexo II), e Vermelho Picro-Sírius (Puchtler's), que permite a observação do colagénio presente nos tecidos analisados, muitas vezes assinalando a presença de outros tecidos a este associados (Anexo III). Para a análise dos indivíduos recém-capturados, foi realizada nova amostragem de 10 indivíduos de *H. forskali* e de 10 indivíduos de *S. regalis*, em Maio de 2015.

Feita a recolha das amostras, seguiu-se a fixação dos tecidos, realizada com formaldeído tamponado a 10%, e posterior desidratação dos tecidos e inclusão em parafina (Anexo I), num processador de tecidos (Leica TP1020, Alemanha). Após o enchimento e secagem dos blocos, foram feitos 10 cortes de 5 µm, para cada amostra, com intervalos de 50 µm, utilizando um micrótopo (Sakura Accu – cut SRM 200, Japão). Seguiu-se a aplicação das duas colorações, H&E e Vermelho Picro-sírius. A coloração com H&E iniciou-se com a desparafinação em histolemon e hidratação em álcoois de graduação decrescente, e coloração pela passagem pelos dois corantes, hematoxilina e eosina, repetindo-se a etapa de lavagem, seguida de desidratação em álcoois de graduação crescente, e nova imersão em histolemon (Anexo II). Realizou-se, similarmente, a coloração com Vermelho Picro-sírius, à qual se seguiu nova lavagem, e desidratação, finalizando com a passagem em histolemon (Anexo III) e montagem das lâminas.

Posteriormente, procedeu-se à observação das fibras musculares, por meio de um microscópio (Leica DM 2000 LED, Alemanha), sendo fotografadas com câmara digital integrada (Leica MC170 HD, Alemanha), a uma ampliação total de 100x e 200x (*Software LAS V4.4*).

2.5 Análise sensorial

Para esta análise, foram capturados, ao largo da costa de Peniche, Portugal (39° 21' 32" N, 9° 22' 40" W), 20 indivíduos *H. forskali* através da técnica de mergulho autónomo, e 20 *S. regalis*, provenientes de rejeições da pesca de arrasto, em Outubro de 2014. À chegada à sala de cozinha da ESTM, os indivíduos foram convenientemente preparados,

e utilizados na confecção de vários pratos, em parceria com os estudantes do 3º ano do Curso de Restauração e Catering, da ESTM - IPL.

Realizaram-se duas provas gastronómicas, no sentido de apurar, através do preenchimento de um questionário de satisfação (Anexo IV), o grau de aceitabilidade dos pratos confeccionados com cada uma das espécies em estudo, *H. forskali* (Figura 2.6) e *S. regalis* (Figura 2.7), no estado selvagem, com base nas suas características organoléticas:

- Aparência, textura, sabor, odor.

As amostras foram avaliadas através dos atributos “aparência”, “textura”, “sabor”, “odor”, por 22 provadores não treinados, após degustação, sendo a escala utilizada para classificação, de 1 a 5 pontos. A esta escala foram atribuídos os seguintes valores: “extremamente desagradável” (1), “moderadamente desagradável” (2), “indiferente” (3), “moderadamente agradável” (4) e “muito agradável” (5). A avaliação da prova gastronómica de cada uma das espécies foi ainda classificada pelos provadores segundo o atributo “aceitação global”, numa escala de 1 a 9: “extremamente desagradável” (1), “muito desagradável” (2), “moderadamente desagradável” (3), “ligeiramente desagradável” (4), “indiferente” (5), “ligeiramente agradável” (6), “moderadamente agradável” (7), “muito agradável” (8) e “extremamente agradável” (9).

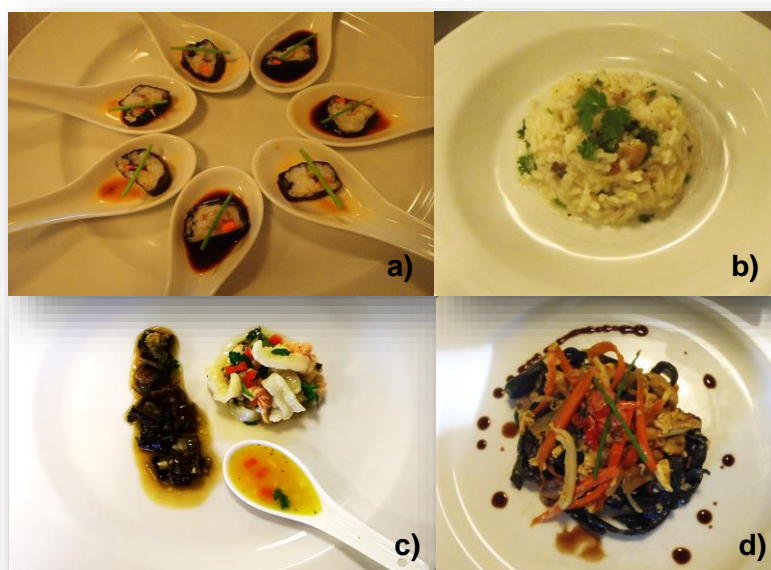


Figura 2.6 Pratos confeccionados com *H. forskali*, no estado selvagem: **a)** Sushi; **b)** Risotto; **c)** Caldo; **d)** Salteado.

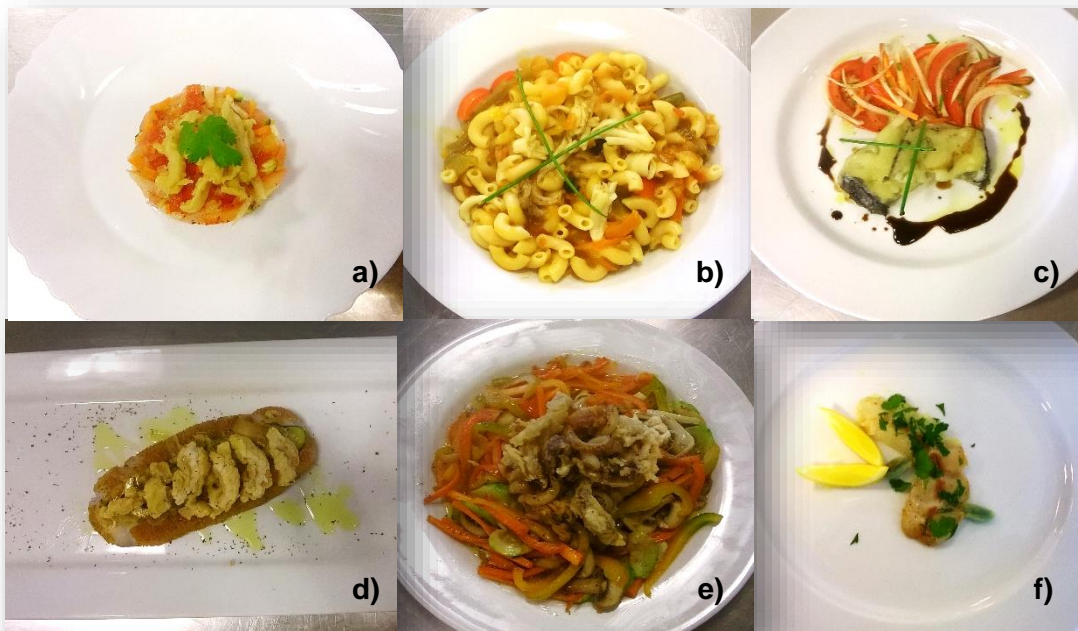


Figura 2.7 Pratos confeccionados com *S. regalis*, no estado selvagem: **a)** Ceviche; **b)** Massada; **c)** *Canellones*; **d)** Panado; **e)** Salteado; **f)** Braseado.

2.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variâncias de 1 fator (*One-Way ANOVA*), no sentido de verificar as diferenças antes e após o período de acondicionamento, comparando os pesos dos indivíduos recém-capturados e acondicionados, bem como o teor proteico do músculo dos dois grupos de *H. forskali* e *S. regalis*, e ainda entre as duas espécies. Sempre que se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), realizou-se um teste *T*, para comparações múltiplas. Os dados são apresentados, sempre que praticável, como média \pm desvio padrão (SD). Os dados relativos à análise sensorial, visto partirem de uma avaliação qualitativa, foram tratados como média \pm desvio padrão (SD). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio dos *softwares* estatísticos SPSS 22.0 e Microsoft Excel 2016.

3. Resultados

3.1 Ensaio de transporte

3.1.1 Transporte de *H. forskali*

No final da experiência, verificou-se 100% de sobrevivência dos indivíduos de *H. forskali* sujeitos a transporte, durante 7 horas. Observou-se que não houve lesões ou evisceração no Método 1, em que os animais foram transportados sem qualquer substrato, e imersos em água salgada (Tabela I).

Por outro lado, nos Métodos 2 e 3, nos quais os animais foram transportados com substrato de areia e água salgada, e com substrato de esponja e água salgada, respetivamente, verificaram-se lesões do tegumento provocadas por fricção no substrato, evidenciando um maior nível de *stress* induzido pelo transporte. Foi possível identificar lesões no tegumento em 40% dos indivíduos sujeitos ao Método 2, com substrato de areia e água salgada, e em 100% dos indivíduos submetidos ao Método 3, com substrato de esponja e água salgada. No entanto, o fenómeno de evisceração foi observado apenas no Método 3, embora fosse confirmado nas três réplicas, havendo, deste modo, 100% de evisceração no Método 3, um sinal de *stress*, intensificado neste método (Tabela I).

Tabela I - Resumo dos métodos usados no ensaio de transporte realizado, no sentido de avaliar os seus efeitos na condição física dos indivíduos de *H. forskali*.

Método	1) Sem substrato, imersão água salgada	2) Areia e água salgada	3) Esponja e água salgada
Nº de indivíduos por arca	10	10	10
Peso médio (\pmSD) (g)	144,90 \pm 42,26	135,19 \pm 19,24	137,22 \pm 46,44
Réplicas (<i>n</i>)	3	3	3
Duração (h)	7	7	7
Lesões no tegumento (%)	0	40	100
Evisceração (%)	0	0	100
Mortalidade (%)	0	0	0

3.1.2 Transporte de *S. regalis*

Os espécimes de *S. regalis* foram transportados durante o menor intervalo de tempo possível, com a duração de 30 minutos, entre o porto de pesca de Peniche e o Laboratório de Aquacultura do MARE - IPLeiria. O estado debilitado dos animais à chegada ao porto de pesca motivou a redução da duração do transporte, por forma a evitar a sucessão de episódios de *stress*, já que esta espécie se revelou extremamente sensível, evidenciando sinais físicos de reduzida tolerância a alterações ambientais, para além do elevado nível de *stress* induzido pelo método de captura.

