

**Produção de lapas da espécie *Patella depressa* (Pennant, 1777)  
em cativeiro**

Cristiana Filipa Correia Rainho

**Produção de lapas da espécie *Patella depressa* (Pennant, 1777)  
em cativeiro**

Cristiana Filipa Correia Rainho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

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



Produção de lapas da espécie *Patella depressa* (Pennant, 1777) em cativeiro

Copyright © Cristiana Filipa Correia Rainho

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria, 2025

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**

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores, Professora Especialista Teresa Baptista e Doutor Paulo Maranhão, pela orientação, sabedoria e disponibilidade constantes, essenciais para a concretização deste trabalho.

Em segundo, um especial obrigado à minha amiga e colega de curso Beatriz Duarte, por toda a ajuda e apoio imprescindíveis durante este último ano, em especial à disponibilidade e paciência para as apanhas frequentes de lapas.

Quero também expressar gratidão ao meu namorado, João Novais, pelo apoio incondicional, incentivo e motivação constante ao longo desta etapa importante do meu percurso académico que foram essenciais para superar todos os desafios encarados.

Por fim, agradeço à minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio essencial e incondicional durante todo o meu percurso académico. Este trabalho não teria sido possível sem o vosso suporte.

## Resumo

A reprodução e cultivo larvar de *Patella depressa* em laboratório é limitada pelo conhecimento insuficiente desta espécie. Visando otimizar o protocolo experimental, foram realizados pré-ensaios para determinar o método de maturação de oócitos mais eficiente (água salgada ou banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), tipo de água mais indicada (Furo ou Docapesca), intervalo ideal entre o início da fecundação e avaliação da respectiva taxa (3 e 4 horas) e temperatura de incubação ideal (16 e 18°C). Os resultados obtidos nos pré-ensaios permitiram definir banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  como método mais eficiente de maturação de oócitos, água da Docapesca como mais adequada à reprodução, e ainda que a taxa de fertilização deve ser calculada 3 horas pós fertilização e que a reprodução deve ocorrer a 16°C.

Nos ensaios principais, avaliou-se a concentração de oócitos inicial (100 e 200 oócitos/ml) e regime de alimentação (Sem Alimentação e Com Alimentação) sobre a taxa de fertilização, eclosão e sobrevivência larvar. Adicionalmente, avaliou-se o potencial de utilizar biofilmes de *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* e biofilme resultante de tanques de cultivo de pepinos do mar como substratos de assentamento. Com os resultados obtidos foi possível determinar que a concentração de oócitos inicial com melhores resultados foi 100 oócitos/ml e que a alimentação na fase inicial de desenvolvimento de larvas mostrou ser desnecessária. Nenhum dos biofilmes escolhidos promoveu o assentamento larvar.

Estes resultados fornecem informações fundamentais ao desenvolvimento de protocolos de reprodução de *P. depressa*, mas deixam ainda algumas lacunas por preencher.

**Palavras-chave:** Assentamento; Cultivo Larvar; Lapas; *Patella depressa*; Reprodução.

## **Abstract**

The reproduction and larval development of *Patella depressa* larvae in the laboratory conditions is limited due to insufficient knowledge of this species. To optimize the experimental protocol, pre-tests were conducted to determine the most efficient method for oocyte maturation (salt water or an alkaline bath with  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), the most suitable water type (Furo or Docapesca), the ideal interval between the start of fertilization and the evaluation of the respective rate (3 and 4 hours) and the ideal incubation temperature (16 and 18°C).

In the main trials, the effect of initial oocyte concentrations (100 and 200 oocytes/ml) and feeding regime (Without Feeding and With Feeding) were evaluated on the rate of fertilization, hatching and larval survival. The potential of using *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* biofilms, and biofilms resulting from sea cucumber culture tanks as settlement substrates was also evaluated.

The results obtained made it possible to determine that the initial oocyte concentration with the best suited for reproduction of *P. depressa* was 100 oocytes/ml, and feeding during the early larval development phase was shown to be unnecessary. None of the selected biofilms promoted larval settlement. These results provide fundamental information for the development of *P. depressa* breeding protocols but leave gaps in knowledge to be filled.

**Keywords:** Larval rearing; Limpets; *Patella depressa*; Reproduction; Settlement.



# ÍNDICE

1. Introdução .....	1
1.1. Biologia e morfologia .....	1
1.2. Distribuição e ecologia.....	3
1.3. Reprodução .....	5
1.4. Mercado global .....	7
1.5. Aquacultura .....	7
1.6. Objetivos .....	9
2. Metodologia Experimental.....	10
2.1. Organização geral dos ensaios.....	10
2.1.1. Recolha e identificação de lapas.....	12
2.1.2. Extração e classificação das gónadas .....	13
2.2. Pré-ensaios .....	14
2.2.1. Pré-ensaios 1 a 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos e reprodução .....	15
2.2.1.1. Pré-ensaios 1 e 2: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos .....	15
2.2.1.2. Pré-ensaio 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a reprodução.....	18
2.2.2. Resultados dos pré-ensaios 1 a 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos e reprodução .....	22
2.2.2.1. Pré-ensaios 1 e 2: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos .....	22
2.2.2.2. Pré-ensaio 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a reprodução .....	23
2.2.3. Pré-ensaios 4 a 6: Água, temperatura e tempo de fertilização ideal à reprodução e desenvolvimento larvar.....	25
2.2.4. Resultados dos pré-ensaios 4 a 6: Água, temperatura e tempo de fertilização ideal à reprodução e desenvolvimento larvar .....	30
2.3. Ensaios.....	36

2.3.1. Ensaio E1: Efeito da concentração de oócitos inicial e alimentação às 48 horas pós fertilização .....	36
2.3.2. Ensaio E2: Assentamento larvar em diferentes biofilmes.....	40
2.4. Cultivos auxiliares.....	44
2.4.1. <i>Scale Up</i> de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	44
2.4.2. Biofilmes .....	45
2.4.2.1. Biofilmes com <i>Phaeodactylum tricornutum</i> e <i>Tetraselmis suecica</i> .....	46
2.4.2.2. Biofilmes em tanque de <i>Holothuria sp.</i> .....	47
2.5. Análise estatística.....	47
3. Resultados .....	49
3.1. Ensaio E1: Efeito da concentração de oócitos inicial e alimentação às 48 horas pós fertilização .....	49
3.2. Ensaio E2: Assentamento larvar em diferentes biofilmes.....	51
4. Discussão .....	52
4.1. Pré-ensaios .....	52
4.1.1. Resultados dos pré-ensaios 1 a 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos e reprodução .....	52
4.1.2. Pré-ensaios 4 a 6: Água, temperatura e tempo de fertilização ideal à reprodução e desenvolvimento larvar.....	54
4.2. Ensaios.....	56
4.2.1. Ensaio E1: Efeito da concentração de oócitos inicial e alimentação às 48 horas pós fertilização .....	56
4.2.2. Ensaio E2: Assentamento larvar em diferentes biofilmes.....	58
5. Considerações finais e perspectivas futuras .....	60
6. Bibliografia .....	62

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vista ventral de um exemplar de <i>P. depressa</i> , sendo possível observar o manto (mt), tentáculos paliais de cor branca/esbranquiçada (tp), brânquias paliais (bp), pé de cor oliva/preta (p) e valva (vv). .....	2
<b>Figura 2.</b> Gónadas masculina (esquerda) e feminina (direita). .....	2
<b>Figura 3.</b> Distribuição geográfica de <i>P. depressa</i> , representada pela linha preta. Adaptado de Oróstica et al. (2021). .....	3
<b>Figura 4.</b> Ilustração do ciclo de vida de <i>Patella</i> : 1 – Adulto; 2 – Oócito não fecundado; 3 – Espermatozoides; 4 – Embrião no estágio de duas células; 5 – Embrião no estágio de quatro células; 6 – Mórula; 7 – Larva trocófora; 8 – Larva velígera; 9 – Larva pedivelígera; 10 – Pós-larva. Imagens 3 e 8 adaptadas de De Girolamo et al. (2024) e imagens 7, 9 e 10 adaptadas de Guallart et al. (2020). .....	6
<b>Figura 5.</b> Fluxograma que descreve o procedimento geral sobre o qual se desenvolveram todos os ensaios realizados. ....	11
<b>Figura 6.</b> Locais de recolha de lapas: A – Praia do Carreiro de Joanes (39°21'17.71"N; 9°23'40.46"W); B – Praia do Portinho da Areia Sul (39°21'13.04"N; 9°23'19.72"W). Mapa adaptado de Google Earth. ....	12
<b>Figura 7.</b> Lapas dispostas num tabuleiro com água, com o pé voltado para cima. ....	13
<b>Figura 8.</b> Exemplificação fotográfica dos diferentes estágios de desenvolvimento das gónadas, de acordo com a classificação de Orton et al. (1956), classificados como neutra ou de estágio I a V. ....	14
<b>Figura 9.</b> Representação fotográfica dos diferentes tipos de oócitos observados: (a) – oócito com forma irregular e córion intacto; (b) – oócito com forma circular e córion intacto; (c) – oócito com forma circular e córion parcialmente removido; (d) – oócito com forma circular e córion totalmente removido. “c” – Córion. ....	17
<b>Figura 10.</b> Ilustração esquemática de uma grelha de câmara de Neubauer com os quadrados escolhidos para a contagem de espermatozoides evidenciados a laranja, juntamente com uma seta indicando a ordem de contagem dentro de cada quadrado. Imagem adaptada de Barbedo (2013). ....	19
<b>Figura 11.</b> Exemplo fotográfico de oócitos não fertilizados, (a), e fertilizados, (b), (c) e (d). ....	21
<b>Figura 12.</b> Percentagem de oócitos ativos (média ± DP) obtida nos pré-ensaios PE1 e PE2, antes da indução da maturação (Antes), após a maturação em água salgada durante 45 minutos (Água Salgada) e após a maturação em banho alcalino com NH <sub>4</sub> OH (25%), pH 9,0, durante 10 minutos (Banho Alcalino) (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos (p < 0,05). ....	23

<b>Figura 13.</b> Taxa de fertilização (média ± DP), em percentagem, obtida no pré-ensaio PE3, resultante da indução da maturação dos oócitos em água salgada durante 45 minutos (Água Salgada) e uso de banho alcalino com NH <sub>4</sub> OH (25%), pH 9,0, durante 10 minutos (Banho Alcalino) ( <i>n</i> = 3). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( <i>p</i> < 0,05). .....	24
<b>Figura 14.</b> Taxa de eclosão (média ± DP), em percentagem, obtida no pré-ensaio PE3, resultante da indução da maturação dos oócitos em água salgada durante 45 minutos (Água Salgada) e uso de banho alcalino com NH <sub>4</sub> OH (25%), pH 9,0, durante 10 minutos (Banho Alcalino) ( <i>n</i> = 3). .....	25
<b>Figura 15.</b> Taxa de fertilização (média ± DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes origens, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes ensaios efetuados e horas pós fertilização, 3hPF e 4hPF ( <i>n</i> = 3). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( <i>p</i> < 0,05). .....	30
<b>Figura 16.</b> Taxa de fertilização (média ± DP), em percentagem, correspondente ao pré-ensaio PE6, resultante da incubação a diferentes temperaturas, 16 e 18°C ( <i>n</i> = 12). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( <i>p</i> < 0,05). .....	31
<b>Figura 17.</b> Taxa de eclosão (média ± DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes composições, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes pré-ensaios efetuados ( <i>n</i> = 3). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( <i>p</i> < 0,05). .....	32
<b>Figura 18.</b> Taxa de eclosão (média ± DP), em percentagem, correspondente ao pré-ensaio PE6, resultante da incubação a diferentes temperaturas, 16 e 18°C ( <i>n</i> = 6). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( <i>p</i> < 0,05). .....	32
<b>Figura 19.</b> Sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização (média ± DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes composições, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes pré-ensaios efetuados ( <i>n</i> = 3). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( <i>p</i> < 0,05). .....	33
<b>Figura 20.</b> Sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização (média ± DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes composições, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes pré-ensaios efetuados ( <i>n</i> = 3). .....	34
<b>Figura 21.</b> Sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização (48hPF) e 72 horas pós fertilização (72hPF) (média ± DP), em percentagem, resultante da incubação a diferentes temperaturas, 16 e 18°C ( <i>n</i> = 6). .....	34
<b>Figura 22.</b> Distribuição aleatória dos goblets durante o ensaio sujeitos às diferentes condições de concentração inicial de oócitos (100 – 100 oócitos/ml; 200 – 200	

oócitos/ml), regime de alimentação (S – sem alimentação; C – com alimentação). Os números subscritos (1, 2 e 3) indicam o número da réplica correspondente a cada tratamento. ....	38
<b>Figura 23.</b> Placas de fibra de vidro com resina correspondentes ao: A – Controlo negativo (sem biofilme); B – Biofilme obtido através da submersão das placas num tanque com <i>Holothuria</i> sp.; C – Biofilme de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; D – Biofilme de <i>Tetraselmis suecica</i> . ....	42
<b>Figura 24.</b> Exemplo da suspensão das placas para assentamento no goblet, com 500ml de água salgada. ....	42
<b>Figura 25.</b> Distribuição aleatória dos goblets durante o ensaio, sujeitos aos diferentes biofilmes para assentamento: CN – controlo negativo (sem biofilme); P - biofilme obtido através da imersão de placas em tanques de cultivo de <i>Holothuria</i> sp; PT – biofilme de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; TS – biofilme de <i>Tetraselmis suecica</i> . Os números subscritos (1, 2 e 3) indicam o número da réplica correspondente a cada tratamento.	43
<b>Figura 26.</b> Estrutura concebida para gerar os biofilmes de microalgas: A – Goblet com as placas de fibra de vidro antes de adicionar a microalga; B – Goblet com placas de fibra de vidro e solução da diatomácea <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ao fim de 10 dias de cultivo; C – Goblet com placas de fibra de vidro e solução da microalga <i>Tetraselmis suecica</i> ao fim de 10 dias de cultivo. ....	46
<b>Figura 27.</b> Placas de fibra de vidro e resina submersas no tanque de cultivo de <i>Holothuria</i> sp. ....	47
<b>Figura 28.</b> Taxa de fertilização (média ± DP), em percentagem, resultante da reprodução com concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml ( $n = 6$ ). ....	49
<b>Figura 29.</b> Taxa de eclosão (média ± DP), em percentagem, resultante da reprodução com concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml ( $n = 6$ ). ....	50
<b>Figura 30.</b> Sobrevivências larvares 48 horas pós fertilização (48hPF) e 72 horas pós fertilização (72hPF) (média ± DP), em percentagem, resultante da reprodução com concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml ( $n = 6$ ). Resultados marcados com asterisco (*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). ....	50
<b>Figura 31.</b> Sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização (média ± DP), em percentagem, resultantes do regime de alimentação, Sem Alimentação e Com Alimentação de 500 células de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> por larva às 48 horas pós fertilização ( $n = 6$ ). ....	51