Concluído o ensaio, verificou-se a sobrevivência de 90% dos indivíduos de *S. regalis* sujeitos ao transporte pelo Método 1. Observou-se que todos os animais apresentavam lesões no tegumento, 60% dos quais sofreram, simultaneamente, evisceração (Tabela II).

Tabela II - Resumo do método aplicado no ensaio de transporte realizado, no sentido de avaliar os seus efeitos na condição física dos indivíduos de *S. regalis*.

Método	1) Sem substrato, imersão água salgada
Nº de indivíduos por arca	10
Peso médio (\pmSD) (g)	251,14 \pm 7,50
Réplicas (<i>n</i>)	3
Duração (min)	30
Lesões no tegumento (%)	100%
Evisceração (%)	60%
Mortalidade (%)	10%

3.2 Ensaio de acondicionamento

3.2.1 Acondicionamento de *H. forskali*

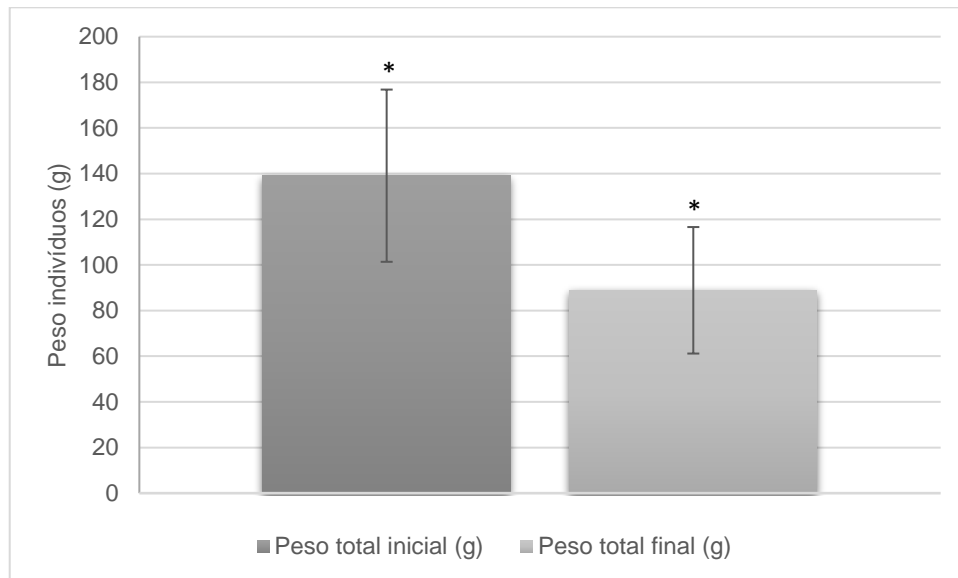


Figura 3.1 Representação gráfica relativa aos valores dos pesos médios (\pm SD) (g) dos indivíduos de *H. forskali*, no início e no final do período de acondicionamento (média \pm desvio-padrão). *Diferenças estatisticamente significativas.

No que diz respeito aos resultados do acondicionamento de *H. forskali*, verifica-se que os valores dos pesos dos indivíduos (g) após o período de acondicionamento de 6 meses se revelaram significativamente inferiores ($p < 0,05$) em comparação aos pesos médios iniciais (\pm SD) (g) dos mesmos indivíduos recém-capturados.

3.2.2 Acondicionamento de *S. regalis*

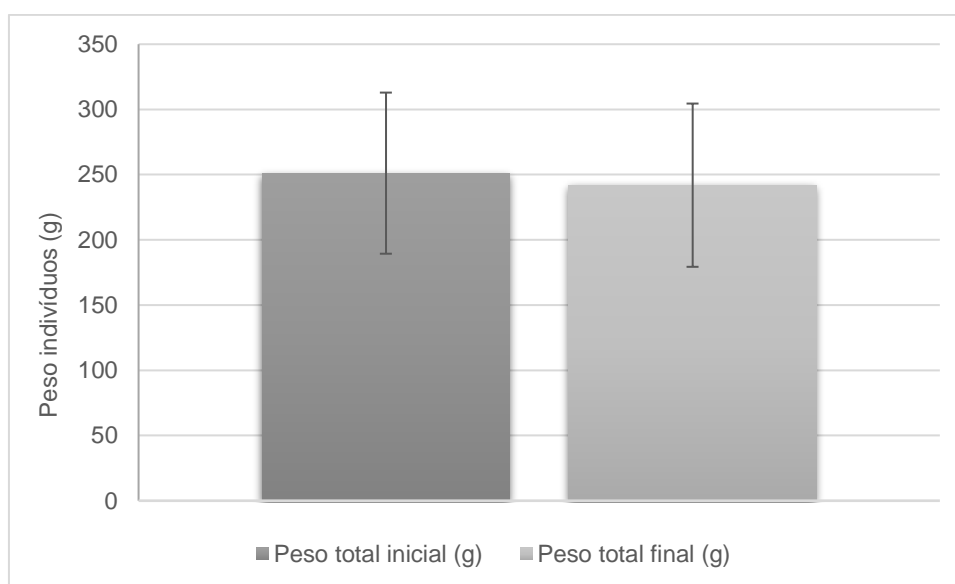


Figura 3.2 Representação gráfica relativa aos valores dos pesos médios (\pm SD) (g) dos indivíduos de *S. regalis*, no início e no final do período de condicionamento (média \pm desvio-padrão).

Relativamente aos resultados apurados para *S. regalis*, é possível verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores dos pesos médios (\pm SD) dos indivíduos (g) logo após a captura e após um mês de condicionamento.

3.3 Análise do teor proteico

3.3.1 *H. forskali*

Nos indivíduos *H. forskali* sujeitos a 6 meses de condicionamento, o valor médio relativo ao teor proteico, foi de $12,8\% \pm 1,6$ (\pm SD), significativamente mais elevado (p -value $\leq 0,05$) que o obtido nos organismos selvagens, em que se obteve um valor claramente inferior, de $9,1\% \pm 1,1$ (\pm SD) (Figura 3.3).

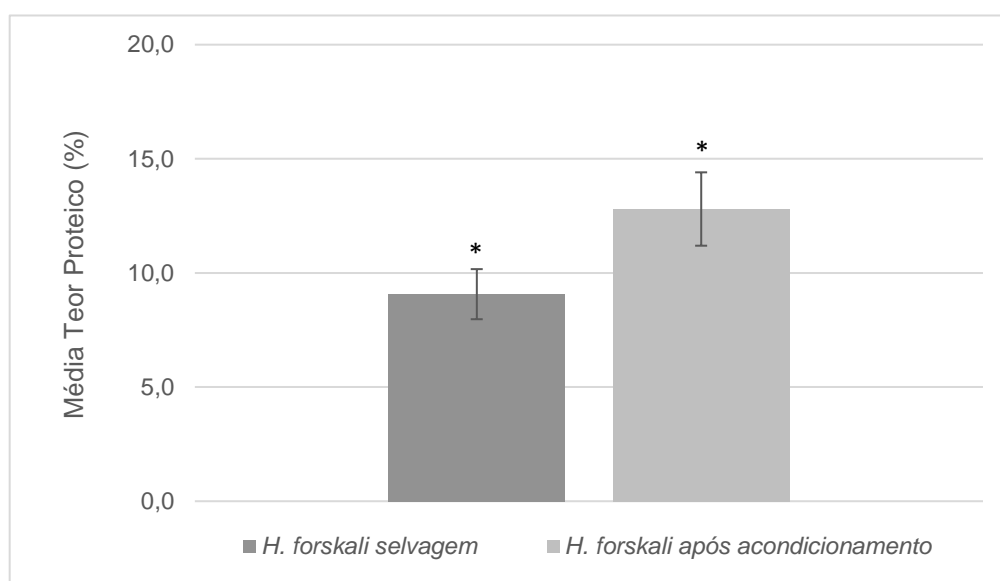


Figura 3.3 Representação gráfica relativa à análise do teor proteico (%) das bandas musculares de indivíduos de *H. forskali* no estado selvagem e após período de condicionamento. *Diferenças estatisticamente significativas.

3.3.2 *S. regalis*

No que diz respeito a *S. regalis*, verificou-se um teor proteico de $12,6\% \pm 2,5$ (\pm SD) nos indivíduos acondicionados durante 1 mês, e de $12,3\% \pm 1,3$ (\pm SD) nos indivíduos sem acondicionamento ou em estado selvagem, sendo este último ligeiramente inferior, comparando os resultados das duas condições. No entanto, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (p -value $\leq 0,05$), (Figura 3.4).

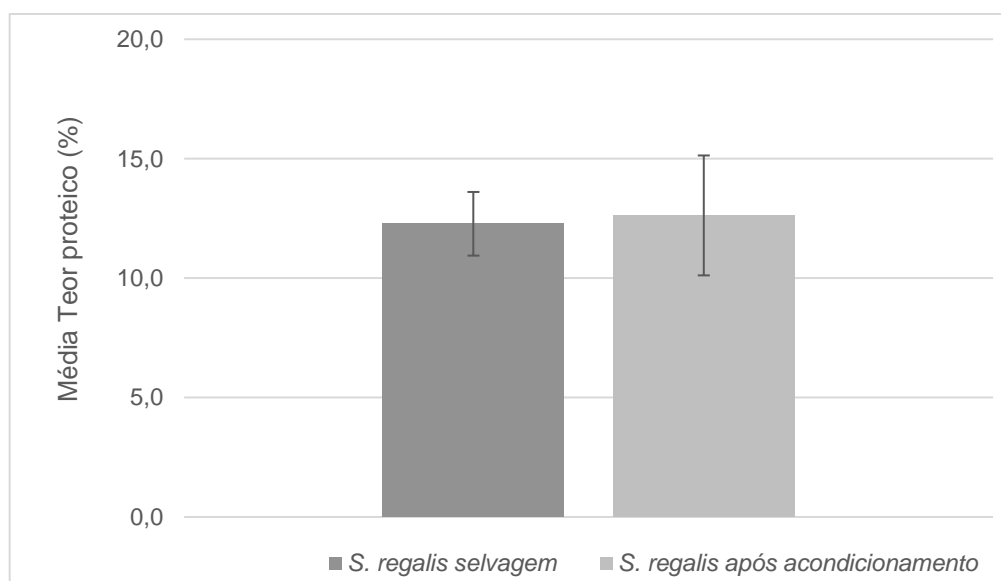


Figura 3.4 Representação gráfica relativa à análise do teor proteico (%) das bandas musculares de indivíduos de *S. regalis* no estado selvagem e após período de acondicionamento.

3.4 Análise Histológica

3.4.1 *H. forskali*

Após observação detalhada dos vários cortes histológicos corados com H&E, verifica-se a enorme abundância de células musculares, organizadas em feixes, delimitadas por tecido conjuntivo (Figura 3.5).

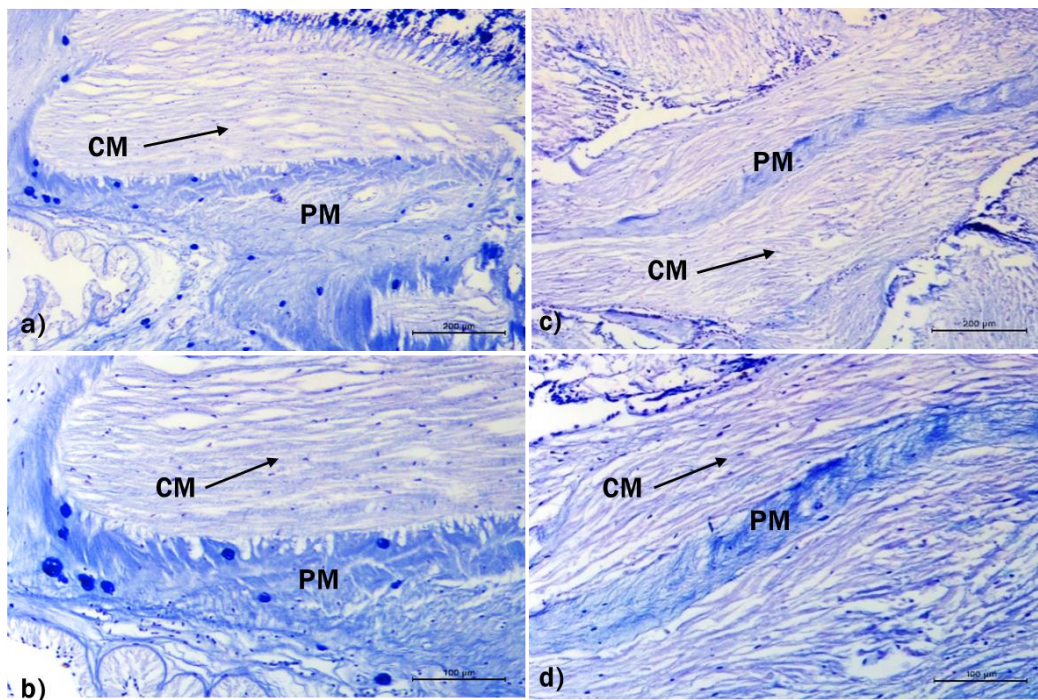


Figura 3.5 Bandas musculares de *H. forskali*, no estado selvagem - **a)**, **b)**, e após 6 meses de acondicionamento - **c)**, **d)**. Observação de corte histológico transversal - **a)** e **b)** e longitudinal - **c)** e **d)**, ao MOC, após coloração com H&E, com ampliação de: **a)**, **c)** 100x; **b)**, **d)** 200x. Observa-se a presença abundante de células musculares com núcleos diferenciados (**CM**), e do tecido conjuntivo a limitar as fibras musculares: perimísio (**PM**).

A organização estrutural é mais evidente nos cortes histológicos corados com Vermelho Picro-sírius, pois é possível visualizar com maior exatidão o tecido conjuntivo, que se observa associado ao colagénio, corado de vermelho. Deste modo, verifica-se a presença de dois tipos de tecido conjuntivo envolvendo os diferentes feixes de células musculares: endomísio (**EM**) e perimísio (**PM**) (Figura 3.6).

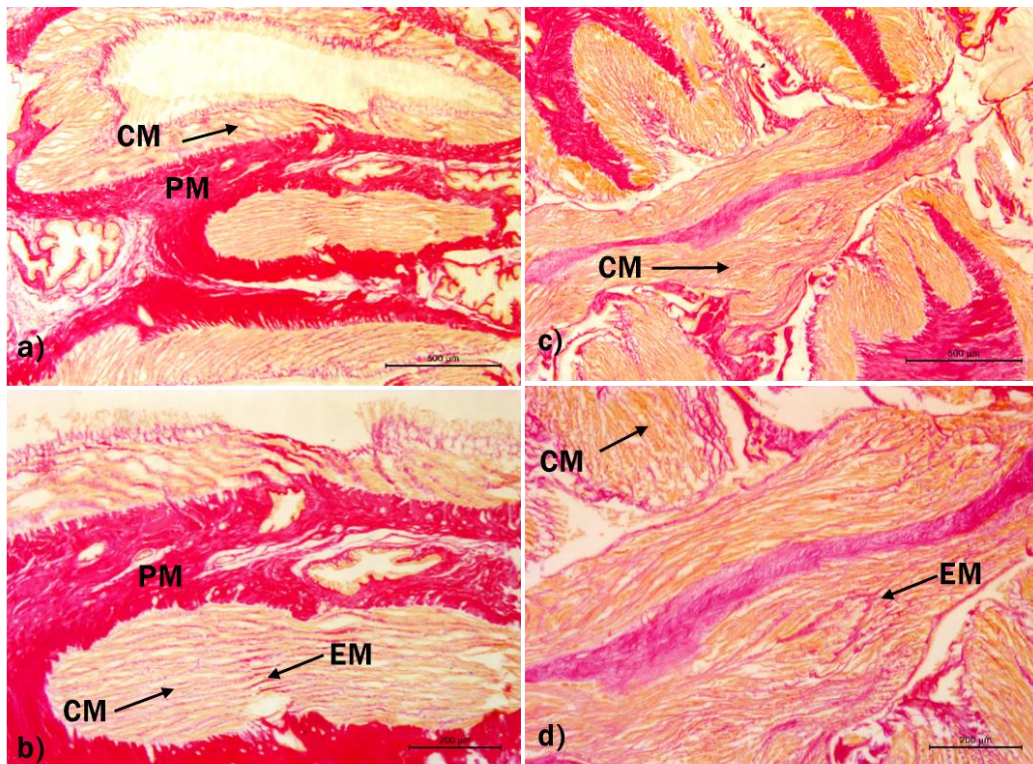


Figura 3.6 Bandas musculares de *H. forskali*, no estado selvagem - **a**), **b**), e após 6 meses de acondicionamento - **c**), **d**). Observação de corte histológico transversal - **a**) e **b**) e longitudinal - **c**) e **d**), ao MOC, após coloração com Vermelho Picro-sírius, e ampliação de: **a**), **c**) 100x; **b**), **d**) 200x. A coloração Vermelho Picro-sírius comprova a abundância do colagénio no tecido muscular, corado a vermelho, e difundindo-se entre as células musculares (**CM**) associado ao tecido conjuntivo: endomísio (**EM**) e perimísio (**PM**).

Fazendo incidir, sobre o corte, um feixe de luz polarizada, é evidenciada a organização estrutural do músculo, sendo possível observar, com maior clareza, os constituintes da banda muscular de *H. forskali* (Figura 3.7). O fenômeno de birrefringência^a ou dupla refração é bem visível, indicando a forte presença de colagénio e tecido conjuntivo no tecido muscular de *H. forskali*, persistindo observáveis **CM**, **EM** e **PM**.

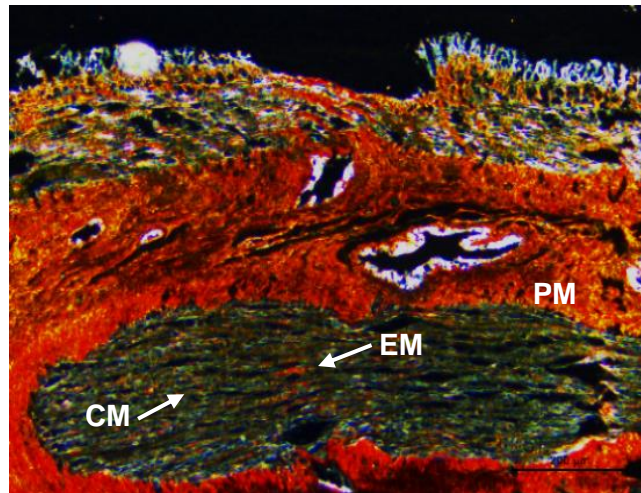


Figura 3.7 Bandas musculares de *H. forskali*, no estado selvagem. Observação de corte histológico transversal ao MOC, após coloração com Vermelho Picro-sírius, ampliação de 200x e feixe de luz polarizada. Células musculares (**CM**). Tecido conjuntivo: endomísio (**EM**) e perimísio (**PM**).

3.4.2 *S. regalis*

Analisando as preparações realizadas a partir de bandas musculares amostradas em *S. regalis* recém-capturados, é possível observar, tal como em *H. forskali*, a abundância de células musculares, após coloração com H&E [a) e b)], embora seja possível visualizar com maior definição após coloração com Vermelho Picro-sírius [c) e d)], onde se observam zonas onde a coloração vermelha é mais evidente, comprovando a presença de tecido conjuntivo a envolver as fibras musculares [c) e d)], (Figura 3.8).