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Lapas obtidas nas recolhas de 14 de fevereiro de 2025 e 27 de fevereiro de 2025, com indicação do número de indivíduos pertencentes à espécie <i>P. depressa</i> , a outras espécies e número de mortos.....	15
<b>Tabela II.</b> Classificação das lapas recolhidas nos dias 14 de fevereiro de 2025 (PE1) e 27 de fevereiro de 2025 (PE2) quanto ao seu estado de maturação, de acordo com Orton et al. (1956).....	16
<b>Tabela III.</b> Classificação das lapas recolhidas no dia 3 de março de 2025 (PE3), de acordo com Orton et al. (1956). ....	18
<b>Tabela IV.</b> Lapas obtidas nas recolhas de 15 de abril de 2025 (PE4), 13 de maio de 2025 (PE5) e 30 de maio de 2025 (PE6), com indicação do número de indivíduos pertencentes à espécie <i>P. depressa</i> , a outras espécies e número de mortos.....	26
<b>Tabela V.</b> Classificação das lapas recolhidas nos dias 15 de abril de 2025 (PE4), 13 de maio de 2025 (PE5) e 30 de maio de 2025 (PE6) quanto ao seu estado de maturação, de acordo com Orton et al. (1956). ....	27
<b>Tabela VI.</b> Concentração de espermatozoides e oócitos obtida correspondente a cada pré-ensaio.....	28
<b>Tabela VII.</b> Classificação das lapas recolhidas no dia 10 de junho de 2025, de acordo com Orton et al. (1956) (Neutro. – Estágio virgem rudimentar ou em descanso após a libertação de gâmetas; I – Gónada no início de desenvolvimento, sexo detetável, pouco desenvolvimento da gónada; II – Gónada em desenvolvimento representa um terço do tamanho do indivíduo; III – Gónada representa entre um terço e dois terços do tamanho do indivíduo; IV – Gónada representa dois terços do tamanho do indivíduo; V – Gónada totalmente desenvolvida), agrupado pelo sexo dos indivíduos.....	36
<b>Tabela VIII.</b> Concentração de oócitos inicial utilizada para o início da reprodução (100 oócitos/ml ou 200 oócitos/ml) e alimentação com <i>Phaeocatylum tricornutum</i> iniciada 48 horas após a fertilização (com alimentação ou sem alimentação), de três réplicas cada. ....	39
<b>Tabela IX.</b> Classificação das lapas recolhidas no dia 24 de junho de 2025, de acordo com Orton et al. (1956) (Neutro. – Estágio virgem rudimentar ou em descanso após a libertação de gâmetas; I – Gónada no início de desenvolvimento, sexo detetável, pouco desenvolvimento da gónada; II – Gónada em desenvolvimento representa um terço do tamanho do indivíduo; III – Gónada representa entre um terço e dois terços do tamanho do indivíduo; IV – Gónada representa dois terços do tamanho do indivíduo; V – Gónada totalmente desenvolvida), agrupado pelo sexo dos indivíduos.....	40



# 1. Introdução

## 1.1. Biologia e morfologia

A espécie de lapa *Patella depressa* é um gastrópode herbívoro característico de zonas rochosas intertidais (Henriques et al., 2017). De acordo com a base de dados World Register of Marine Species (2025), esta espécie tem a seguinte classificação:

**Reino** Animalia

**Filo** Mollusca

**Classe** Gastropoda

**Subclasse** Patellogastropoda

**Superfamília** Patalloidea

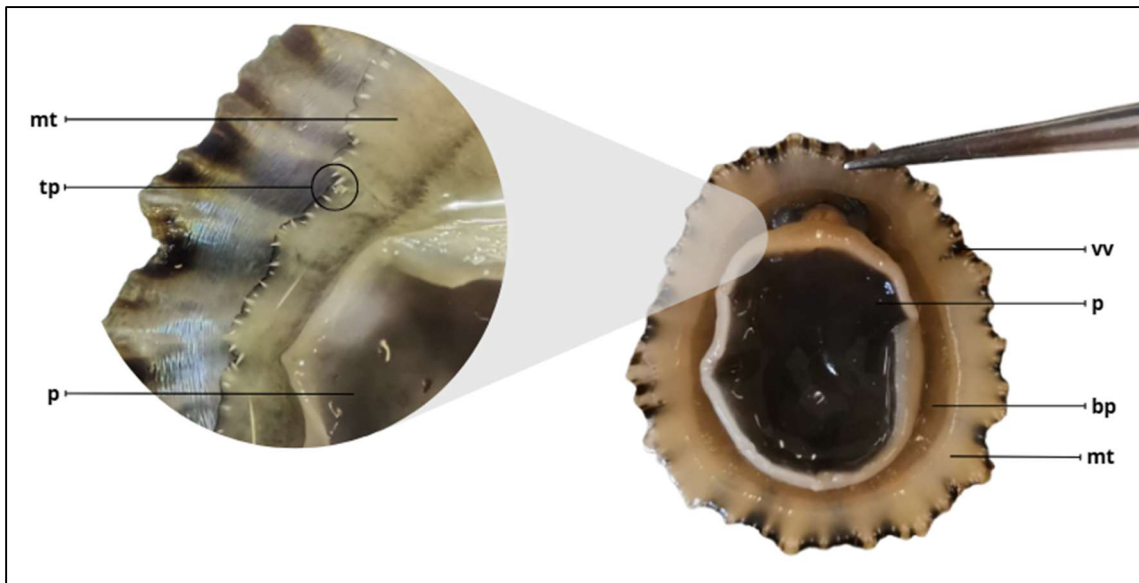
**Família** Patellidae

**Género** *Patella*

**Espécie** *Patella depressa* Pennant, 1777

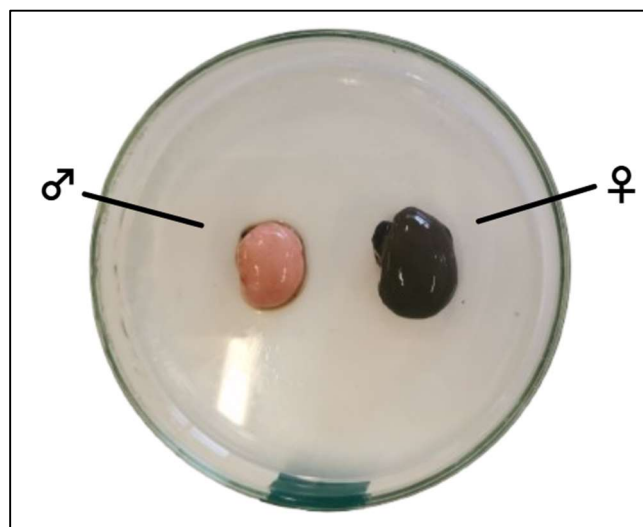
Esta espécie possui uma concha cónica, geralmente com comprimento máximo de 35 mm (I. Smith, 2020), apesar de haver registos de alguns exemplares de maiores dimensões (Borges et al., 2015; Oróstica et al., 2021; Pereira et al., 2022). A concha desta espécie é, geralmente, mais achatada que a das restantes espécies do género *Patella*, podendo atingir 12 mm de altura (I. Smith, 2020).

A sua cabeça é branca, mudando para uma coloração roxa/rosa na zona interna do odontóforo. A sua cavidade bucal é composta por uma rádula e pequenos dentes. O manto, de aparência bege translúcida, possui diversos tentáculos paliais esbranquiçados na sua periferia, cor distintiva da espécie, e o seu pé, de forma circular a oval, possui uma cor oliva/preta, caracterizante de *P. depressa* (Figura 1). O perímetro do pé é circundado por brânquias paliais, através das quais o animal efetua trocas gasosas.



**Figura 1.** Vista ventral de um exemplar de *P. depressa*, sendo possível observar o manto (mt), tentáculos paliais de cor branca/esbranquiçada (tp), brânquias paliais (bp), pé de cor oliva/preta (p) e valva (vv).

As lapas possuem um sistema reprodutivo simples, composto pela gónada, localizada entre o pé e as vísceras, e um gonoducto conectando-a ao nefrídio direito (Henriques et al., 2017; I. Smith, 2020). Não é possível identificar o sexo do organismo externamente, sendo necessário proceder à sua dissecação para observação da morfologia da gónada. Em *P. depressa*, os machos apresentam uma gónada com diversos túbulos interligados de cor rosa/laranja/amarelo, enquanto as fêmeas possuem uma gónada esverdeada com textura granular (Brazão et al., 2003; I. Smith, 2020) (Figura 2).



**Figura 2.** Gónadas masculina (esquerda) e feminina (direita).

## 1.2. Distribuição e ecologia

Estes animais são gastrópodes herbívoros que habitam zonas rochosas, estando sujeitos a condições ambientais variáveis e imprevisíveis (Henriques et al., 2017). Diversos fatores bióticos e abióticos influenciam a distribuição e biologia das espécies, originando diferenças intra e interespecíficas (Casal et al., 2018; Henriques et al., 2017; Mau & Jha, 2018). Lapas do género *Patella* habitam costas rochosas, particularmente em zonas intertidais, desde os polos até aos trópicos (Casal et al., 2018; Mau & Jha, 2018).

A espécie *Patella depressa* está presente nas costas rochosas desde o norte do continente africano, a partir do Senegal, ao longo da costa atlântica europeia e até Inglaterra e País de Gales (Brazão et al., 2003; Guerra & Gaudencio, 1986; Oróstica et al., 2021) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição geográfica de *P. depressa*, representada pela linha preta. Adaptado de Oróstica et al. (2021).

Esta é bastante abundante na costa portuguesa, mais especificamente nas zonas intertidais em praias rochosas (Brazão et al., 2003; Casal et al., 2018; Guerra & Gaudencio, 1986). De facto, entre as espécies de lapas mais comuns em Portugal (*P. depressa*, *P. ulyssiponensis* e *Siphonaria pectinata*) (Seabra et al., 2023), *P. depressa* é a espécie que domina a costa portuguesa, tendência contrária à observada noutros locais como a Grã-Bretanha, onde *P. vulgata* domina (Borges et al., 2015; Casal et al., 2018; Guerra & Gaudencio, 1986).

Adicionalmente, um estudo recente de Seabra et al. (2023) permitiu perceber que a distribuição das lapas varia ao longo da vida destas. Os autores observaram que lapas de maiores dimensões de *P. depressa*, logo, tendencialmente mais velhas (Oróstica et al., 2021), são mais abundantes em zonas de média a elevada exposição, enquanto lapas de menores dimensões são mais abundantes em ambientes protegidos, nomeadamente poças de maré.

As lapas são organismos semi-sésseis, realizando pequenas deslocações na área circundante ao local onde se encontram (Cook et al., 1969; Henriques et al., 2017). Tratam-se de herbívoros que raspam o substrato com a rádula de modo a se alimentarem, sendo capazes de remover as camadas superficiais das algas mais resistentes (Branch, 1985; Burgos-Rubio et al., 2015; Henriques et al., 2017; Mau & Jha, 2018; Smith, 2020). *P. depressa* alimenta-se maioritariamente durante a noite, consumindo microalgas, esporos de macroalgas e restos orgânicos presentes no substrato rochoso em que se encontram (Henriques et al., 2017; Mau & Jha, 2018; I. Smith, 2020).

Deste modo, esta exerce um papel ecológico fundamental no ecossistema intertidal, controlando o crescimento de algas, influenciando a sua distribuição e estrutura da comunidade bentónica. Adicionalmente, existem evidências de que a concha de *P. depressa* poderá funcionar como substrato de assentamento para alguns organismos, como as cracas (*Chthamalus* spp.), e superfície de fixação para algumas macroalgas, contribuindo para a manutenção do habitat em que se inserem (Pereira et al., 2022).

*P. depressa* também faz parte da dieta de diversos animais que possuem a capacidade de desprender as conchas do substrato, como é o caso de Gaivotas (*Larus* spp.), Ostraceiros (*Haematopus ostralegus*), Caranguejos e Estrelas-do-mar (I. Smith, 2020).

### 1.3. Reprodução

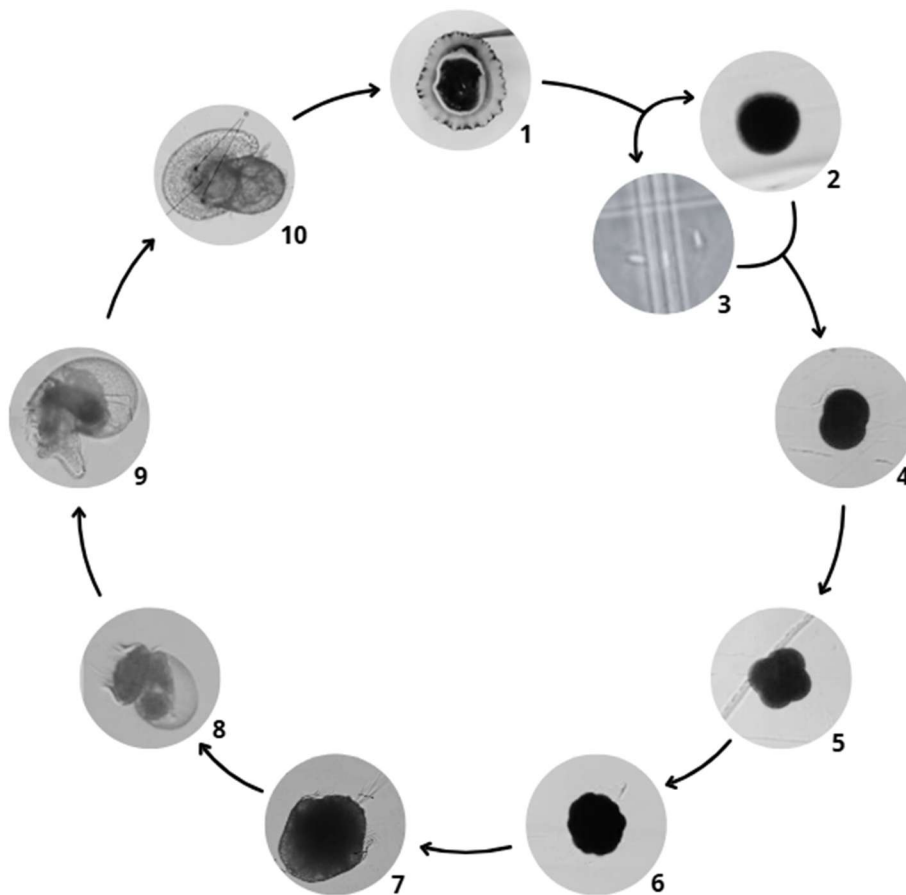
A reprodução de *Patella depressa* ocorre através de fertilização externa, onde os indivíduos apresentam sexos separados com proporções semelhantes (Brazão et al., 2003; Smith, 2020).