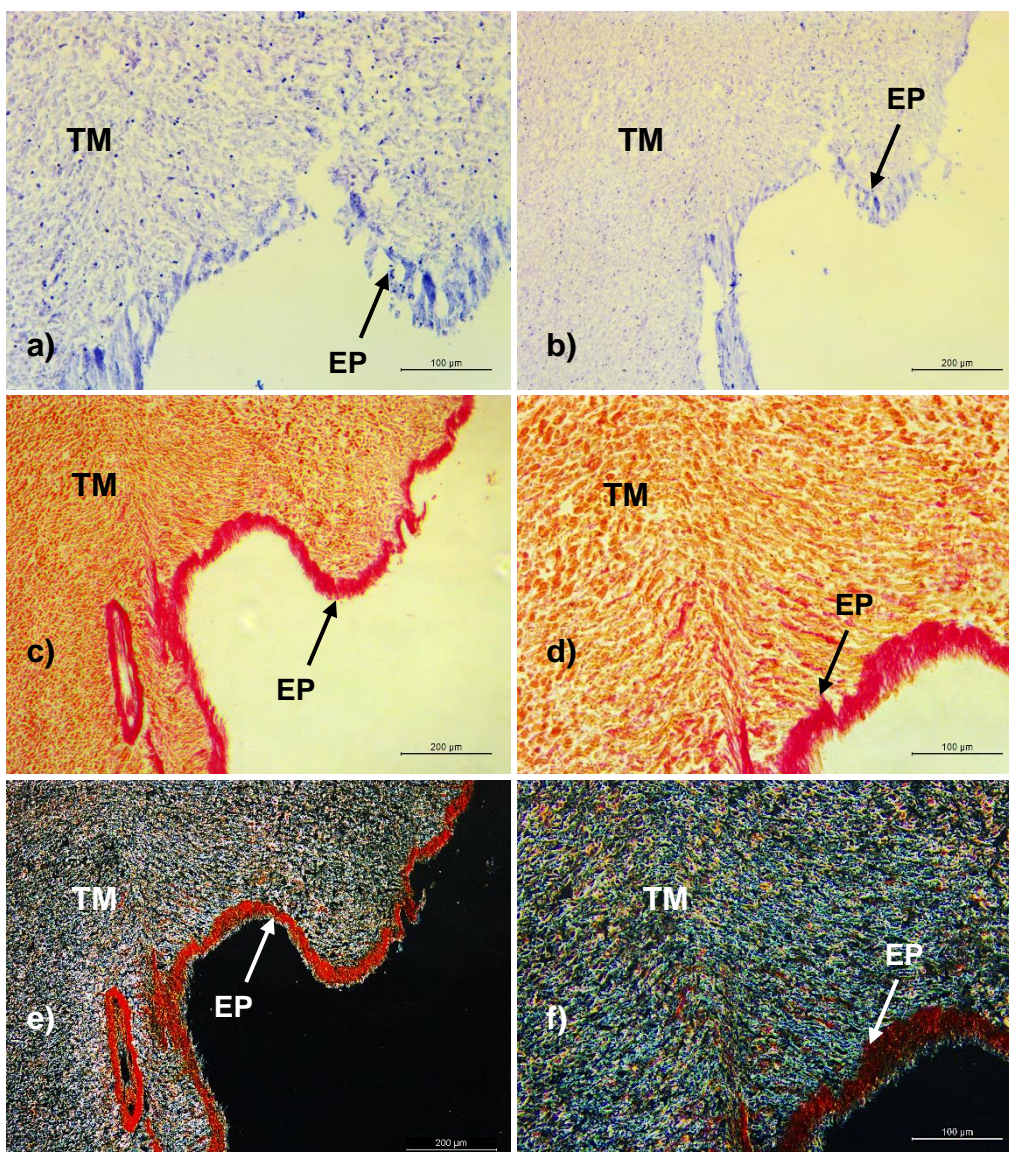


Figura 3.8 Bandas musculares de *S. regalis*, no estado selvagem. Observação de corte histológico longitudinal de uma banda muscular, ao MOC, após coloração com H&E: a) e b); Vermelho Picro-sírius: c) e d); Vermelho Picro-sírius com luz polarizada: e) e f). Ampliação de: a), c), e): 100x; b), d), f): 200x. São visíveis as células musculares, longitudinais, que formam o tecido muscular (TM), limitado por tecido conjuntivo: epimísio (EP).

Nos cortes histológicos de bandas musculares amostradas em *S. regalis* após um mês de acondicionamento, observa-se uma faixa de células diferenciadas que se encontra a delimitar a zona abundante em células musculares, compondo o tecido conjuntivo (Figura 3.9).

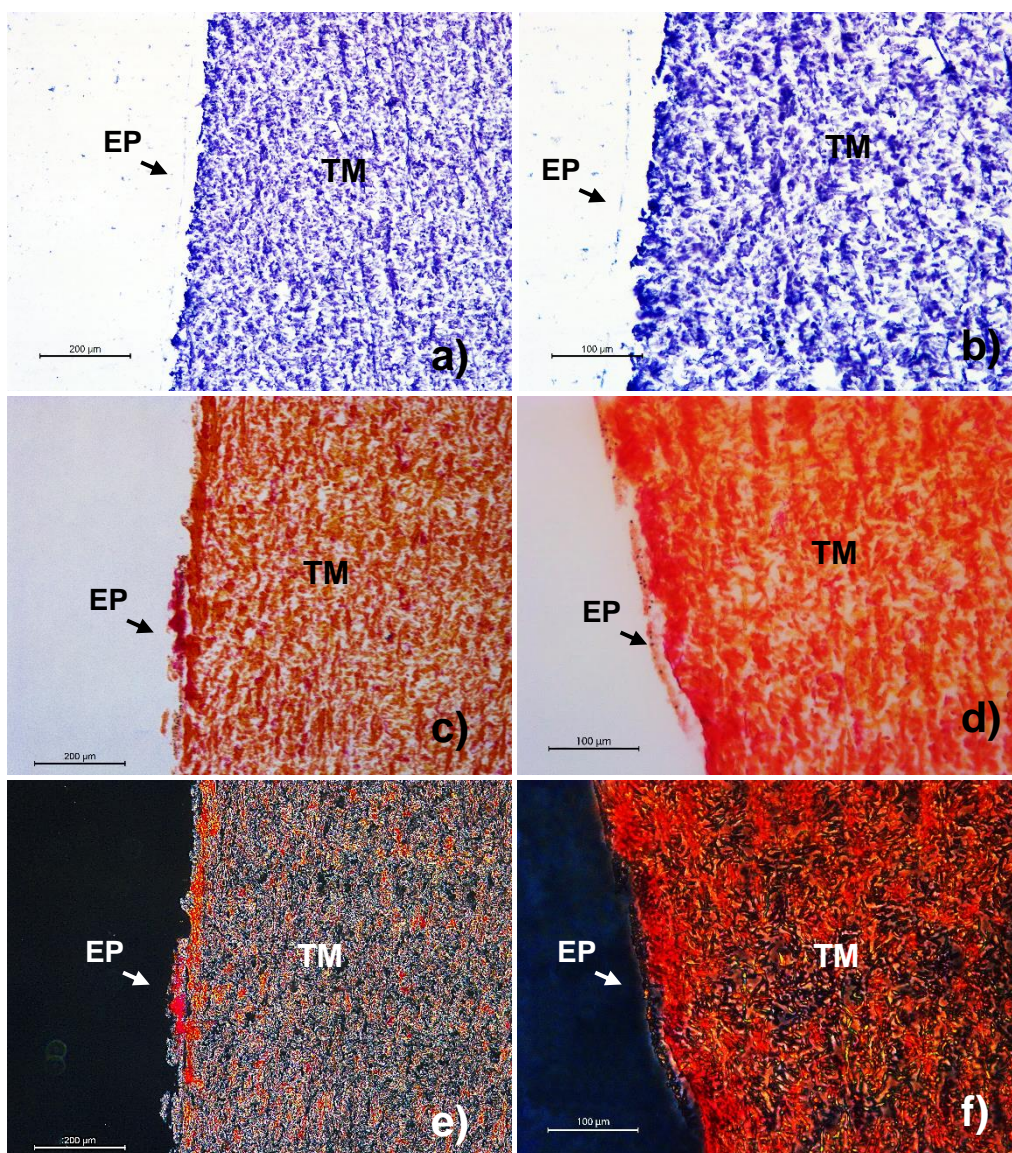


Figura 3.9 Bandas musculares de *S. regalis*, após 1 mês de acondicionamento. Observação de corte histológico longitudinal de uma banda muscular, ao MOC, após coloração com H&E: **a)** e **b)**; Vermelho Picro-sírius: **c)** e **d)**; Vermelho Picro-sírius com luz polarizada: **e)** e **f)**. Ampliação de: **a), c), e)**: 100x; **b), d), f)**: 200x. São visíveis as células musculares, longitudinais, constituindo o tecido muscular (**TM**), limitado por tecido conjuntivo: epimísio (**EP**).

Nas preparações coradas com Vermelho Picro-sirius, é bastante evidente a presença de colagénio no músculo, a vermelho, e associado ao tecido conjuntivo, responsável pela organização estrutural das fibras musculares (Figuras 3.8 e 3.9).

3.5 Análise sensorial

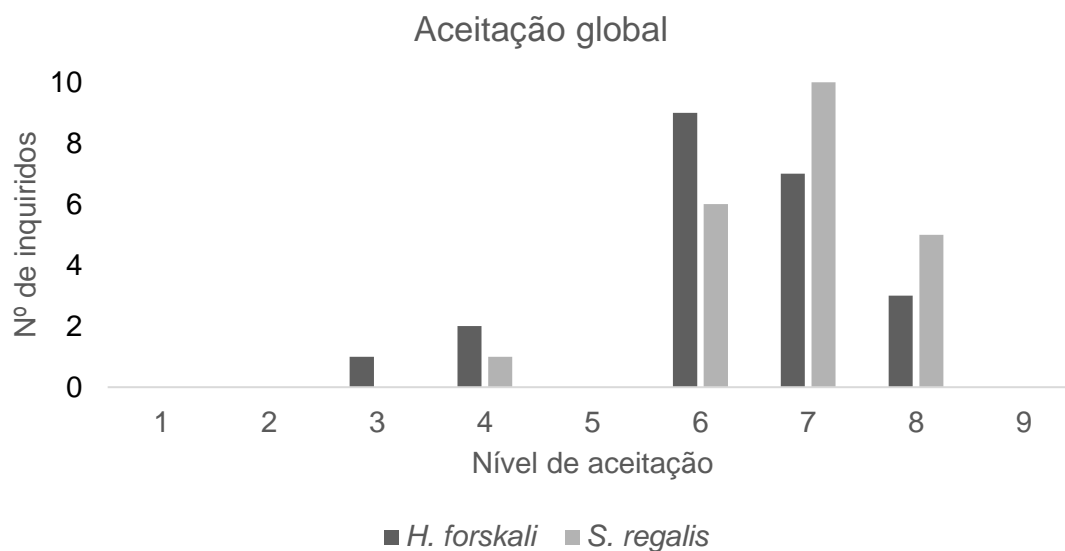
No intervalo de tempo compreendido entre a captura, o transporte, e a chegada à sala prática de cozinha da ESTM, não foi registada mortalidade ou sinais de *stress* fisiológico. Analisando os resultados para a espécie *S. regalis*, observa-se que todos os quatro atributos se revelaram mais elevados, comparativamente à espécie *H. forskali*. Porém, nos atributos sabor e odor, os valores revelaram-se bastante próximos comparando as duas espécies, destacando-se dos restantes com elevada pontuação (Tabela III).

Tabela III - Valores relativos à apreciação das espécies *H. forskali* e *S. regalis*, após confeção, por parte do painel de provadores participantes, contemplando os diferentes atributos de avaliação aplicados no decorrer da análise sensorial, apresentados na forma média \pm desvio padrão (SD).

<i>H. forskali</i>				
Atributo	Aparência	Textura	Sabor	Odor
	2,18 \pm 0,13	2,27 \pm 0,13	3,44 \pm 0,49	3,48 \pm 0,54
<i>S. regalis</i>				
Atributo	Aparência	Textura	Sabor	Odor
	3,25 \pm 0,03	2,94 \pm 0,39	3,61 \pm 0,27	3,62 \pm 0,41

No parâmetro da aceitação global apenas 5% dos provadores consideraram as duas espécies moderadamente desagradáveis. A espécie com maior aceitação global foi *S. regalis*, contudo, *H. forskali* foi considerada ligeiramente agradável por 40,9% dos provadores e muito agradável por 13,6% (Figura 3.10), verificando-se uma aceitação global bastante positiva, nas duas espécies. Quanto à aceitação global média (\pm SD) aferida para cada espécie, apurou-se um valor de 6,27 (\pm 1,28) para *H. forskali*, e de 6,82 (\pm 0,96) para *S. regalis*.

Relativamente à semelhança a outro produto do mar, os inquiridos responderam, na sua maioria, que as espécies *H. forskali* e *S. regalis* se assemelhavam, em termos de sabor e odor, a lula e a perceves. O sabor foi o atributo que mais agradou, nas duas espécies sujeitas a prova, contrariamente à textura, que desagradou a maioria dos provadores.



Nível 1 : Extremamente desagradável; Nível 5: Indiferente;

Nível 9: Extremamente Agradável

Figura 3.10 Representação gráfica relativa à aceitação global (%) das espécies *S. regalis* (n=20) e *H. forskali* (n=20) num painel de 22 provadores.

4. Discussão

A progressiva facilidade do transporte internacional é responsável pela crescente variedade de produtos disponíveis no mercado global, tendo conseqüentemente, ampliado a comercialização de pepino do mar. Contudo, estes organismos podem entrar em autólise após serem retirados da água do mar, sendo difícil preservá-los e transportá-los. Deste modo, mais de 80% dos pepinos do mar frescos capturados em todo o mundo são processados, resultando num produto desidratado, apesar da sua desidratação ser difícil, levando a que a deterioração possa ocorrer durante o processo. Atualmente, os métodos de secagem convencionais incluem salga, ebulição repetida, exposição a radiação solar durante 2 a 3 dias, e secagem com ar quente. Esta última provoca, muitas vezes, danos causados pelo calor, afetando negativamente a textura, cor, sabor, e valor nutricional do produto (Bai *et al.* 2012). Deste modo, o transporte *in vivo*, em condições ambientais controladas, parece ser uma melhor solução, independentemente de o destino final ser o consumo, repovoamento, ou mesmo o cultivo. No entanto, o transporte está, na grande maioria dos casos, associado a um estado de *stress* fisiológico, responsável por uma diminuição da condição física dos indivíduos, mais ou menos drástica, e conduzindo mesmo, em alguns casos, à mortalidade, de acordo com as condições praticadas. Minimizar o *stress* induzido pelo transporte aos espécimes de pepino do mar até às instalações aquícolas, é essencial para o sucesso do acondicionamento de reprodutores em aquacultura. Embora existam alguns estudos que indiquem que o transporte é uma etapa crítica para os animais marinhos, há pouca informação acerca dos melhores métodos de transporte de holotúrias (Purcell *et al.*, 2006). A monitorização das alterações comportamentais, lesões do tegumento, evisceração e taxa de sobrevivência ou mortalidade ocorrida, são usadas para avaliar o sucesso desta prática. Para alguns invertebrados, o transporte sobre uma superfície húmida causa menor *stress* do que simplesmente imersos em água, principalmente no que diz respeito a indivíduos nativos de habitats costeiros com substrato de areia, considerando-se que o transporte em superfície húmida poderia ter melhores resultados que o transporte em água (Xiyin *et al.*, 2004; Purcell *et al.*, 2006; Zamora & Jeffs, 2014).

No entanto, analisando os resultados apurados neste estudo para *H. forskali*, verifica-se que o transporte em superfície húmida é responsável por um aumento significativo de lesões físicas e evisceração, indicadores de *stress* fisiológico, em detrimento do transporte em imersão de água proveniente do habitat natural. Assim, no sentido de minimizar este impacto, é também importante compreender os efeitos da duração do transporte, uma vez

que esta etapa pode causar efeitos letais e subletais em invertebrados marinhos, consoante o intervalo de tempo nas condições praticadas seja maior ou menor, pelo que deve ser adequado à espécie a transportar. Verificou-se que os indivíduos da espécie *H. forskali* podem permanecer até 7 horas nas condições de transporte praticadas, sem consequências para a sua sobrevivência. Os resultados sugerem que nesta espécie, a presença de lesões no tegumento e a evisceração são indicadores mais sensíveis do sucesso do transporte, que as mudanças comportamentais e a sobrevivência (Zamora & Jeffs, 2014). O procedimento realizado no Método 1, foi considerado o melhor sistema de transporte, pois não se verificaram alterações do estado fisiológico dos indivíduos, mais especificamente, fenómenos de evisceração ou lesões no tegumento. De acordo com Purcell *et al.* (2006), a escolha correta do regime de temperatura e a sua monitorização durante o transporte, pode minimizar o *stress* associado ao mesmo, sugerindo que a adequada monitorização da temperatura durante o transporte realizado, em regime análogo ao do habitat natural aquando da captura dos espécimes, traria resultados ainda mais promissores no que diz respeito à resposta ao *stress* induzido por este método, evitando lesões no tegumento e evisceração, resultando na melhoria da condição física dos indivíduos. *H. forskali* demonstrou ser bastante resistente ao transporte, podendo este facto ser explicado pela localização do seu habitat natural, em grande parte, na zona intertidal, onde as condições ambientais oscilam com grande frequência (Takahashi & Sutherland, 2013).

Por outro lado, o transporte de *S. regalis* revelou-se bastante mais exigente no que diz respeito às condições praticadas, uma vez que os animais foram sujeitos a um elevado nível de *stress* associado ao método de captura e transporte ainda na embarcação, precedente ao ensaio de transporte realizado do porto de Peniche até ao Laboratório de Aquacultura do MARE-IPLeia. Deste modo, não foi utilizado qualquer tipo de substrato no decorrer do ensaio de transporte desta espécie, uma vez que poderia resultar num aumento significativo de lesões no tegumento dos indivíduos sujeitos a esta prática, já que é uma espécie que apresenta um tegumento bastante mais sensível à fricção pelo substrato. Ainda assim, verificaram-se lesões no tegumento em todos os indivíduos à chegada ao Laboratório, bem como 10% de mortalidade, ocorrida nos indivíduos em que não se verificava qualquer presença de tegumento. O severo *stress* fisiológico a que os organismos foram expostos, é explicado, em grande parte, por se tratar de uma espécie nativa de águas profundas (>50m), onde a temperatura se mantém praticamente constante, e por isso, sujeita a fracas oscilações, para além de bastante mais baixa comparativamente à temperatura medida à superfície, tratando-se, pois, de um fator

ambiental decisivo no acondicionamento desta espécie (Takahashi & Sutherland, 2013; Zamora & Jeffs, 2014; Santos *et al.*, 2015b).

H. forskali e *S. regalis* não tinham, até à realização deste estudo, sido sujeitas a qualquer tipo de acondicionamento em cativeiro, pelo que existia um total desconhecimento das condições de cultivo ótimas para estas espécies. Tendo em conta este facto, pode dizer-se que o acondicionamento ocorreu com grande sucesso, já que não houve qualquer registo de evisceração ou mortalidade ocorridas durante o período de acondicionamento, para além de que todos os animais amostrados regeneraram completamente as lesões provocadas pelo transporte. Para este facto, contribuíram as condições ambientais a que os espécimes estiveram sujeitos, sem a ocorrência de variações substanciais nos parâmetros físico-químicos da água (Takahashi & Sutherland, 2013), o mais próximos possível dos correspondentes ao habitat natural de cada uma das espécies, bem como a alimentação fornecida, e o substrato de areia adicionado aos tanques (Lavitra *et al.*, 2010), que se revelou essencial na redução do *stress* associado à manipulação (Robinson *et al.*, 2013), e para uma alimentação eficaz, acumulando matéria orgânica não aproveitada, mais concretamente, microalgas não filtradas pelos animais na coluna de água. De acordo com Robinson *et al.* (2013), verifica-se uma perda de peso bastante relevante em holotúrias acondicionadas em tanques com ausência de substrato, contrapondo os resultados positivos na presença do substrato arenoso (Watanabe *et al.*, 2012).

No presente estudo, esta evidência foi comprovada ainda através do comportamento dos indivíduos, que revolviam o fundo dos tanques com os seus tentáculos em forma de árvore, indiciando o comportamento alimentar, típico das espécies, bem como através da observação da presença de areia nas fezes aquando da sifonagem, o que sugere a ingestão de areia associada à matéria orgânica (Hammond, 1983). Pela primeira vez, foi observada a eficácia da existência de um substrato arenoso, comum ao habitat das duas espécies, no acondicionamento em regime intensivo e sistema RAS para as espécies *H. forskali* e *S. regalis*. Tratando-se de reprodutores, a dificuldade em manter o substrato em boas condições é diminuída, no entanto, visto que os animais se alimentavam da matéria orgânica acumulada no substrato, foi possível a sua preservação, facto verificado pela manutenção da qualidade da água aquando da medição diária dos parâmetros, mais especificamente, amónia, nitratos e nitritos (NH_3 , NH_4^+ e NO_2^-).

As diferenças verificadas entre os pesos dos indivíduos de *H. forskali* recém-capturados e após o acondicionamento podem ser explicadas pela variação da quantidade

de água na cavidade do corpo dos organismos. Desta forma, poderá haver variação do seu peso total, não sendo possível a sua quantificação, uma vez que a quantidade de água expulsa por cada indivíduo durante a manipulação inerente à pesagem é variável. Esta variação depende da quantidade de água no seu interior no momento da pesagem, do tamanho do corpo de cada espécime e do seu estado fisiológico. Por outro lado, os pesos dos indivíduos *S. regalis* antes e depois do acondicionamento não revelaram diferenças significativas, podendo justificar-se este facto, tal como para a *H. forskali*, pelas oscilações frequentes do peso total de cada indivíduo, provocadas pela contração muscular e consequente expulsão de água contida no interior da sua cavidade celómica (Prescott *et al.*, 2015).