Geralmente, o desenvolvimento das gónadas inicia-se na primavera, seguindo-se a reprodução nos meses de julho a setembro, associada ao aumento da temperatura e possivelmente à ocorrência de ventos fortes (Brazão et al., 2003; Morais et al., 2003). Guerra & Gaudencio (1986) observaram que a maioria das lapas de *P. depressa* maturam ao fim de dois anos de vida, resultando em reprodutores com comprimentos maioritariamente compreendidos entre os 24 e 30 milímetros.

Lapas da família Patellidae possuem um ciclo de vida bipartido, caracterizado por uma fase larvar planctónica, favorecendo a dispersão dos indivíduos, seguido de assentamento e uma fase bentónica adulta a partir da qual se tornam organismos semi-sésseis (Ribeiro, 2008). A reprodução inicia-se quando os indivíduos libertam os gâmetas para a coluna de água (Brazão et al., 2003; Guallart et al., 2020; Guerra & Gaudencio, 1986; I. Smith, 2020). Quando estes se encontram, inicia-se a fecundação, seguida da expulsão do corpo polar. O desenvolvimento dos embriões começa, passando pelas fases de embrião de 2 e 4 células e, por fim, mórula (Figura 4). A fase planctónica, de curta duração, inicia-se quando se atinge o estágio de larva trocófora, seguido de larva velígera (Brazão et al., 2003; Guallart et al., 2020; Smith, 2020). Quando as larvas atingem o estágio de pedivelígera, marcado pela presença de tentáculos cefálicos e pé bem desenvolvidos, são consideradas competentes para iniciar o assentamento (Guallart et al., 2020; Nunes et al., 2024). O assentamento consiste numa fase inicial onde as larvas competentes exploram o ambiente até encontrarem o local ideal para assentar, ao qual respondem positivamente a sinais físicos e químicos, dando início à sua metamorfose, segunda fase do processo de assentamento, que marca o início da sua vida bentónica (Nunes et al., 2024). Posteriormente, dá-se início à fase de pós-larva, em que estas vão progressivamente perdendo o velum e o opérculo, seguidos da formação e crescimento da teleoconcha (Guallart et al., 2020).

Brazão et al. (2003) verificaram que, em Portugal, a reprodução de *P. depressa* ocorre principalmente durante o verão, embora ainda apresente alguns picos secundários durante o resto do ano. No entanto, este padrão de reprodução varia geograficamente (Guerra & Gaudencio, 1986; Smith, 2020). Isto inclui diferenças entre comunidades em

diferentes locais de Portugal, onde Guerra & Gaudencio (1986) descobriram que as populações das Regiões Norte, Centro e Sul do país se comportam de forma diferente em resposta a diferentes condições ambientais. Deste modo, populações do Norte de Portugal tendem a reproduzir-se durante o Verão (Brazão et al., 2003; Guerra & Gaudencio, 1986; Ribeiro, 2008), ainda que haja um pico de reprodução menor entre janeiro e março (Brazão et al., 2003), enquanto as populações na zona Sul do país apresentam diversos picos de reprodução ao longo do ano, caracterizando um padrão de reprodução contínuo (Guerra & Gaudencio, 1986). Já na Região Centro, o padrão de reprodução não é tão claro, com populações a demonstrar maioritariamente reprodução quase contínua, enquanto a reprodução de outras populações se assemelha à observada a Norte, com um grande pico de reprodução durante o Verão e um pico menor durante o Inverno (Brazão et al., 2003; Guerra & Gaudencio, 1986). Brazão et al. (2003) observaram que no Centro de Portugal, populações que ocupam zonas protegidas parecem reproduzir-se com menor frequência, libertando uma maior quantidade de gâmetas, enquanto populações que habitam zonas expostas, tendem a possuir mais momentos de libertação de gâmetas, sendo estes em menor quantidade.



**Figura 4.** Ilustração do ciclo de vida de *Patella*: 1 – Adulto; 2 – Oócito não fecundado; 3 – Espermatozoides; 4 – Embrião no estágio de duas células; 5 – Embrião no estágio de quatro células; 6 – Mórula; 7 – Larva trocófora; 8 – Larva velígera; 9 – Larva pedivelígera; 10 – Pós-larva. Imagens 3 e 8 adaptadas de De Girolamo et al. (2024) e imagens 7, 9 e 10 adaptadas de Guallart et al. (2020).

Em ambiente natural, as larvas de *P. depressa* assentam em zonas mais profundas da costa, em ambientes protegidos e permanentemente húmidos, sendo encontradas com elevada abundância em poças de maré (Brazão et al., 2003; I. Smith, 2020). À medida que crescem, iniciando quando o tamanho da concha é de 5mm, os juvenis deslocam-se gradualmente para zonas mais altas do litoral (Brazão et al., 2003; I. Smith, 2020).

#### **1.4. Mercado global**

O consumo de lapas foi durante muito tempo associado a épocas de fome e baixa disponibilidade de alimentos, permitindo a sobrevivência de humanos que habitavam zonas costeiras (Firth, 2021). Ao longo dos anos, verificou-se que o foco da recolha de lapas foi alterado de subsistência de populações empobrecidas para exploração comercial altamente rentável (Henriques et al., 2017). Estes organismos passaram a ser considerados uma iguaria gastronómica, contribuindo para os setores económicos e gastronómicos em países como México, Estados Unidos da América, Chile e Portugal (Casal et al., 2018; Guerra & Gaudencio, 1986; Henriques et al., 2017). Adicionalmente, as lapas têm um perfil nutricional interessante, tendo-se revelado como boas fontes de ácidos gordos essenciais à saúde humana, em particular o ómega-3 (Fernandes et al., 2019), e como boas fontes de proteína (Rampli et al., 2025).

Para além da sua valorização culinária, existe ainda interesse nestes animais do ponto de vista recreacional e cultural, sendo utilizados como isco em pesca artesanal e como matérias-primas em trabalhos de artesanato (Firth, 2021), reforçando o seu interesse comercial.

#### **1.5. Aquacultura**

A aquacultura global tem crescido nos últimos anos, atingindo um total de produção de 130,9 milhões de toneladas em 2022, resultando num valor anual de 312,8 mil milhões de dólares (FAO, 2024). A aquacultura de moluscos representou 11% da produção total anual em 2022, resultando em 18911 mil toneladas de produto, sendo dominada maioritariamente por bivalves, nomeadamente ostras, ameijoas, vieiras e mexilhões, por ordem decrescente de produção. Atualmente, abalones (*Haliotis* spp.), *Trochus niloticus*

e concha-rainha (*Strombus gigas*) representam os gastrópodes de maior importância a nível da aquacultura (Yu et al., 2023).

Apesar da importância das lapas a nível económico e ecológico, ainda não existe aquacultura de larga escala destes gastrópodes marinhos. Existem diversos artigos que exploram a reprodução de algumas espécies do género *Patella* como é o caso de *P. aspera* (Castejón et al., 2022c, 2022a, 2022b, 2024b; De Girolamo et al., 2024; Nunes et al., 2024) e *P. candei* (Cañizares et al., 2021; Castejón et al., 2022b, 2023b; De Girolamo et al., 2024). Para estas espécies já existem documentos que compilam técnicas para a reprodução destas em cativeiro, desde a fertilização, cultivo e assentamento larvar (Castejón et al., 2022b; De Girolamo et al., 2024) até ao crescimento dos juvenis nascidos em laboratório (De Girolamo et al., 2024). No entanto, para outras espécies deste género, como é o caso de *P. depressa*, espécie dominante na costa continental portuguesa (Casal et al., 2018; Guerra & Gaudencio, 1986), existe menos informação quanto à sua reprodução em contexto de laboratório (Aquino De Souza et al., 2009; Pérez et al., 2016; Ribeiro, 2008), em especial quanto ao seu cultivo larvar e assentamento (Ribeiro, 2008).

A importância das lapas a nível comercial tem levado à sobre-exploração destes organismos que, juntamente com outros impactos antropogénicos como poluição e destruição de habitats, têm levado ao aumento da pressão sobre os stocks pesqueiros, podendo vir a levar à diminuição da prevalência e distribuição de lapas ao longo das zonas costeiras (Henriques et al., 2017). Adicionalmente, a remoção de indivíduos de maiores dimensões do ambiente natural para exploração comercial, levando à diminuição da sua densidade, poderá contribuir para o aumento da densidade de indivíduos de menores dimensões e prejudicar a capacidade reprodutiva destas populações (Henriques et al., 2017).

O desenvolvimento da aquacultura de lapas permitirá comercializá-las de forma mais sustentável, aliviando a pressão sobre os stocks, e ainda permitir criar programas de repovoamento de modo a reverter os danos já existentes (Castejón et al., 2022a, 2024a).

## 1.6. Objetivos

Apesar da relevância económica das lapas, o conhecimento sobre a reprodução e cultivo larvar da espécie mais comum na costa continental portuguesa, *Patella depressa*, em cativeiro permanece escasso. A maioria dos estudos existentes sobre esta foca-se na sua ecologia e reprodução em ambiente natural, revelando-se uma lacuna no conhecimento no que toca à sua reprodução em ambientes controlados, o que limita o avanço da exploração sustentável desta espécie através da aquacultura. O presente estudo visa aprofundar o conhecimento sobre a reprodução de *P. depressa* em cativeiro, quanto às condições ideais para a reprodução e assentamento desta espécie, nomeadamente:

- i. Avaliar a concentração de oócitos ideal à fecundação;
- ii. Avaliar a necessidade de alimentação na fase inicial do desenvolvimento larvar;
- iii. Avaliar o efeito do biofilme no assentamento larvar.

## 2. Metodologia Experimental

### 2.1. Organização geral dos ensaios

Os ensaios experimentais foram conduzidos de forma sequencial e adaptativa. A abordagem adotada permitiu ajustar metodologias ao longo do decorrer dos ensaios, com base nos resultados obtidos em cada fase, permitindo otimizar a fecundação, eclosão e desenvolvimento larvar de *P. depressa* em cativeiro.

Deste modo, iniciou-se esta metodologia com pré-ensaios de modo a determinar condições base para o decorrer dos ensaios principais, com os seguintes objetivos:

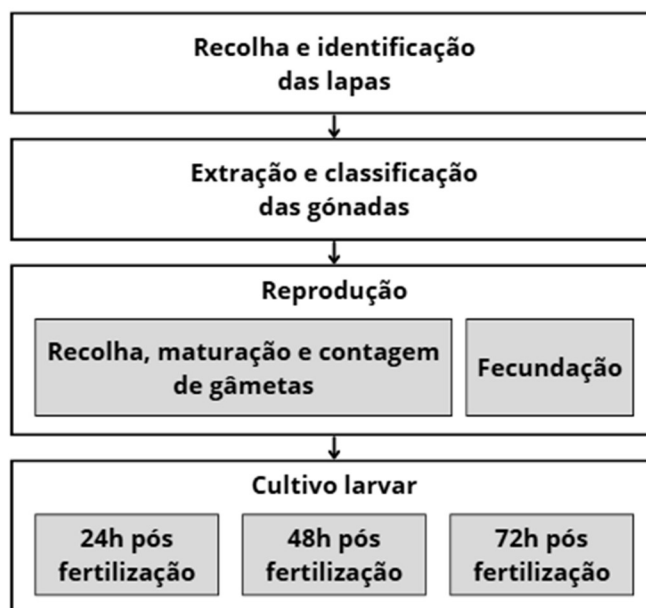
- Pré-ensaios 1 e 2: determinar o método de maturação de oócitos mais eficiente para a obtenção de oócitos ativos;
- Pré-ensaio 3: determinar o método de maturação de oócitos que permite otimizar a reprodução;
- Pré-ensaios 4 – 6: avaliar o efeito de dois tipos de água de composições diferentes sobre a reprodução da espécie;
- Pré-ensaio 6: para além de avaliar o efeito dos dois tipos de água de composições diferentes sobre a reprodução, visa determinar a temperatura ótima para esta e o tempo de espera ideal para a avaliação da taxa de fecundação.

Os ensaios principais realizados tiveram como objetivos:

- Ensaio 1: Determinar qual a concentração de oócitos inicial e regime de alimentação ideal à reprodução e cultivo larvar;
- Ensaio 2: Determinar do tipo de biofilme de assentamento ideal para a obtenção de pós-larvas de *P. depressa*.

Os ensaios foram realizados nas instalações do edifício CETEMARES (Peniche, Portugal), sob condições controladas de temperatura, fotoperíodo e salinidade. Água e materiais utilizados nos ensaios foram previamente autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

Todos os ensaios têm como base o mesmo procedimento geral (Figura 5).



**Figura 5.** Fluxograma que descreve o procedimento geral sobre o qual se desenvolveram todos os ensaios realizados.

Este foi iniciado pela recolha de lapas, seguida da confirmação da espécie das mesmas e identificação e remoção dos indivíduos mortos (descrito no ponto 2.1.1). As gónadas foram extraídas e identificadas quanto ao seu sexo e estágio de maturação, de acordo com a metodologia exposta no ponto 2.1.2. Posteriormente, foram escolhidas as gónadas pretendidas para proceder com a reprodução, seguida da recolha, maturação e contagem dos gâmetas. Posteriormente, foi iniciada a fecundação, onde foram avaliadas as taxas de fecundação e de eclosão (24 horas pós fertilização) e sobrevivência larvar às 48 e 72 horas pós fertilização.

O local de recolha, o número de lapas recolhidas, a quantidade de gónadas utilizadas, os métodos de maturação de gâmetas e condições de salinidade, temperatura, concentração de oócitos inicial e regime de alimentação são específicos para cada ensaio, indicados na correspondente subsecção.