No que diz respeito à alimentação, é recomendada a conjugação de duas a três espécies de microalgas à concentração de $1,5 \times 10^5$ células mL⁻¹ e na mesma proporção (Battaglione, 2002), pelo que, e com a pretensão de encontrar um melhor equilíbrio nutricional na alimentação durante o acondicionamento das duas espécies em estudo (Brown, 2002), conjugaram-se três espécies de microalgas: *I. galbana*, *Chlorella* sp. e *P. tricornutum*. Tendo em conta os resultados, pode dizer-se que a alimentação fornecida, não só supriu as necessidades nutricionais dos organismos, como incrementou a sua condição física, já que se verificou, de forma evidente, o aumento do teor proteico nas duas espécies.

Relativamente à histologia, e analisando as preparações contendo os cortes histológicos das bandas musculares de *H. forskali* e *S. regalis*, verifica-se que, nas preparações coradas com H&E, existe uma grande abundância em fibras musculares, também bastante evidentes no caso da coloração com Vermelho Picro-sirius, para além do colagénio, observável a vermelho, no caso das observações realizadas sob luz não polarizada, e ainda mais evidente no caso das observações sob luz polarizada, onde se confirma a sua presença, em toda a área corada, a vermelho, amarelo e verde, associado a vários tipos de tecido conjuntivo - endomísio, perimísio e epimísio -, dada a sua participação na organização estrutural das fibras musculares. De acordo com vários autores (Saito *et al.*, 2002; San Miguel-Ruiz, & García-Arrarás, 2007; Salarzadeh *et al.*, 2012), o colagénio é constituinte abundante da parte edível do pepino do mar, na qual está incluída a maioria das células musculares, apoiando, deste modo, as evidências encontradas. Assim, através do uso das duas colorações, foi possível verificar a abundante presença de células musculares envoltas em tecido conjuntivo, e colagénio, nas bandas musculares extraídas de exemplares de *H. forskali* e *S. regalis*, fundamentando os

resultados alcançados pela análise do teor proteico das duas espécies. Analisando as imagens recolhidas de cortes realizados a partir do músculo de indivíduos recém-capturados e após período de acondicionamento, pode dizer-se que não foram verificadas diferenças aparentes entre os dois grupos, no que diz respeito à organização muscular e densidade do tecido analisado, quer para *H. forskali*, quer para *S. regalis*.

No que diz respeito às espécies escolhidas para este estudo, revelaram-se adequadas para consumo humano, pois os teores de proteína presentes são bastante satisfatórios, relativamente às necessidades nutricionais do ser humano, sendo que a proteína desempenha um papel importante no crescimento e saúde física e mental, vigor e longevidade. Por outro lado, má nutrição proteica resulta em baixa estatura, atrasos no desenvolvimento, anemia e outros problemas de saúde, que podem ocorrer quer no útero, quer após o nascimento (Wu *et al.*, 2014). Atualmente, cerca de um bilião de pessoas em todo o mundo têm uma ingestão inadequada e crónica de proteína, incluindo 165 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade com desenvolvimento anormal. Evidências recentes demonstraram que o consumo adequado de proteína, particularmente a proteína obtida a partir de produtos de origem animal, podem atrasar o processo de envelhecimento em adultos, para além de que o aumento da ingestão de proteína de alta qualidade pode aliviar a perda progressiva do músculo esquelético (sarcopenia) em indivíduos idosos (Wu *et al.*, 2014). Com o evidente incremento do consumo de proteína *per capita*, estima-se que o seu consumo aumente cerca de 72% entre 2013 e 2050, suscitando preocupação no que diz respeito à sustentabilidade e aos impactos ambientais da sua produção. Deste modo, torna-se cada vez mais urgente encontrar soluções sustentáveis de produção animal, que contemplem simultaneamente a qualidade dos produtos (FAO, 2013). O pepino do mar parece preencher os requisitos de sustentabilidade, já que o teor de proteína presente no pepino do mar após secagem, ultrapassa os 50% em espécies edíveis. Por outro lado, o conteúdo de glicosaminoglicano apurado em estudos recentes (Santos *et al.*, 2015b), evidencia o valor terapêutico do pepino do mar, chegando mesmo a ser usado como alimento tónico para o organismo, pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas. O perfil de aminoácidos, especialmente de aminoácidos essenciais, e a presença de micronutrientes, faz do pepino do mar um alimento bastante saudável (Chen, 2003, 2004; Hu *et al.* 2010; Sicuro & Levine, 2011). Deste modo, é fácil compreender a dimensão do mercado global deste produto do mar, devendo-se, principalmente, ao facto de ser um alimento de excelência do ponto de vista nutricional, chegando a uma concentração proteica de 83%, na sua forma seca, em que é vulgarmente comercializado (Pangkey *et al.* 2012).

Comparando os resultados obtidos para o teor proteico em espécies de holotúrias estudadas anteriormente, *Holothuria mammata*, *Holothuria polii*, *Holothuria parva*, *Holothuria tubulosa* e *Holothuria arenicola*, com os obtidos neste estudo, apenas *H. parva* e *H. arenicola* apresentaram maior teor proteico na sua composição corporal (17,6% - 24,4%) do que *H. forskali* e *S. regalis* (9,1% - 12,3%), no estado selvagem. Fazendo-se a mesma comparação, com os indivíduos *H. forskali* e *S. regalis* após acondicionamento, verifica-se uma ligeira subida nos valores do teor proteico das duas espécies, no entanto, não ultrapassando, da mesma forma, os valores verificados para *H. parva* e *H. arenicola*. Todas as demais espécies apresentaram um menor nível proteico, com valores entre 8,8% (*H. tubulosa*) e 7,9% (*H. mammata*) (Aydin *et al.*, 2011; Salarzadeh *et al.*, 2012). Por outro lado, alterações na condição física dos indivíduos, tal como a época reprodutiva ou a fase de regeneração dos órgãos, podem influenciar o teor de proteína presente no músculo, sofrendo alterações (Goulas e Kontominas, 2007). Do ponto de vista nutricional, o pepino do mar é um alimento de excelência, pois contém elevados níveis de proteína comparativamente a outros alimentos, podendo ser utilizado, por exemplo, de acordo com Piccinno *et al.* (2013), como substituto da farinha de peixe nas formulações comerciais de rações, embora seja uma fonte de proteína de alto valor comercial, sendo possível encontrar outras fontes proteicas mais acessíveis para esta prática.

A aceitação global verificada quer para *H. forskali*, quer para *S. regalis*, foi bastante positiva, tendo em conta que os pratos confeccionados não foram sujeitos a qualquer ensaio prévio, e que não existe tradição no consumo deste recurso marinho, em Portugal. Tendo em conta os resultados de aceitabilidade deste estudo e o já conhecido teor proteico de *S. regalis* e *H. forskali*, pode considerar-se que constituem um alimento de excelente qualidade, dado que, para além do elevado teor proteico, possuem ainda valores elevados de ácidos gordos essenciais, sem comprometer o seu baixo conteúdo lipídico (Sanchez-Brambila *et al.*, 2002; Meilgaard *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2007; Salarzadeh *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015 a, b).

5. Conclusão

O estudo realizado indica que o transporte de *H. forskali* e *S. regalis* é viável, embora *S. regalis* apresente maior sensibilidade à manipulação decorrente desta prática, enquanto *H. forskali* resiste em condições fisiológicas favoráveis durante um maior período de tempo.

O acondicionamento de *H. forskali* e de *S. regalis* permitiu alcançar a sobrevivência e boa manutenção das holotúrias em cativeiro, para além de ter evidenciado resultados promissores relativamente ao teor proteico, revelando-se acima dos valores determinados em indivíduos selvagens, ou recentemente capturados. Contudo, são necessários mais estudos a incidir sobre estas duas espécies, de forma a encontrar dietas que permitam aumentar de forma mais significativa o teor proteico contido no músculo, no decorrer do acondicionamento, e conseqüentemente, a condição física dos indivíduos acondicionados, bem como a maturação das gónadas, com vista à reprodução em aquacultura.

O presente trabalho demonstrou que o acondicionamento das espécies *H. forskali* e *S. regalis* em cativeiro é praticável. O desenvolvimento de todas as etapas do ciclo de vida em condições de cultivo pode proporcionar assim, uma alternativa à pesca, ou uma forma de manter a sustentabilidade destes recursos no meio natural e, eventualmente, contribuir para o repovoamento das populações naturais, em casos de sobre-pesca ou flagelos ambientais.

Os pepinos do mar das espécies em estudo são um produto do mar com elevada aceitabilidade por parte da população portuguesa, nomeadamente no que diz respeito aos atributos sabor e odor, podendo concluir-se que a sua inclusão na dieta mediterrânica seria facilitada num futuro próximo.

6. Perspetivas Futuras

Atualmente, o consumo de pepino do mar no Ocidente é bastante escasso, pelo que a aposta na divulgação e promoção deste produto do mar tão nutricionalmente rico (Santos *et al.*, 2015a) é essencial.

O desenvolvimento da produção em aquacultura de *H. forskali* e *S. regalis*, com a criação de programas de incentivo, seria muito interessante, pois dada a versatilidade demonstrada por outras espécies (Yokoyama, 2013; Zamora *et al.*, 2016), poderia ser tentada a produção em monocultivo, policultivo ou em aquacultura integrada multi-trófica.

Ainda no que diz respeito ao direcionamento destas espécies para consumo humano, seria interessante realizar a análise do teor lipídico, ácidos gordos essenciais e em hidratos de carbono presentes em *H. forskali* e *S. regalis* pré e pós-acondicionamento, verificando deste modo, se os teores após acondicionamento se alteram, relacionando-os, simultaneamente, com diferentes dietas fornecidas, e verificando que impacto teriam nestes teores.

Avaliar o teor proteico das espécies estudadas, fornecendo diferentes dietas, traria concerteza mais-valias relativamente às necessidades nutricionais de *H. forskali* e *S. regalis*, com vista à sua produção em aquacultura, traduzindo-se na rentabilidade dos recursos.

7. Referências Bibliográficas

Allan, G., & Burnell, G. (Eds.). (2013). *Advances in aquaculture hatchery technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Number 242.

Anderson, S.C., Mills Flemming, J., Watson, R., Lotze, H.K. and Bograd, S.J. (2011a). Rapid global expansion of invertebrate fisheries: trends, drivers, and ecosystem effects. *PLoS ONE* 6, e14735.

Anderson, S.C., Flemming, J.M., Watson, R. and Lotze, H.K. (2011b). Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries* 12, 317–339 pp.

Aydın, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y., & Köse, S. (2011). Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International journal of food science & technology*, 46(3), 500-508 pp.

Bai, Y., Yang, Y. and Huang, Q. (2012). Combined electrohydrodynamic (EHD) and vacuum freeze drying of sea cucumber. *Drying Technology*, 30:10, 1051-1055 pp.

Battaglione, S. C., Seymour, J. E., Ramofafia, C. and Lane, I. (2002). Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. *Aquaculture*, 207:1, 29-47pp.

Bell, J. D., Agudo, N. N., Purcell, S. W., Blazer, P., Simutoga, M., Pham, D., & Della Patrona, L. (2007). Grow-out of sandfish *Holothuria scabra* in ponds shows that co-culture with shrimp *Litopenaeus stylirostris* is not viable. *Aquaculture*, 273(4), 509-519 pp.

Brown, M. R., (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G. and Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Bruckner, A. W. (2006). Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae, 1-3 March 2004, Kuala Lumpur, Malaysia.

Campbell, A. (2006). *Fauna e Flora do Litoral de Portugal e da Europa*. Guias Fapas, 245p.

Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 18: 18-23 pp.

Chen, J. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In: *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO, Rome, Fisheries Technical Paper (ed. by A. Lovatelli, & C. Conand), Food & Agriculture Organization 463: 25-38 pp.

Domínguez-Godino, J. A., Slater, M. J., Hannon, C., & González-Wangüermert, M. (2015). A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture*, 438, 122-128.

Duan, X., Zhang, M., & Mujumdar, A. S. (2007). Study on a combination drying technique of sea cucumber. *Drying Technology*, 25(12), 2011-2019.

Eeckhaut, I., Lavitra, T., Léonet, A., Jangoux, M., & Rasolofonirina, R. (2012). In-vitro fertilisation: a simple, efficient method for obtaining sea cucumber larvae year round. *Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture*, 136, 40-49.

FAO. (2013). *Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

FAO. (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 223 p.

FAO. (2015). *FAO Aquaculture Newsletter n° 53*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 55-57 pp.

FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.

Ferreira, P. M. P. (2009). *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*. Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I. P., IPIMAR, 235 p.

Giraspy, D.A.B. & Ivy, G. (2008). The influence of commercial diets on growth and survival in the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. *versicolor* (Conand, 1986), (Echinodermata: Holothuroidea). *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 28: 46-51 pp.

Giraspy, D. A. B. & Walsalam, I. G. (2010). Aquaculture potential of the tropical sea cucumbers *Holothuria scabra* and *Holothuria lessoni* in the Indo-Pacific region. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 30, 29-32 pp.

Goulas, A. E. & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes, *Food Chemistry*, Vol. 100: 1, 287-296 pp.

Hammond, L. S. (1983). Nutrition of deposit-feeding holothuroids and echinoids (Echinodermata) from a shallow reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 10(3), 297-305.

Han, Q., Keesing, J. K., & Liu, D. (2016). A review of sea cucumber aquaculture, ranching, and stock enhancement in China. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 326-341.

Hu, C., Xu, Y., Wen, J., Zhang, L., Fan, S. and Su, T. (2010). Larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus* sp. (Curry fish). *Aquaculture*, 300(1): 73-79 pp.

Junqueira, L. C. U., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 11(4), 447-455 pp.

Kjeldahl J. (1883). A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. *Z. Anal. Chem.* 22: 366.

Kumara, P. A., Jayanatha, J., Pushpakumara, J., Bandara, W., & Dissanayake, D. C. T. (2013). Artificial breeding and larval rearing of three tropical sea cucumber species—

Holothuria scabra, *Pseudocolochirus violaceus* and *Colochirus quadrangularis*—in Sri Lanka. SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin, 33, 30-37.

Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., & Changotade, S. (2014). Picrosirius red staining a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 751-758.

Lavitra, T., Rasolofonirina, R., & Eeckhaut, I. (2010). The effect of sediment quality and stocking density on survival and growth of the sea cucumber *Holothuria scabra* reared in nursery ponds and sea pens. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 9(2), 153-164.

Lawrence, A. J., Ahmed, M., Hanafy, M., Gabr, H., Ibrahim, A. and Gab-Alla, A. A. F. A. (2004). Status of the sea cucumber fishery in the Red Sea, the Egyptian experience. In: *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO, Rome, Fisheries Technical Paper (ed. by A. Lovatelli, & C. Conand), Food & Agriculture Organization 463: 79-90 pp.

Meilgaard, M., G. Civille, e B. Carr. (2006). *Sensory Evaluation Techniques*, 4^a ed., CRC Press, LLC., Boca Raton, Florida, EUA, 448p.

Merino, G., Barange, M., Blanchard, J. L., Harle, J., Holmes, R., Allen, I., Allison, E. H., Badjeck, M. C., Dulvy, N. K., Holt, J., Jennings, S., Mullon, C. & Rodwell, L. D. (2012). Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate? *Global Environmental Change*, 22(4), 795-806.

Özer, N. P., Mol, S., & Varlık, C. (2004). Effect of the handling procedures on the chemical composition of sea cucumber. *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 4(2).

Pangkey, H., Lantu, S., Manuand, L. and Mokolensang, J. (2012). Prospect of sea cucumber culture in Indonesia as potential food sources. *Journal of Coastal Development*, 15:2, 114-124 pp.

Pauly, D., Christensen, V., Guénette, S., Pitcher, T. J., Sumaila, U. R., Walters, C. J., Watson, R. & Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, 418(6898), 689-695.

Piccinno M., R. Schiavone, L. Zilli, B. Sicuro, C. Storelli, and S. Vilella. 2013. Sea Cucumber Meal as Alternative Protein Source to Fishmeal in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Nutrition: Effects on Growth and Welfare. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 305-313 pp.

Pires, M., Travassos F. S., Gärtner, F. (2004). *Atlas de Patologia Veterinária*, Lidel, Porto, 157-171 pp.

Poh-Sze, P. (2004). Fisheries, trade and utilization of sea cucumbers in Malaysia. In: *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO, Rome, Fisheries Technical Paper (ed. by A. Lovatelli, & C. Conand), Food & Agriculture Organization 463: 57-68 pp.

Prescott, J., Zhou, S., & Prasetyo, A. P. (2015). Soft bodies make estimation hard: correlations among body dimensions and weights of multiple species of sea cucumbers. *Marine and Freshwater Research*, 66(10), 857-865.

Purcell, S. W., Blockmans, B. F. and Agudo, N. N. S. (2006). Transportation methods for restocking of juvenile sea cucumber, *Holothuria scabra*. *Aquaculture* 251, 238 – 244 pp.

Purcell, S. W., Hair, C. A., & Mills, D. J. (2012a). Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: Progress, problems and opportunities. *Aquaculture*, 368, 68-81 pp.

Purcell, S. W., Samyn, Y., & Conand, C. (2012b). Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6*. FAO, Rome. 223p.

Purcell, S. W.; Mercier, A.; Conand, C.; Hamel, J. F.; Toral-Granda, M. V.; Lovatelli, A.; Uthicke, S. (2013). Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish and Fisheries* 14: 34–59 pp.

Ramón, M., Lleonart, J. and Massutí, E. (2010). Royal Cucumber (*Stichopus regalis*) in the Northwestern Mediterranean: Distribution Pattern and Fishery. *Fisheries Research*, 105, 21-27 pp.

Robinson, G., Slater, M. J., Jones, C. L.W. and Stead, S. M. (2013). Role of sand as substrate and dietary component for juvenile sea cucumber *Holothuria scabra*, *Aquaculture*, Vol. 392–395, 23-25 pp.

Salarzadeh, A., Afkhami, M., Bastami, K. D., Ehsanpour, M., Khazaali, A., & Mokhleci, A. (2012). Proximate composition of two sea cucumber species *Holothuria parva* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf. *Annals of Biological Research*, 3(3), 1305-1311pp.

Saldanha, L. (2003). *Fauna Submarina Atlântica: Portugal continental, Açores e Madeira*. Publicações Europa-América. Portugal 224p.

Sanchez-Brambila, G.Y., Lyon, B.G., Huang, Y.W., Lyon, C.E. and Gates, K.W. (2002). Sensory Characteristics and Instrumental Texture Attributes of Abalones, *Haliotis Fulgens* and *Cracherodii*. *Journal of Food Science*, Vol. 67, Nr. 3, 1233 – 1239 pp.

San Miguel-Ruiz, J. E., & García-Arrarás, J. E. (2007). Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC developmental biology*, 7(1), 1.

Santos, R.; Dias, S.; Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Tecelão, C.; Pedrosa, R.; Pombo, A. (2015a). Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. *Aquaculture Research* 1–17 pp.

Santos, R., Dias, S., Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Tecelão, C., Pombo, A. and Pedrosa, R. (2015b). The Biotechnological and Seafood Potential of *Stichopus regalis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, 194-204 pp.

Sicuro, B. & Levine, J. (2011). Sea Cucumber in the Mediterranean: A Potential Species for Aquaculture in the Mediterranean. *Reviews in Fisheries Science* 19(3): 299-304 pp.

Singh, R., MacDonald, B. A., Thomas, M. L. and Lawton, P. (1999). Patterns of seasonal and tidal feeding activity in the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Bay of Fundy, Canada. *Marine ecology. Progress series*, 187: 133-145 pp.

Takahashi T. & Sutherland S.C. (2013). Climatological Mean Distribution Of pH And Carbonate Ion Concentration in Global Ocean Surface Waters in the Unified pH Scale and Mean Rate of their Changes in Selected Areas. Final report submitted to the National Science Foundation, Washington, D. C. for Grant: OCE 10-38891.

Toral-Granda, V., Lovatelli, A. and Vasconcellos, M. (2008). Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, (516).

Tuwo, A., & Conand, C. (1992). Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 72(04), 745-758.

Uthicke, S., Conand C. and Benzie, J.A.H. (2003). Population genetics of the fissiparous holothurians *Stichopus chloronotus* and *Holothuria atra* (Aspidocheirotida): A comparison between Torres Strait and La Reunion. Mar. Biol., 139:257-265 pp.

Vannuccini, S. (2004). Sea Cucumbers: A Compendium of Fishery Statistics. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.F. and Mercier, A., Eds., Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management, FAO, Rome, Fisheries Technical Paper, 339-345 pp.

Watanabe, S., Kodama, M., Zarate, J. M., Lebata-Ramos, M. J., & Nievaes, M. F. (2012). Ability of sandfish (*Holothuria scabra*) to utilise organic matter in black tiger shrimp ponds. Asia-Pacific Tropical Sea Cucumber Aquaculture, ACIAR Proceedings, 136, 113-120.