### 2.1.1. Recolha e identificação de lapas

A recolha de lapas foi realizada durante a maré baixa na zona média litoral exposta em uma das seguintes localizações (Figura 6):

- a) Praia do Carreiro de Joanes, Peniche (39°21'17.71"N; 9°23'40.46"W)
- b) Praia do Portinho da Areia Sul, Peniche (39°21'13.04"N; 9°23'19.72"W)



**Figura 6.** Locais de recolha de lapas: A – Praia do Carreiro de Joanes (39°21'17.71"N; 9°23'40.46"W); B – Praia do Portinho da Areia Sul (39°21'13.04"N; 9°23'19.72"W). Mapa adaptado de Google Earth.

Foram recolhidas somente lapas adultas, caracterizadas pelo comprimento da valva superior a 2 centímetros (Brazão et al., 2003), com o auxílio de uma espátula de aço inoxidável, com o pé oliva/preto, característico de lapas da espécie *P. depressa* (Brazão et al., 2003; Smith, 2020). Após a recolha, as lapas foram colocadas num saco de plástico e transportadas até ao Laboratório de Biologia do edifício CETEMARES, Peniche. No laboratório, as lapas foram transferidas do saco de transporte para um tabuleiro com água salgada, sendo dispostas com o pé voltado para cima (Figura 7).



**Figura 7.** Lapas dispostas num tabuleiro com água, com o pé voltado para cima.

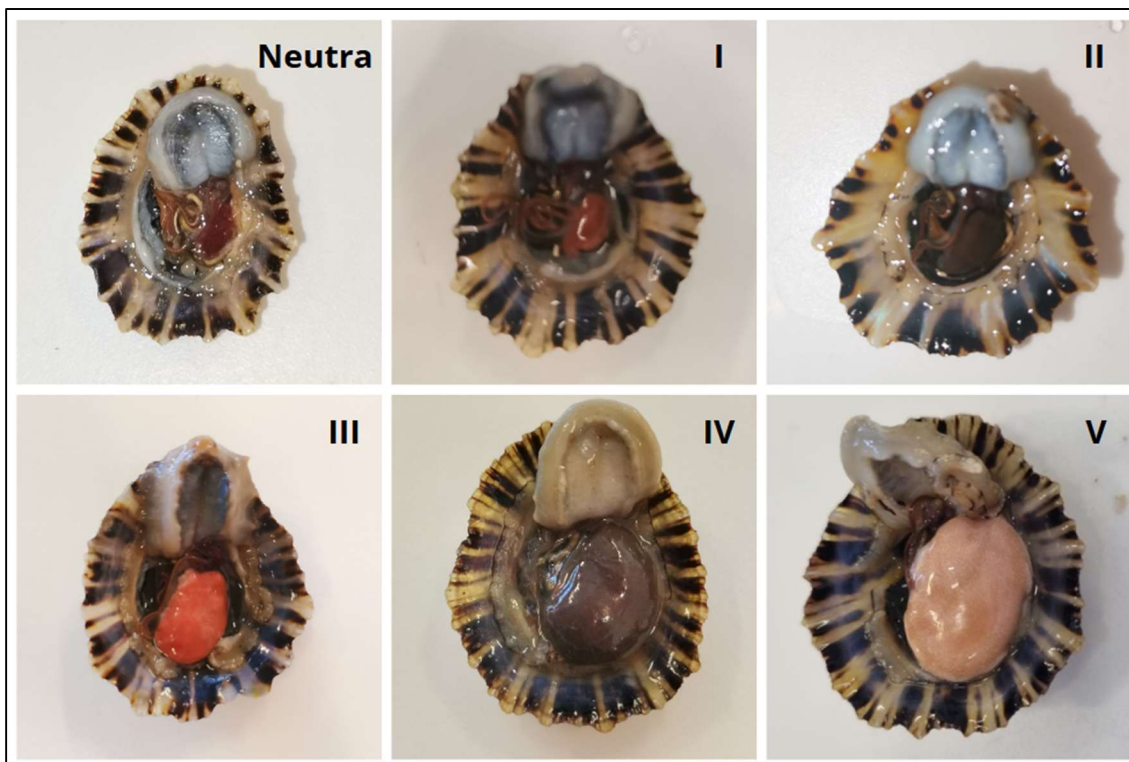
Em seguida, confirmou-se individualmente se os indivíduos recolhidos pertenciam à espécie *P. depressa* através da observação e identificação dos seus tentáculos paliais de cor branca/esbranquiçada (Smith, 2020), procedendo à eliminação de lapas que não apresentem esta característica, ou seja, lapas pertencentes a outras espécies. Foram também descartados os indivíduos mortos, identificados pela ausência de resposta de contração do manto quando sujeito ao toque (De Girolamo et al., 2024).

### **2.1.2. Extração e classificação das gónadas**

As gónadas das lapas estão localizadas entre as vísceras e o pé (Smith, 2020), sendo necessária a dissecação dos indivíduos para a sua extração. É possível identificar o sexo dos indivíduos através da observação da gónada a olho nu através da sua cor, onde aquelas de cor rosa/laranja/branca correspondem a gónadas masculinas e as de cor esverdeada a gónadas femininas (Smith, 2020).

Deste modo, as lapas foram dissecadas com cuidado, com o auxílio de um bisturi e pinça, de modo a remover o pé e revelar a gónada, sem que fosse acidentalmente perfurada. Em seguida, as gónadas foram classificadas e separadas de acordo com o sexo. Simultaneamente, procedeu-se à classificação das gónadas quanto ao seu estado de maturação de acordo com Orton et al. (1956) (Figura 8): Inativa/Neutra – estágio virgem rudimentar ou em descanso após a libertação de gâmetas; I – Gónada no início de desenvolvimento, sexo detetável, pouco desenvolvimento da gónada; II – Gónada em desenvolvimento representa um terço do tamanho do indivíduo; III – Gónada

representa entre um terço e dois terços do tamanho do indivíduo; IV – Gónada representa dois terços do tamanho do indivíduo; V – Gónada totalmente desenvolvida.



**Figura 8.** Exemplificação fotográfica dos diferentes estágios de desenvolvimento das gónadas, de acordo com a classificação de Orton et al. (1956), classificados como neutra ou de estágio I a V.

## 2.2. Pré-ensaios

Foram realizados pré-ensaios de modo a definir condições base para o decorrer dos ensaios principais. O primeiro conjunto de pré-ensaios (ponto 2.2.1) foi executado de modo a determinar o método de maturação de oócitos que permitisse otimizar a reprodução de *P. depressa*. O segundo conjunto de pré-ensaios (ponto 2.2.3) incidiu sobre a escolha da água salgada mais adequada à execução dos seguintes ensaios de reprodução, comparando duas águas com diferentes propriedades físico-químicas que, assim como a escolha da temperatura a utilizar e tempo de fertilização necessário, determinarão as condições ideais para a otimização da reprodução e cultivo larvar de *P. depressa*.

De modo a facilitar a compreensão da metodologia, os pré-ensaios foram identificados com números, de 1 a 6, indicados pela sigla PE, seguido do respetivo número (ex.: PE1).

### 2.2.1. Pré-ensaios 1 a 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos e reprodução

Este conjunto de pré-ensaios visa a determinação do método de maturação de oócitos que permite otimizar a percentagem de oócitos ativos (Pré-ensaios 1 e 2) e a reprodução (Pré-ensaio 3), em *P. depressa*, com o qual se deve proceder nos restantes ensaios. Foram testados os métodos de maturação:

- (i) Exposição dos oócitos a água salgada durante 30 minutos;
- (ii) Exposição dos oócitos a um banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) durante 10 minutos.

#### 2.2.1.1. Pré-ensaios 1 e 2: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos

Toda a água utilizada durante esta metodologia encontrava-se a 35 de salinidade, determinada com o auxílio de um refratómetro para água do mar (Hanna Instruments, HI96822, Portugal).

Foram recolhidas lapas nos dias 14 de fevereiro de 2025 (PE1) e 27 de fevereiro de 2025 (PE2) na Praia do Carreiro de Joanes. Informação relativa ao número de indivíduos recolhidos encontra-se na Tabela I.

**Tabela I.** Lapas obtidas nas recolhas de 14 de fevereiro de 2025 (PE1) e 27 de fevereiro de 2025 (PE2), com indicação do número de indivíduos pertencentes à espécie *P. depressa*, a outras espécies e número de mortos.

Pré-ensaio	Indivíduos Recolhidos			
	<i>P. depressa</i>	Outras Espécies	Mortos	Total
PE1	33	0	0	33
PE2	52	0	0	52

Em laboratório, efetuou-se a dissecação das lapas recolhidas de modo a determinar o seu sexo e estágio de maturação (Tabela II).

**Tabela II.** Classificação das lapas recolhidas nos dias 14 de fevereiro de 2025 (PE1) e 27 de fevereiro de 2025 (PE2) quanto ao seu estado de maturação, de acordo com Orton et al. (1956).

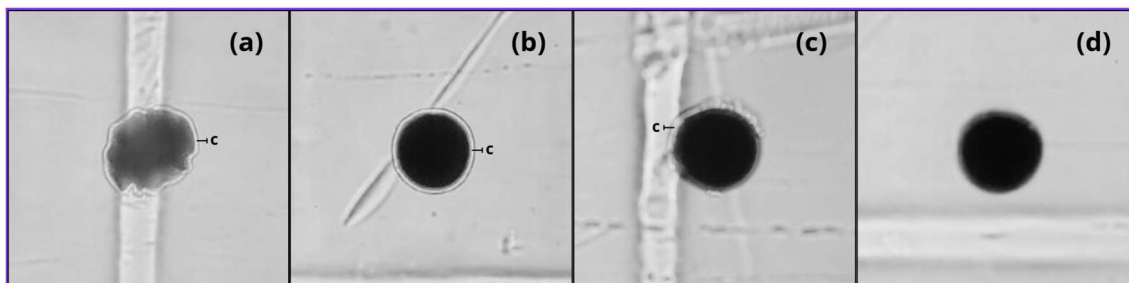
Pré-ensaio	Classificação										
	Neutro	Machos (♂)					Fêmeas (♀)				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
PE1	1	5	3	5	5	0	0	6	7	1	0
PE2	0	1	9	6	4	0	4	10	14	4	0

De acordo com a classificação realizada, escolheram-se quatro gónadas femininas com a melhor classificação para proceder com os ensaios. Deste modo, no pré-ensaio PE1 foram utilizadas 1 gónada feminina no estágio IV e 3 gónadas femininas no estágio III, e, no pré-ensaio PE2 foram utilizadas 4 gónadas femininas no estágio IV.

Os oócitos foram extraídos das gónadas femininas através da remoção de secções destas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo depositadas num goblet de 25ml com água salgada onde se realizou o movimento de sifonar e expulsar com a pipeta, contribuindo para a libertação dos gâmetas para a água. Posteriormente, a solução foi filtrada com um crivo de 200µm, retendo impurezas de maiores dimensões e deixando passar os oócitos, seguida da sua filtração com um crivo de 41µm, retendo os oócitos, e deixando passar impurezas de menores dimensões. Em seguida, os gâmetas femininos retidos no crivo foram novamente colocados num goblet de 25ml com água salgada. Os oócitos de *P. depressa* depositam-se no fundo em condições estáticas, pelo que se deixou a solução em repouso até se verificar a deposição dos oócitos no fundo, procedendo em seguida com a diminuição do volume de água para o mínimo possível através da sifonagem do topo da coluna de água, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Em seguida, efetuou-se a observação de três amostras de 1ml da suspensão de oócitos, previamente diluídas em 1:5, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick (Pyser-SGI, S52, Reino Unido), ao microscópio ótico (ZEISS, Primostar 3, Carl ZEISS Microscopy

GmbH), classificando os oócitos de acordo com a integridade do seu córion (Cañizares et al., 2021; De Girolamo et al., 2024) (Figura 9): i) Oócito inativo – oócito caracterizado pela sua forma irregular ou circular com córion intacto; ii) Oócito ativo – oócito de forma circular com córion total ou parcialmente removido.



**Figura 9.** Representação fotográfica dos diferentes tipos de oócitos observados: (a) – oócito com forma irregular e córion intacto; (b) – oócito com forma circular e córion intacto; (c) – oócito com forma circular e córion parcialmente removido; (d) – oócito com forma circular e córion totalmente removido. “c” – Córion.

Após a classificação, foi determinada a percentagem inicial de oócitos ativos, através da equação abaixo indicada (Cañizares et al., 2021):

$$\text{oócitos ativos (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ oócitos ativos}}{n^{\circ} \text{ oócitos inativos} + n^{\circ} \text{ oócitos ativos}} \times 100$$

Posteriormente, a solução onde se encontravam os oócitos foi homogeneizada e dividida por dois goblets, assegurando volumes semelhantes e igual concentração de oócitos. Os oócitos de um dos goblets foram sujeitos à indução de maturação em água salgada, através do seu contacto com água salgada durante 30 minutos, em condições estáticas. Os restantes oócitos foram transferidos para uma tina contendo uma solução alcalina previamente preparada através da adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) (Acros Organics), até atingir pH de 9,0, confirmado com um medidor de pH (inoLab, pH 7110, WTW), sendo mantidos em contacto com esta durante 10 minutos. Após os 10 minutos, os oócitos sujeitos a esta metodologia, foram crivados com rede de malha de  $41\mu\text{m}$  e lavados abundantemente com água salgada de modo a evitar a permanência de resquícios de base que pudessem vir a danificar os oócitos e causar efeitos adversos

nas larvas (Castejón et al., 2022b; Pérez et al., 2016). Posteriormente, foram novamente colocados num goblet de 25ml.

Por fim, realizaram-se novamente 3 contagens de 1ml, com a mesma diluição, por tratamento, classificando os oócitos de acordo com a integridade do córion (Figura 9), calculando a percentagem de oócitos ativos correspondente a cada tratamento.

### 2.2.1.2. Pré-ensaio 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a reprodução

A água utilizada durante este pré-ensaio apresentava salinidade de 35, determinada com o auxílio de um refratómetro para água do mar (Hanna Instruments, HI96822, Portugal).

Dia 31 de março de 2025, iniciou-se o pré-ensaio 3 (PE3), com a recolha de 50 lapas da espécie *P. depressa* na Praia do Portinho da Areia Sul, sem ter ocorrido a recolha acidental de lapas de outras espécies ou mortas. Em laboratório, foi determinado o sexo e estágio de maturação das gónadas das lapas recolhidas (Tabela III).