Wu, Z., Chen, H., Wang, W., Jia, B., Yang, T., Zhao, Z. and Xiao, X. (2009). Differentiation of dried sea cucumber products from different geographical areas by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 57:20, pp. 9356-9364.

Wu, G., Bazer, F. W., and Cross, H. R. (2014). Land-based production of animal protein: impacts, efficiency, and sustainability. Annals of the New York Academy of Sciences, 1328:1, pp. 18-28.

Xiyin, L., Guanghui, Z., Qiang, Z., Liang, W. and Benxue, G. (2004). Studies on hatchery techniques of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO. 425p.

Yang H., Hamel J-F. & Mercier A. (2015). The Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*. History, Biology and Aquaculture. Academic Press (Elsevier), Salt Lake City, UT, 437 pp.

Yokoyama, H. (2013). Growth and food source of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* cultured below fish cages—potential for integrated multi-trophic aquaculture. Aquaculture, 372, 28-38.

Zamora, L. N., & Jeffs, A. G. (2014). Evaluation of transportation methods of juveniles of the Australasian sea cucumber, *Australostichopus mollis*. Aquaculture Research, 46(10), 2431-2442pp.

Zhong, Y., Khan, M. A., & Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4), 1188-1192pp.

Zamora, L. N., Yuan, X., Carton, A. G., & Slater, M. J. (2016). Role of deposit-feeding sea cucumbers in integrated multitrophic aquaculture: progress, problems, potential and future challenges. *Reviews in Aquaculture*.

8. Anexos

Anexo I

Processamento de Amostras

1. Fixação

- Fixador: formol tamponado a 10%.
- As amostras permanecem imersas no fixador durante 2 dias.
- Após a fixação, são colocadas em cassetes individuais, imediatamente antes do processamento.

2. Desidratação e Inclusão em Parafina

O processamento dos tecidos ocorre de modo automático, num equipamento específico, e assenta em várias fases:

- Desidratação dos tecidos, fazendo-os imergir em concentrações crescentes de álcoois;
- Aclaramento em xilol;
- Inclusão em parafina.

Os tempos de processamento são definidos tendo em conta as dimensões das amostras analisadas. No presente estudo, a sequência de processamento utilizada foi a seguinte:

1 - Álcool a 30%	2 a 4 horas
2 - Álcool a 50%	2 a 4 horas
3 - Álcool a 70%	2 a 4 horas
4 - Álcool a 96%	2 a 4 horas
5 - Álcool a 100%	4 a 6 horas
6 - Álcool a 100%	6 a 8 horas
7 - Xilol I	4 horas
8 - Xilol II (50% xilol + 50% parafina estufa 58°-60°)	10 horas
9 - Parafina líquida	12 a 18 horas

Após a inclusão de parafina líquida nos tecidos, as amostras são novamente integradas em parafina, formando blocos individuais, por meio de um dispensador de parafina sob uma placa aquecida, procedimento após o qual os blocos concluídos são reservados até à secagem completa, para posterior corte.

3. Cortes Histológicos

Os blocos de parafina são cortados em finas secções, no micrótomo, com uma espessura entre 0,5 e 10 μm , sendo que um bom corte histológico deve ter uma espessura entre 3 e 5 μm , para ser mais facilmente atravessado pela luz. As finas secções são colocadas individualmente, em lâminas limpas e sobre água destilada, de modo a que fiquem perfeitamente distendidas sobre a lâmina, e após aspiração da água em excesso, são introduzidos em estufa a 37°C. Posteriormente à secagem em estufa, com a duração aproximada de 48 horas, procede-se à coloração pretendida.

Anexo II

Coloração com H&E

Desparafinação e Re-hidratação I:

1 – Histolemon I	5 minutos
2 – Histolemon II	5 minutos
3 - Álcool a 100%	5 minutos
4 - Álcool a 100%	5 minutos
5 - Álcool a 85%	5 minutos
6 - Álcool a 70%	5 minutos
7 - Álcool a 50%	5 minutos
8 - Água destilada	5 minutos
9 - Hematoxilina de Harris	5 minutos
10 – Eosina	3 minutos

Desidratação I:

11 - Álcool a 70%	1 minuto
12 - Álcool a 85%	1 minuto
13 - Álcool a 100%	1 minuto
14 - Álcool a 100%	1 minuto
15 - Histolemon I	5 minutos
16 - Histolemon II	5 minutos

Anexo III

Coloração Vermelho Picro-Sírius variante Puchtler's

1 - Histolemon I	15 minutos
2 - Histolemon II	15 minutos
3 - Álcool a 100%	5 minutos
4 - Álcool a 100%	5 minutos
5 - Álcool a 85%	5 minutos
6 - Álcool a 85%	5 minutos
7 - Álcool a 70%	5 minutos
8 - Água destilada	10 minutos
9 – Solução Picro-Sírius ¹⁾	1 hora e 15 minutos
10 – Lavar 2 a 3 vezes com solução de ácido acético ³⁾	passagem rápida
11 - Álcool a 70%	passagem rápida
12 - Álcool a 85%	passagem rápida
13 - Álcool a 85%	5 minutos
14 - Álcool a 100%	5 minutos
15 - Álcool a 100%	5 minutos
16 - Histolemon I	15 minutos
17 - Histolemon II	15 minutos

¹⁾ Solução Picro-Sírius

0,5g de vermelho sírio

500mL de ácido pícrico aquoso saturado²⁾

²⁾ Solução de ácido pícrico aquoso saturada

2 partes de ácido pícrico à saturação em álcool a 96%

1 parte de álcool a 96%

³⁾ Água com ácido acético

5mL de ácido acético glacial

1L de água destilada

Anexo IV



Caracterização Sensorial de um Produto do Mar Pioneiro na Dieta Ocidental: Pepino do Mar

1 - Como foi confeccionada a amostra (cozido, salteado, grelhado, assado)?

2 - Caracterizar o perfil sensorial, referente aos atributos sugeridos:

- a) Por favor lave a boca com água antes de iniciar a prova;
- b) Avalie a amostra disponível no seu tabuleiro de prova e assinale na tabela 1, 2 e 3, qual a intensidade atribuída a cada um dos atributos considerados (1 – Extremamente desagradável; 2 – Moderadamente desagradável; 3 – Indiferente; 4 – Moderadamente agradável; 5 – Extremamente agradável).

Tabela I

Aparência	1	2	3	4	5
Exterior					
Interior após o corte					

Tabela II

Textura	1	2	3	4	5
Facilidade ao corte					
Dureza					
Suculência					

Tabela III

Sabor	1	2	3	4	5
Sabor a produtos do mar					
Sabor a condimentos/especiarias					
Odor	1	2	3	4	5
Odor a produtos do mar					
Odor a condimentos/especiarias					
Persistência do flavor na boca					

3 – Ainda relativamente ao sabor, qual o produto do mar que, no seu entender, se assemelha mais à amostra em questão?

- Mexilhão Polvo Lula Bacalhau
 Outro
-

4 – No que diz respeito ao odor, qual o produto do mar que, no seu entender, se assemelha mais à amostra em questão?

- Mexilhão Polvo Lula Bacalhau
 Outro
-

5 – Considerando o conjunto de todos os atributos (aparência, textura, sabor,...)

- a) Indique por favor a sua opinião sobre a Aceitação Global (satisfação) da amostra, assinalando apenas uma opção com (X):

Extremamente desagradável	
Muito desagradável	
Moderadamente desagradável	
Ligeiramente desagradável	
Indiferente	
Ligeiramente agradável	
Moderadamente agradável	
Muito agradável	
Extremamente agradável	

- b) Indique, por favor, o que lhe agradou e desagradou na amostra em estudo, utilizando apenas uma palavra por linha e não frase:

Agradou	Desagradou

Após terminar a prova, certifique-se que deixa o local de prova limpo.
Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a prova.

Obrigada pela sua colaboração!

Anexo V

Publicações resultantes desta tese e de trabalhos relacionados:

Artigos científicos:

Pratas, D., **Santos, F.**, Dias, S., Rodrigues, V., Couto, M., Santos, R., Baptista, T. & Pombo, A. (2017). Development of techniques for gender identification in *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) from Peniche coast (Portugal). SPC Bêche-de-mer Information Bulletin. (Accepted December 2016).

Comunicações orais:

- a. Pombo A, **Santos F**, Pratas D and Baptista T (2015). Sea cucumbers aquaculture, protein evaluation of broodstock conditioning. Fenacam & Lacqua/Sara (WAS)'15. November 16-19. Fortaleza, Brasil.
- b. Pombo A, **Santos F**, Pratas D, Dias S, Santos R, Baptista T (2015). Sea cucumbers: broodstock collection and economic valuation of fisheries rejects. Preliminary Results. Aquaculture Europe 2015. October 20-23, Rotterdam, Netherlands.

Comunicações em painel:

1. Pratas DV, **Santos FP**, Baptista T & Pombo A (2014). Sea Cucumber: New source of Protein for Human Consumption. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014. doi: 10.3389/conf.FMARS.2014.02.00124
2. **Santos FP**, Pratas DV, Baptista T & Pombo A (2014). Sex Determination in Sea Cucumbers: *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014. doi: 10.3389/conf.FMARS.2014.02.00145

3. Pratas D, **Santos F**, Baptista T & Pombo A (2014). Sea cucumber: new source of protein and fatty acids for human consumption. Aquaculture Europe 2014, October 14-17. Donostia–San Sebastián, Spain.
4. **Santos F**, Pratas D, Baptista T, Pombo A (2014). Aquaculture potencial of sea cucumber *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*, a reproductive biology approach. Aquaculture Europe 2014, October 14-17, 2014. Donostia–San Sebastián, Spain.
5. Pombo A, **Pinheiro F**, Pratas D e Baptista T (2015). Aceitação sensorial de pepinos do mar acondicionados em sistema RAS. Actas Del XV Congreso Nacional Y I Congreso Iberico De Acuicultura. October 13-16, Huelva, Spain.
6. Pombo A., **Santos F.**, Pratas D., Dias S., Santos R. and Baptista T. Sea cucumbers: broodstock collection and economic valuation of fisheries rejects. Preliminar results. Aquaculture Europe 2015. October 20-23, Rotterdam, Netherlands.
7. Pombo A, Pratas D, **Santos F**, Morais H, Baptista T (2015). Transportation methods of sea cucumber broodstock, *Holothuria forskali*. Aquaculture Europe 2015. October 20-23, Rotterdam, Netherlands.