**Tabela III.** Classificação das lapas recolhidas no dia 31 de março de 2025 (PE3), de acordo com Orton et al. (1956).

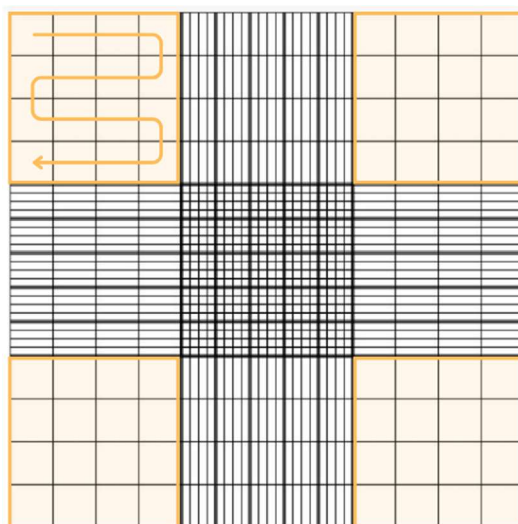
Classificação										
Neutro	Machos (♂)					Fêmeas (♀)				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1	4	8	9	4	0	5	6	11	2	0

De acordo com a classificação realizada, escolheram-se quatro gónadas masculinas, todas no estágio IV, e quatro gónadas femininas, das quais 2 se encontravam no estágio IV e as duas no estágio III, de modo a proceder com os ensaios.

Os gâmetas masculinos foram recolhidos através da remoção de pequenas partes das gónadas masculinas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, depositando-as num goblet com o menor volume de água salgada possível, a 35 de salinidade e realizando

o movimento de sifonar e expulsar os pedaços de gónadas recolhidos dentro de água, contribuindo para a libertação de espermatozoides. Posteriormente, a solução foi filtrada com uma rede de malha de 41µm, retendo impurezas de maior tamanho e deixando passar os espermatozoides. Em seguida, o goblet contendo os espermatozoides filtrados foi incubado durante 45 minutos, de modo a otimizar a mobilidade dos mesmos (Pérez et al., 2016) numa sala de temperatura controlada a  $18,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Após 45 minutos de espera, foram realizadas três contagens de espermatozoides para determinar a sua concentração. Para tal, recolheu-se uma amostra da solução e realizou-se uma diluição da mesma de 1:1000, adicionando uma gota de lugol (Acros Organic) para imobilizar os espermatozoides e permitir a sua contagem. Para cada contagem, pipetou-se 20µl da amostra diluída na câmara de Neubauer (Marienfeld, Neubauer-improved, Alemanha), procedendo-se à sua observação ao microscópio e contagem dos quatro quadrados das extremidades da grelha, como representado na (Figura 10).



**Figura 10.** Ilustração esquemática de uma grelha de câmara de Neubauer com os quadrados escolhidos para a contagem de espermatozoides evidenciados a laranja, juntamente com uma seta indicando a ordem de contagem dentro de cada quadrado. Imagem adaptada de Barbedo (2013).

Por fim, a concentração de espermatozoides foi calculada através da seguinte equação abaixo:

$$[\text{espermatozoides}] = \frac{n^{\circ} \text{ total de espermatozoides contados}}{n^{\circ} \text{ de quadrados contados}} \times 10^4 \times df$$

[espermatozoides] – Concentração de espermatozoides;

$df$  – Fator de diluição.

Obteve-se uma concentração de  $8,44 \times 10^8 \pm 1,42 \times 10^7$  espermatozoides/ml.

Os oócitos foram extraídos e filtrados conforme explicado anteriormente (ponto 2.2.1.1). Em seguida, foram analisadas três amostras de 1ml, diluídas 1:10, ao microscópio ótico (ZEISS, Primostar 3, Carl ZEISS Microscopy GmbH), com o auxílio de uma câmara de Sedgewick (Pyser-SGI, S52, Reino Unido), de modo a determinar a percentagem de oócitos ativos e, simultaneamente, determinar a concentração de oócitos através da equação

$$[\text{oócitos}] = \frac{n^{\circ} \text{ total de oócitos contados}}{n^{\circ} \text{ contagens}} \times df$$

[oócitos] – Concentração de oócitos;

$df$  – Fator de diluição.

Obteve-se uma percentagem de oócitos ativos de  $1,8 \pm 0,8\%$  e concentração de oócitos de  $3,89 \times 10^3 \pm 5,30 \times 10^2$  oócitos/ml.

Posteriormente, metade dos oócitos foram maturados em água salgada, enquanto os restantes foram sujeitos a um banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) (Acros Organics) (descrito em 2.2.1.1). No fim da maturação, observaram-se três amostras de oócitos de cada goblet, diluídas 1:10, determinando a percentagem de oócitos ativos para cada tratamento. A maturação em água salgada resultou em  $7,0 \pm 2,4\%$  de oócitos ativos e a maturação de oócitos em banho alcalino resultou em  $82,1 \pm 3,4\%$  de oócitos ativos.

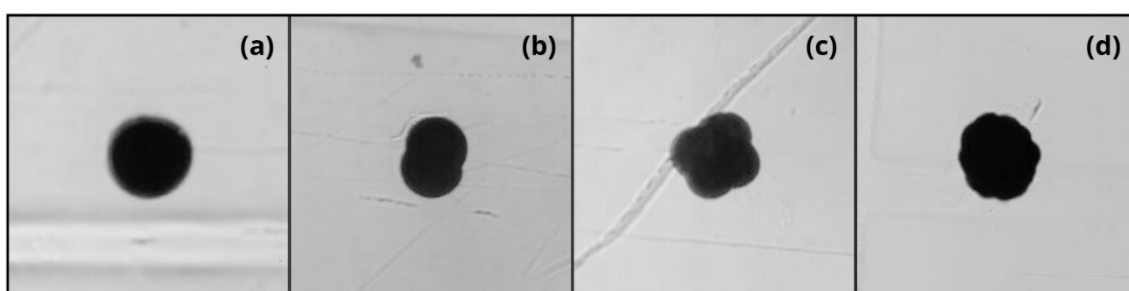
Em seguida, deu-se início à fecundação, utilizando 6 goblets, de modo que cada tratamento (maturação em água salgada e maturação com banho alcalino) possuísse 3 réplicas. Em cada goblet foram adicionados oócitos e espermatozoides de modo que a concentração final dos gâmetas fosse de 200 oócitos/ml e  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml (Pérez et al., 2016). Em seguida, a solução foi levada a incubar durante 180 minutos.

Após o tempo de incubação, a solução foi filtrada com um crivo de  $41\mu\text{m}$  e lavada abundantemente com água salgada, de modo a reter os oócitos e deixar passar os espermatozoides. Em seguida, os oócitos foram ressuspensos num goblet semelhante ao utilizado para a sua incubação e com volume igual ao inicial.

Posteriormente, foram realizadas três contagens de amostras, contando o número de oócitos fertilizados (Figura 11), por réplica, através da observação de 1 ml de amostra ao microscópio, previamente diluída em 1:2, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick. Com os dados obtidos, foi calculada a taxa de fertilização obtida através da equação abaixo.

$$Taxa\ Fertilização\ (\%) = \frac{n^{\circ}\ oócitos\ fertilizados}{n^{\circ}\ oócitos\ total} \times 100 \times df$$

*df* – Fator de diluição.



**Figura 11.** Exemplo fotográfico de oócitos não fertilizados, (a), e fertilizados, (b), (c) e (d).

Seguidamente, os goblets foram mantidos em condições estáticas, sem trocas de água ou arejamento, à mesma temperatura a que foram levados a incubar com fotoperíodo 12/12, até ao fim do ensaio.

Após 24 horas da fertilização, foram contabilizadas as larvas trocóforas eclodidas de três amostras de 1ml por réplica, fixadas com lugol, ao microscópio ótico, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick, calculando a respetiva taxa de eclosão:

$$Taxa\ Eclosão\ (\%) = \frac{n^{\circ}\ larvas\ trocóforas\ eclodidas}{n^{\circ}\ oócitos\ fertilizados} \times 100$$

Larvas saudáveis apresentam capacidade natatória, sendo encontradas na coluna de água, enquanto larvas anormais, mortas ou oócitos não fecundados afundam (Castejón et al., 2022b). Por este motivo, foi efetuada a sifonagem de aproximadamente 2/3 do topo da coluna de água para um novo goblet de tamanho semelhante ao anterior. Após a sifonagem das larvas saudáveis para um novo goblet, foi adicionada a quantidade necessária para perfazer o volume anteriormente assegurado, de 20ml. Em seguida, as

réplicas foram de novo mantidas às condições anteriormente descritas até se completarem 48 horas pós fertilização.

Ao fim de 48 horas pós fertilização, efetuou-se a observação de larvas em 3 amostras de 1ml, por réplica, e respetiva contagem. É expectável que 48 horas pós fertilização as larvas encontradas já se encontrassem no estágio de velígera. Com os dados obtidos das contagens efetuadas, foi calculada a sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização.

$$\text{Sobrevivência Larvar (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ larvas contadas}}{n^{\circ} \text{ larvas total às 24h}} \times 100$$

Não foram observadas larvas vivas 48 horas pós fertilização, pelo que o ensaio encerrou neste momento.

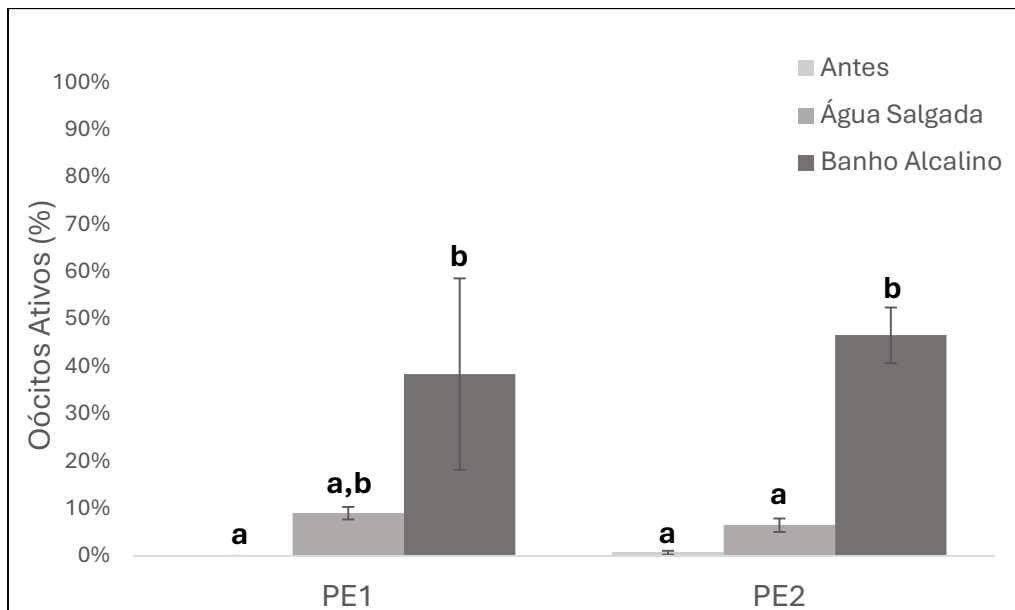
### **2.2.2. Resultados dos pré-ensaios 1 a 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos e reprodução**

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos dos pré-ensaios realizados que visaram avaliar a eficácia dos métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos (Pré- ensaios 1 e 2) e taxas de fecundação e eclosão (Pré-ensaio 3).

#### **2.2.2.1. Pré-ensaios 1 e 2: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos**

Nos pré-ensaios realizados a 14 de fevereiro de 2025 (PE1), 27 de fevereiro de 2025 (PE2) e 2 de março de 2025 (PE3), foi comparada a percentagem de oócitos ativos dos tratamentos realizados: Antes da indução da maturação dos oócitos (Antes), após a maturação em água salgada (Água Salgada) e após a maturação com o banho alcalino (Banho Alcalino).

No pré-ensaio PE1 (Figura 12), não se observaram oócitos ativos no tratamento Antes, enquanto a maturação em Água Salgada resultou num ligeiro aumento, sem diferenças significativas ( $p = 0,517$ ). Já o tratamento Banho Alcalino levou a uma percentagem de oócitos ativos significativamente superior à registada no tratamento Antes ( $p = 0,019$ ), não demonstrando diferenças significativas quando comparado com Água Salgada ( $p = 0,517$ ), apesar de ligeiramente superior.



**Figura 12.** Percentagem de oócitos ativos (média  $\pm$  DP) obtida nos pré-ensaios PE1 e PE2, antes da indução da maturação (Antes), após a maturação em água salgada durante 45 minutos (Água Salgada) e após a maturação em banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%), pH 9,0, durante 10 minutos (Banho Alcalino) ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ( $p < 0,05$ ).

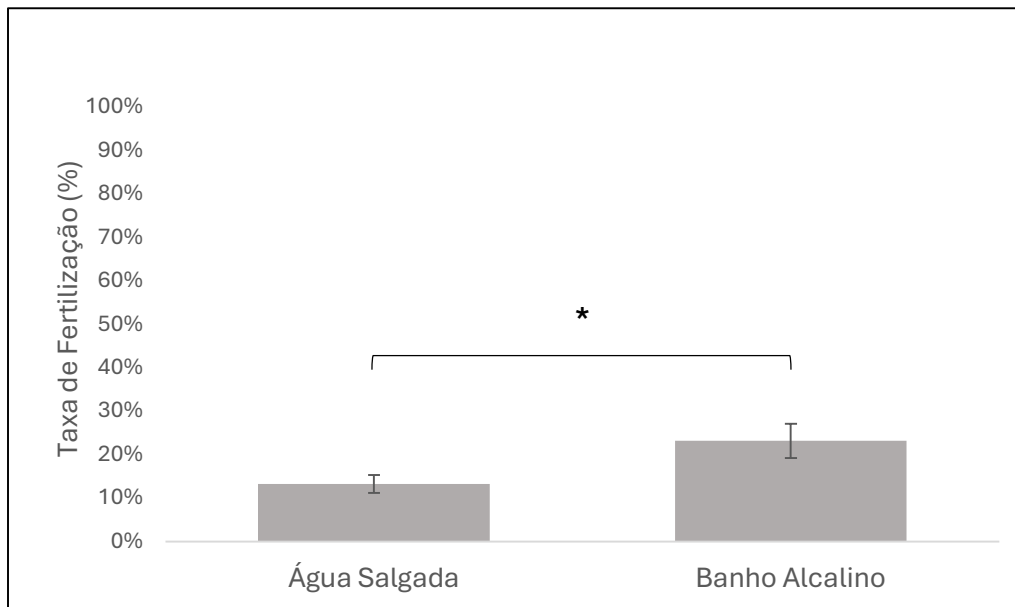
No pré-ensaio PE2 (Figura 12), a percentagem de oócitos ativos no tratamento antes não foi significativamente diferente ( $p = 0,191$ ) da obtida com o tratamento Água Salgada. Em contraste, a maturação via Banho Alcalino resultou numa taxa de oócitos ativos significativamente superior à registada Antes do tratamento ( $p < 0,001$ ), bem como à obtida com o uso de Água Salgada ( $p < 0,001$ ).

Deste modo, o contacto dos oócitos com a água salgada durante 30 minutos não forneceu nenhum benefício relevante na percentagem de oócitos ativos quando comparado com a correspondente à obtida antes do início da metodologia de indução de maturação. Já o uso de banho alcalino  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10 minutos; pH 9,0) demonstrou promover uma percentagem de oócitos ativos superior à existente antes da sua implementação e à correspondente à maturação em água salgada.

#### 2.2.2.2. Pré-ensaio 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a reprodução

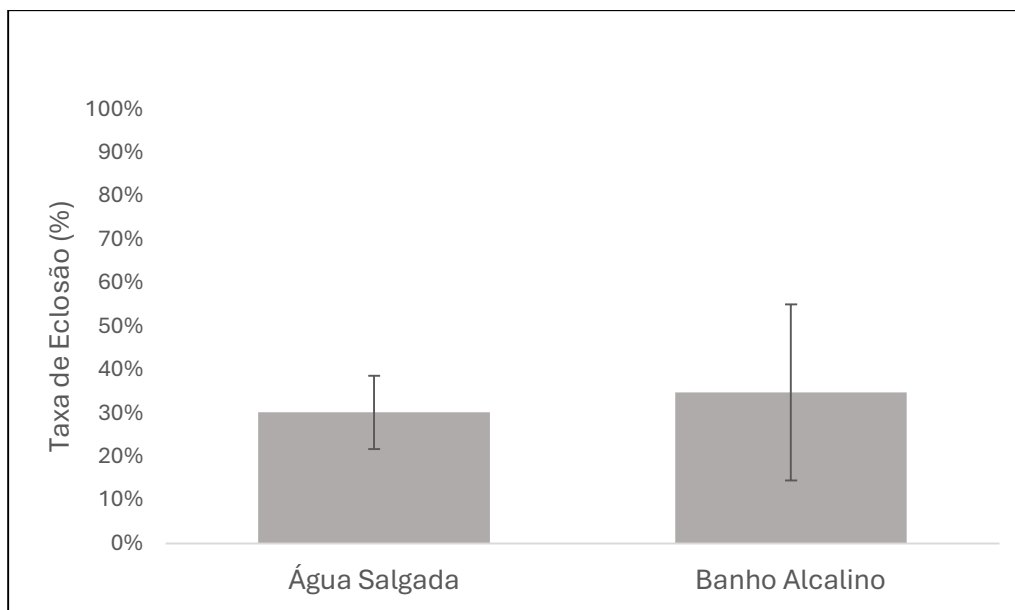
No pré-ensaio iniciado a 2 de março de 2025 (PE3), foram comparadas as taxas de fertilização e eclosão resultantes da maturação de oócitos em Água Salgada e em Banho Alcalino.

A reprodução com oócitos maturados em Água Salgada resultou em uma taxa de fertilização significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) à correspondente ao uso de Banho Alcalino.



**Figura 13.** Taxa de fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, obtida no pré-ensaio PE3, resultante da indução da maturação dos oócitos em água salgada durante 45 minutos (Água Salgada) e uso de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%), pH 9,0, durante 10 minutos (Banho Alcalino) ( $n = 3$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

A maturação de oócitos em Água Salgada originou uma taxa de eclosão de  $30,18 \pm 8,44\%$  (Figura 14), enquanto a maturação com uso de Banho Alcalino resultou em uma taxa de eclosão de  $34,79 \pm 20,26\%$ , sem diferenças significativas entre tratamentos ( $p = 0,542$ ).



**Figura 14.** Taxa de eclosão (média  $\pm$  DP), em percentagem, obtida no pré-ensaio PE3, resultante da indução da maturação dos oócitos em água salgada durante 45 minutos (Água Salgada) e uso de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%), pH 9,0, durante 10 minutos (Banho Alcalino) ( $n = 3$ ).

Não foi observada sobrevivência larvar em nenhum dos tratamentos.

Os resultados demonstram que o uso de banho alcalino leva a um aumento na taxa de fertilização, mas não impacta a taxa de eclosão. Deste modo, com base nos resultados obtidos, os oócitos utilizados para os próximos ensaios de reprodução de *P. depressa* neste trabalho terão a sua maturação induzida através de um banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a pH 9,0, durante 10 minutos.

### 2.2.3. Pré-ensaios 4 a 6: Água, temperatura e tempo de fertilização ideal à reprodução e desenvolvimento larvar

Os pré-ensaios iniciados nos dias 15 de abril de 2025 (PE4), 13 de maio de 2025 (PE5) e 30 de maio de 2025 (PE6) tiveram como objetivo comparar o efeito de duas águas de diferentes composições físico-químicas sobre a reprodução de *P. depressa*, determinando qual a mais indicada para os próximos ensaios de reprodução. As águas em estudo são:

- 1) Água do Furo: proveniente do Furo de água salgada existente no edifício CETEMARES, em Peniche. A água é captada com uma bomba em profundidade, passa por uma série de filtros de cartuchos e UV e é

posteriormente armazenada num depósito de areia. Esta água, depois de autoclavada, possui uma salinidade de  $35 \pm 1$ .

- 2) Água da Docapesca: proveniente, como o nome indica, das instalações da Docapesca, situadas no Porto de Peniche. Nas instalações da Docapesca, a água é tratada com hipoclorito de sódio e, quando chega ao edifício CETEMARES passa por um sistema de UV. Devido ao tratamento com hipoclorito de sódio, esta água possui um teor de cloro superior à água do Furo e, de modo a remover o cloro presente na água, a água passa por arejamento forte durante pelo menos 24h. Adicionalmente, a salinidade, depois de autoclavada, é de  $39 \pm 1$ .

Adicionalmente, e apenas no pré-ensaio PE6, foram comparadas duas condições de temperatura (16 e 18°C) e dois momentos de avaliação de fertilização (3 e 4 horas pós fertilização), de modo a identificar a temperatura mais favorável à reprodução e se há diferenças na taxa de eclosão 3 e 4 horas pós fertilização.

Toda a água utilizada até ao momento da fecundação foi proveniente do Furo, a uma salinidade de 35, determinada com o auxílio de um refratómetro para água do mar (Hanna Instruments, HI96822, Portugal).

A recolha de lapas nos dias 15 de abril de 2025 (PE4), 13 de maio de 2025 (PE5) e 30 de maio (PE6) foi realizada na Praia do Portinho da Areia Sul. A informação relativa ao número de indivíduos recolhidos foi compilada na Tabela IV.

**Tabela IV.** Lapas obtidas nas recolhas de 15 de abril de 2025 (PE4), 13 de maio de 2025 (PE5) e 30 de maio de 2025 (PE6), com indicação do número de indivíduos pertencentes à espécie *P. depressa*, a outras espécies e número de mortos.

Data de Recolha	Indivíduos Recolhidos			
	<i>P. depressa</i>	Outras Espécies	Mortos	Total
PE4	59	2	0	61
PE5	60	0	1	61
PE6	75	3	1	79

Já em laboratório, procedeu-se com a dissecação das lapas recolhidas de modo a determinar o seu sexo e estágio de maturação (Tabela V). Para proceder com os pré-ensaios, foram utilizadas todas as gónadas masculinas e femininas que se encontrassem no estágio V e IV.

**Tabela V.** Classificação das lapas recolhidas nos dias 15 de abril de 2025 (PE4), 13 de maio de 2025 (PE5) e 30 de maio de 2025 (PE6) quanto ao seu estado de maturação, de acordo com Orton et al. (1956).

Pré-ensaio	Classificação										
	Neutro	Machos (♂)					Fêmeas (♀)				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
PE4	0	2	8	13	8	1	7	6	7	5	2
PE5	0	1	0	9	14	11	0	2	9	7	7
PE6	0	1	0	10	23	11	0	0	11	7	12

Os gâmetas masculinos (ponto 2.2.1.2) e femininos (ponto 2.2.1.1) foram recolhidos e filtrados conforme descrito anteriormente.

Os espermatozoides do pré-ensaio PE4 foram incubados durante 45 minutos numa sala de temperatura controlada a  $18,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , enquanto para PE5, foram mantidos a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , através de banho-maria numa caixa de plástico com água arrefecida com o auxílio de um chiller (Hailea, HC-300A, Hailea Group). Já os espermatozoides do pré-ensaio PE6 foram divididos em dois goblets, e, em seguida, um foi incubado numa sala de temperatura controlada a  $18,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , enquanto o outro foi mantido num banho-maria a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . A maturação dos oócitos foi induzida através de um banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) (Acros Organic), pH de 9,0, durante 10 minutos, conforme descrito no ponto 2.2.1.1, a  $18,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (PE4 e PE6) ou  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (PE5 e PE6), tal como descrito para os espermatozoides.

Após a maturação dos gâmetas, foram calculadas as respetivas concentrações. Três amostras de espermatozoides de 20 $\mu\text{l}$ , previamente diluídas 1:1000 e fixadas com lugol (Acros Organic), foram observadas ao microscópio ótico (ZEISS, Primostar 3, Carl ZEISS Microscopy GmbH), com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Marienfeld,

Neubauer-improved, Alemanha), contabilizando os espermatozoides presentes nos quatro quadrados das extremidades da grelha. A concentração de oócitos foi calculada através da observação de amostras de 1ml ao microscópio ótico, com uma diluição de 1:100 no PE4 e de 1:500 para PE5 e PE6, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick (Pyser-SGI, S52, Reino Unido). A concentração de oócitos obtida está exposta na (Tabela VI).

**Tabela VI.** Concentração de espermatozoides e oócitos obtida correspondente a cada pré-ensaio.

<b>Pré-ensaio</b>	<b>Concentração de espermatozoides (espermatozoides/ml)</b>	<b>Concentração de oócitos (oócitos/ml)</b>
PE4	$1,27 \times 10^9 \pm 1,89 \times 10^8$	$1,64 \times 10^3 \pm 6,09 \times 10^2$
PE5	$9,28 \times 10^9 \pm 1,54 \times 10^9$	$3,89 \times 10^3 \pm 5,30 \times 10^2$
PE6	$1,06 \times 10^9 \pm 2,70 \times 10^9$	$8,27 \times 10^3 \pm 4,16 \times 10^2$

Para dar início à reprodução em PE4 e PE5, foram utilizados 6 goblets por ensaio, enquanto para PE6 foram utilizados 12 goblets. Foram adicionados os gâmetas a cada goblet de modo que a concentração final das mesmas fosse de 200 oócitos/ml e  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml (Pérez et al., 2016). Em seguida, em metade dos goblets adicionou-se água da Furo e nos restantes água da Docapesca (38 de salinidade), perfazendo até ao volume pretendido. Em seguida, os goblets contendo os gâmetas de PE4 e metade dos correspondentes a PE6 foram incubados durante 180 minutos numa sala de temperatura controlada a  $18,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Os restantes goblets de PE6 e os de PE5 foram incubados durante 180 minutos a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  em banho-maria numa caixa com água arrefecida com ajuda de um chiller. Todas as réplicas foram mantidas em condições estáticas.

Após o tempo de incubação, as soluções foram filtradas com um crivo de  $41\mu\text{m}$ , de modo a reter os oócitos e deixando passar os espermatozoides, e lavadas abundantemente com água salgada correspondente à água utilizada para a fecundação (salinidade da água do Furo a 35; salinidade da água da Docapesca a 38) de modo a

remover a totalidade dos espermatozoides. Em seguida, os oócitos foram ressuspendidos num goblet semelhante ao utilizado para a sua incubação e com volume igual ao inicial. Após as 3 horas de espera, foi determinada a taxa de fertilização através da contagem de oócitos em três amostras de 1ml por réplica, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick e microscópio ótico. A taxa de fertilização dos oócitos do PE6 voltou a ser calculada 4 horas pós fertilização, repetindo-se o processo anteriormente descrito.

Em seguida, os goblets foram mantidos nas mesmas condições de temperatura utilizadas para a incubação da solução de oócitos e espermatozoides e sem arejamento até ao fim dos ensaios, com fotoperíodo 12/12. Note-se que a variação correspondente ao pré-ensaio PE4 entre as 48hPF e 72hPF é desconhecida devido a uma avaria no sistema de ar condicionado e que o cultivo de PE6 mantido a 18,0°C teve uma variação alta ( $\pm 2,0^\circ\text{C}$ ) devido a, novamente, uma avaria no sistema entre as 24h e 48hPF.

Após 24 horas da fertilização, foi determinada a taxa de eclosão, através da contabilização das larvas trocóforas eclodidas de três amostras de 1ml por réplica, fixadas com lugol, ao microscópio ótico, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick. Posteriormente, as larvas saudáveis, que se encontram no topo da coluna de água, foram sifonadas para goblets recém autoclavados, seguido de adição de água aos novos recipientes até obter o volume anteriormente assegurado.

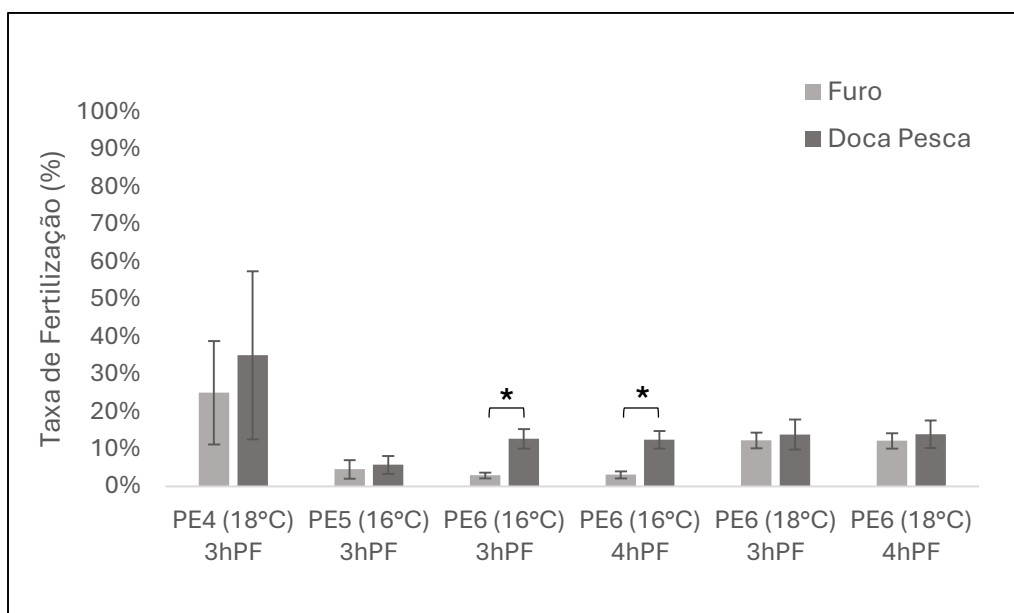
Ao fim de 48 horas após o início da fertilização, repetiu-se o mesmo processo de amostragem, observando e contabilizando as larvas sobreviventes de modo a determinar a respetiva taxa de sobrevivência larvar.

Em seguida, o topo da coluna de água voltou a ser sifonado para novos goblets, tal como realizado às 24 horas pós fertilização.

Decorridas 72 horas pós fertilização, voltaram-se a observar amostras de 1ml na câmara de Sedgewick ao microscópio, previamente fixadas com lugol, de modo a contar as larvas sobreviventes para ser possível calcular a sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização. Os ensaios terminaram após este momento.

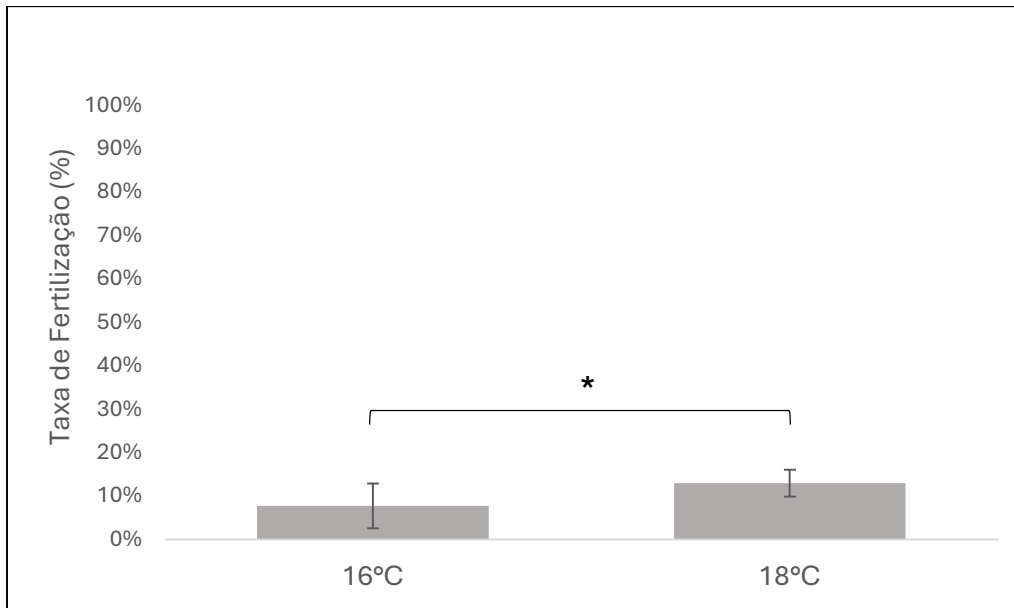
## 2.2.4. Resultados dos pré-ensaios 4 a 6: Água, temperatura e tempo de fertilização ideal à reprodução e desenvolvimento larvar

A taxa de fertilização (Figura 15) correspondente ao pré-ensaio PE4 não demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,190$ ). No PE5, a origem da água não resultou, novamente, em diferenças significativas entre as respectivas taxas de fertilização ( $p = 0,303$ ). Em contrapartida, no pré-ensaio PE6, a 16°C a taxa de fertilização 3 horas pós fertilização correspondente ao uso de água da Docapesca levou a uma taxa de fertilização significativamente superior ( $p < 0,001$ ) à correspondente ao uso de água do Furo. O mesmo aconteceu para o mesmo ensaio, 16°C, relativamente à taxa de fertilização 4 horas pós fertilização ( $p < 0,001$ ). No PE6, 18°C, a taxa de fertilização 3 horas pós fertilização não sofreu ( $p = 0,320$ ) variações significativas de acordo com a origem da água, bem como não houve diferenças significativas de acordo com este parâmetro na taxa de fertilização 4 horas pós fertilização ( $p = 0,228$ ). Adicionalmente, não se verificaram diferenças significativas entre a taxa de fertilização 3 horas pós fertilização e 4 horas pós fertilização ( $p = 0,928$ ).



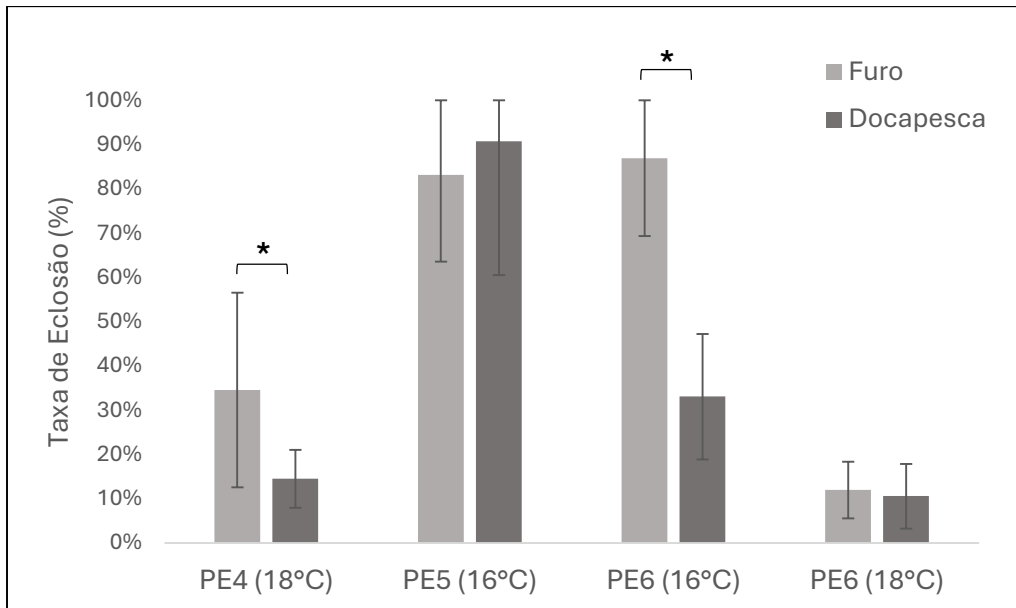
**Figura 15.** Taxa de fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes origens, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes ensaios efetuados e horas pós fertilização, 3hPF e 4hPF ( $n = 3$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

A nível da variação da taxa de fertilização em função da temperatura no pré-ensaio PE6 (Figura 16), a taxa de fertilização resultante da incubação a 16°C demonstrou ser significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) à obtida a 18°C.



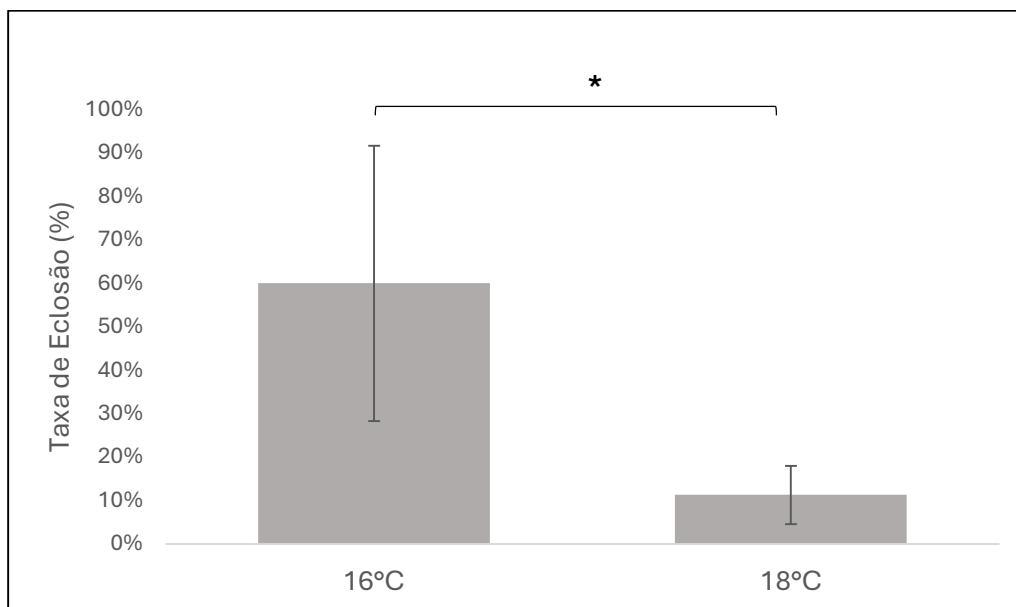
**Figura 16.** Taxa de fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, correspondente ao pré-ensaio PE6, resultante da incubação a diferentes temperaturas, 16 e 18°C ( $n = 12$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

No pré-ensaio PE4, a utilização de água do Furo resultou numa taxa de eclosão (Figura 17) significativamente superior ( $p = 0,027$ ) à correspondente à água da Docapesca. Em contrapartida, no pré-ensaio PE5, a utilização de águas de diferentes origens não provocou diferenças significativas entre as respetivas taxas de eclosão ( $p = 0,605$ ). Semelhante ao obtido no ensaio E4, no ensaio E6, a 16°C, o uso de água do Furo resultou em diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) com aquela correspondente ao uso de água da Docapesca. No entanto, à temperatura de 16°C do ensaio E6, a origem da água não levou a diferenças significativas ( $p = 0,675$ ) na taxa de eclosão.



**Figura 17.** Taxa de eclosão (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes composições, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes pré-ensaios efetuados ( $n = 3$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

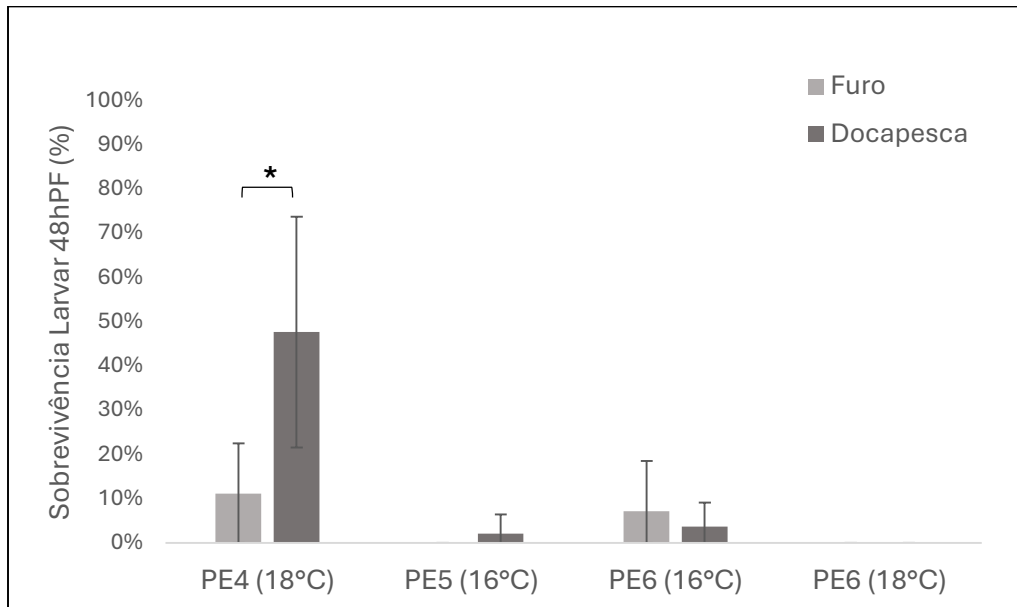
Adicionalmente, a taxa de eclosão no pré-ensaio PE6 (Figura 18), foi significativamente superior ( $p < 0,001$ ) para a temperatura de 16°C, que a obtida com incubação a de 18°C.



**Figura 18.** Taxa de eclosão (média  $\pm$  DP), em percentagem, correspondente ao pré-ensaio PE6, resultante da incubação a diferentes temperaturas, 16 e 18°C ( $n = 6$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

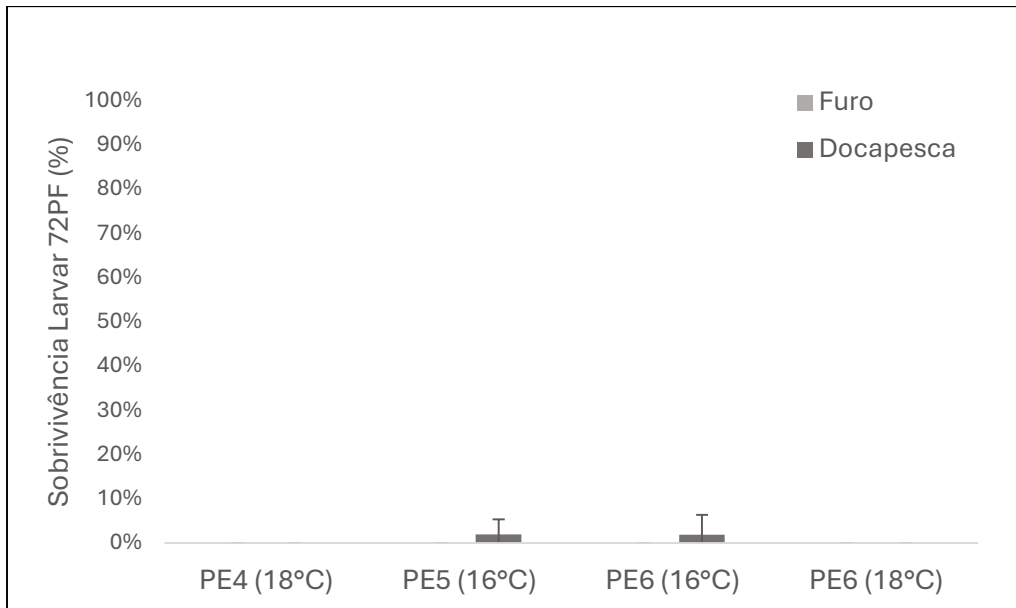
A sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização (Figura 19) do ensaio PE4 foi significativamente superior quando se recorreu ao uso de Docapesca ( $p = 0,003$ ) do que

comparativamente à obtida para o uso da água do Furo. Em PE5, a sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização foi nula para o uso de água do Furo e de  $2,1 \pm 4,4\%$  quando se usou água da Docapesca. Para PE6, a sobrevivência larvar a  $18^\circ\text{C}$  foi nula para ambas as origens das águas. Para PE6 a  $16^\circ\text{C}$ , a origem da água não levou a diferenças significativas ( $p = 0,730$ ) na sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização.



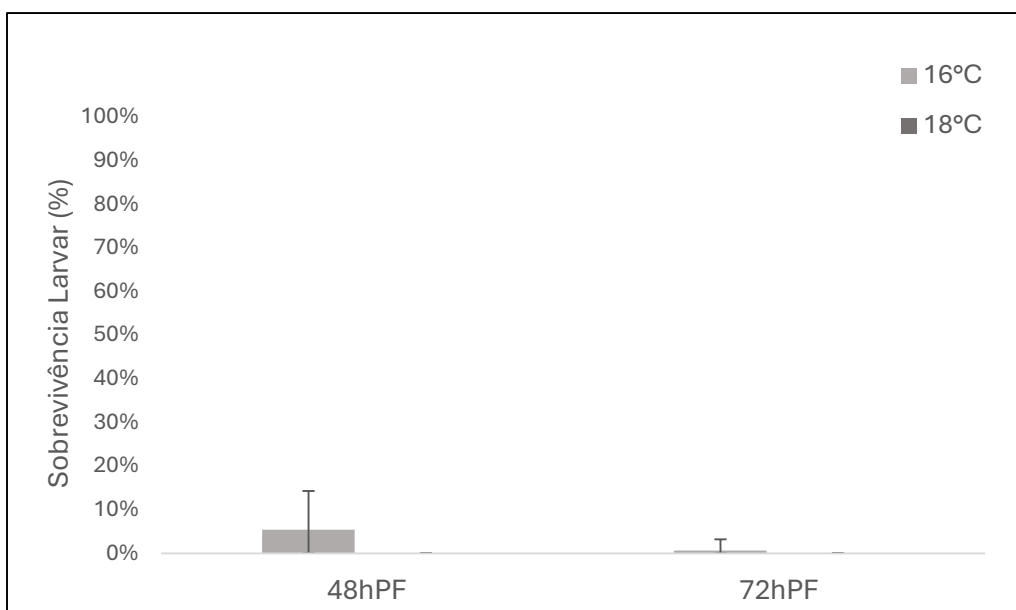
**Figura 19.** Sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes composições, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes pré-ensaios efetuados ( $n = 3$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

Por fim, a sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização (Figura 20) foi somente observada nos ensaios PE4 com o tratamento Docapesca e PE6 no tratamento Docapesca, a  $16^\circ\text{C}$ .



**Figura 20.** Sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultante do uso de águas de diferentes composições, Docapesca e Furo, correspondentes aos diferentes pré-ensaios efetuados ( $n = 3$ ).

A sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização (Figura 21) correspondente a 18°C foi nula, bem como a sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização, enquanto para 16°C, verificou-se sobrevivência larvar em ambos os momentos, ainda que baixa. Note-se que, devido a uma avaria no ar condicionado que assegurava a manutenção da temperatura do cultivo a 18°C, a temperatura chegou a atingir 20°C, podendo ter interferido negativamente na sobrevivência das larvas sujeitas a esta temperatura.



**Figura 21.** Sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização (48hPF) e 72 horas pós fertilização (72hPF) (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultante da incubação a diferentes temperaturas, 16 e 18°C ( $n = 6$ ).

De um modo geral, o uso de água da Docapesca demonstrou levar a um aumento na taxa de fertilização comparativamente ao uso de água do Furo. Adicionalmente, demonstrou levar a uma maior taxa de sobrevivência, bem como foi a única que levou à sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização. No entanto, a respetiva taxa de eclosão é inferior à obtida utilizando a água do Furo. De uma forma geral, a água da Docapesca demonstrou otimizar alguns parâmetros da reprodução de *P. depressa*, pelo que os próximos ensaios farão uso desta água.

Não houve diferenças entre as taxas de fertilização a 3 e 4 horas pós fertilização, de modo que nos próximos ensaios deve ser somente avaliada a taxa de fertilização 3 horas pós fertilização, encurtando ligeiramente o tempo associado à execução do protocolo.

Por fim, a temperatura escolhida para a reprodução de *P. depressa* mostrou ter efeitos sobre o sucesso desta, onde a reprodução a 16°C demonstrou levar a uma menor taxa de fertilização e, simultaneamente, a uma maior taxa de eclosão. Adicionalmente, apenas se verificou sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização a esta temperatura. Deste modo, os próximos ensaios serão executados a 16°C.

## 2.3. Ensaio

Nesta secção encontram-se descritas as metodologias dos ensaios 1 (E1) e 2 (E2).

O ensaio E1 visa determinar a concentração de oócitos inicial (100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml) e regime de alimentação (sem alimentação e com alimentação), ideais à reprodução e desenvolvimento larvar de *P. depressa*.

O ensaio E2 tem como objetivo determinar qual o tipo de biofilme que permite a melhor taxa de assentamento de larvas de *P. depressa* (sem biofilme (controlo negativo), biofilmes de *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* e biofilme obtido através da imersão das placas em tanques de cultivo de *Holothuria* sp.).

### 2.3.1. Ensaio E1: Efeito da concentração de oócitos inicial e alimentação às 48 horas pós fertilização

A água utilizada durante esta metodologia encontrava-se a 35 de salinidade, determinada com o auxílio de um refratómetro para água do mar (Hanna Instruments, HI96822, Portugal).

Para este ensaio, foram recolhidas 102 lapas na Praia do Portinho de Areia Sul no dia 10 de junho de 2025, das quais 97 pertenciam à espécie *P. depressa*, 2 pertenciam a outras espécies e 3 encontravam-se mortas. Os indivíduos vivos da espécie *P. depressa* foram dissecados de modo a revelar a gónada, sendo possível classificá-la quanto ao sexo e estágio de maturação (Tabela VII). Para proceder com o ensaio, foram utilizadas todas as gónadas masculinas e femininas no estágio V e IV.

**Tabela VII.** Classificação das lapas recolhidas no dia 10 de junho de 2025, de acordo com Orton et al. (1956).

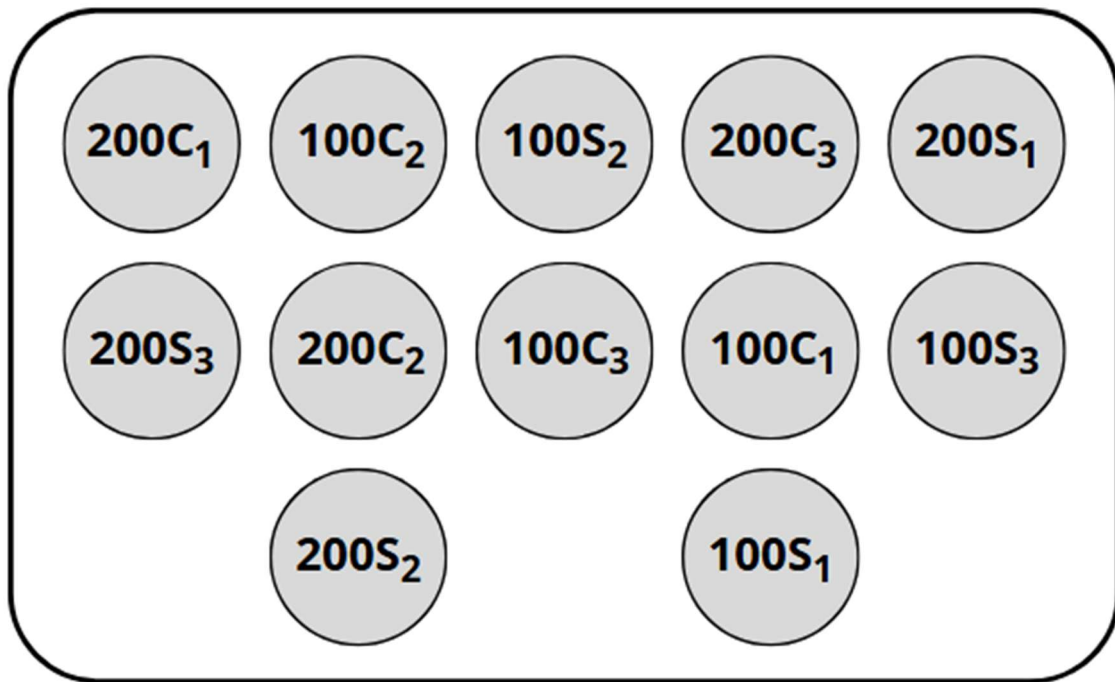
Classificação										
Neutro	Machos (♂)					Fêmeas (♀)				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
0	1	5	19	24	9	3	7	12	13	4

Os espermatozoides foram obtidos conforme descrito no ponto 2.2.1.2 e, em seguida, o globet contendo a solução de espermatozoides foi mantido em condições estáticas a  $16,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , através de banho-maria numa caixa de plástico com água arrefecida com o auxílio de um chiller (Hailea, HC-300A, Hailea Group).

Os oócitos obtidos conforme a metodologia do ponto 2.2.1.1. Adicionalmente, foram maturados com um banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) (Acros Organic), também descrito no ponto 2.2.1.1, a  $16,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria.

Após a maturação dos gâmetas, foram calculadas as respectivas concentrações. Três amostras de espermatozoides de  $20\mu\text{l}$ , previamente diluídas 1:1000 e fixadas com lugol (Acros Organic), foram observadas, com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Neubauer-improved, Alemanha), ao microscópio ótico (ZEISS, Primostar 3, Carl ZEISS Microscopy GmbH), contabilizando os espermatozoides presentes nas quatro quadrados das extremidades da grelha. A concentração de oócitos foi determinada através da observação de amostras de 1ml ao microscópio ótico, com uma diluição de 1:500, fazendo uso de uma câmara de Sedgewick (Pyser-SGI, S52, Reino Unido). Foi obtida uma concentração de  $1,08 \times 10^{10} \pm 1,04 \times 10^9$  espermatozoides/ml e  $8,68 \times 10^4 \pm 1,36 \times 10^4$  oócitos/ml.

Foram utilizados 12 goblets, onde em 6 deles foram adicionados gâmetas de modo que a concentração final fosse de 100 oócitos/ml e  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml, enquanto para os restantes foram asseguradas as concentrações de 200 oócitos/ml e  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml. Os goblets foram incubados 180 minutos, em condições estáticas e a  $16,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria, com distribuição aleatória (Figura 22).



**Figura 22.** Distribuição aleatória dos goblês durante o ensaio sujeitos às diferentes condições de concentração inicial de oócitos (100 – 100 oócitos/ml; 200 – 200 oócitos/ml), regime de alimentação (S – sem alimentação; C – com alimentação). Os números subscritos (1, 2 e 3) indicam o número da réplica correspondente a cada tratamento.

Após o tempo de incubação, as soluções foram filtradas com um crivo de 41 $\mu$ m, retendo somente os oócitos e deixando passar os espermatozoides, seguida da lavagem dos oócitos com água salgada, removendo os restantes espermatozoides. Os oócitos foram ressuspendidos num goblet semelhante ao utilizado para a sua incubação e com volume igual ao inicial. Em seguida, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick, foram observadas amostras de 1ml por réplica ao microscópio ótico, contabilizando os oócitos fecundados de modo a determinar a taxa de fertilização.

Os goblês foram novamente mantidos sem arejamento a  $16,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e com fotoperíodo 12/12, até ao fim do ensaio, com distribuição igual à utilizada durante a fecundação.

24 horas após a fertilização, foi determinada a taxa de eclosão, através da contabilização das larvas trocóforas existentes em três amostras de 1ml por réplica ao microscópio ótico, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick para a observação e lugol para a fixação das larvas. Em seguida, foi sifonado o topo da coluna de água dos goblês de modo a transferir as larvas saudáveis para goblês recém esterilizados, adicionando água até perfazer o volume inicial. Os novos goblês contendo as larvas saudáveis voltaram a ser incubados até ao dia seguinte.

Ao fim de 48 horas após o início da fertilização, repetiu-se o mesmo processo de amostragem, observando e contabilizando as larvas sobreviventes de modo a determinar a respectiva taxa de sobrevivência larvar, seguido da sifonagem das larvas saudáveis para um novo goblet. Neste momento, foram adicionadas 500 microalgas de *Phaeodactylum* por larva como alimento em metade dos goblets, enquanto a outra metade permaneceu sem alimentação (Tabela VIII).

**Tabela VIII.** Concentração de oócitos inicial utilizada para o início da reprodução (100 oócitos/ml ou 200 oócitos/ml) e alimentação com *Phaeodactylum tricornutum* iniciada 48 horas após a fertilização (com alimentação ou sem alimentação), de três réplicas cada.

<b>Etiqueta</b>	<b>Concentração (oócitos/ml)</b>	<b>Alimentação</b>	<b>Número da réplica</b>
100S <sub>1</sub>	100	Sim	1
100S <sub>2</sub>	100	Sim	2
100S <sub>3</sub>	100	Sim	3
100C <sub>1</sub>	100	Não	1
100C <sub>2</sub>	100	Não	2
100C <sub>3</sub>	100	Não	3
200S <sub>1</sub>	200	Sim	1
200S <sub>2</sub>	200	Sim	2
200S <sub>3</sub>	200	Sim	3
200C <sub>1</sub>	200	Não	1
200C <sub>2</sub>	200	Não	2
200C <sub>3</sub>	200	Não	3

Ao fim de 72 horas pós fertilização, a sobrevivência larvar voltou a ser calculada, recorrendo à metodologia utilizada às 48 horas pós fertilização. Os ensaios terminaram quando se completaram 72 horas pós fertilização.

### 2.3.2. Ensaio E2: Assentamento larvar em diferentes biofilmes

No dia 24 de junho de 2025, foram recolhidas 204 lapas na Praia do Portinho de Areia Sul, das quais 196 indivíduos pertenciam à espécie *P. depressa*, 7 pertenciam a outras espécies e por isso foram descartados e 1 indivíduo encontrava-se morto. O pé das lapas vivas foi removido, revelando a gónada de modo a ser possível classificá-la quanto ao sexo e estágio de maturação (Tabela IX). Foram utilizadas todas as gónadas masculinas e femininas no estágio V e IV para dar início à reprodução.

**Tabela IX.** Classificação das lapas recolhidas no dia 24 de junho de 2025, de acordo com Orton et al. (1956).

Classificação										
Neutro	Machos (♂)					Fêmeas (♀)				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
0	7	21	36	45	15	4	15	13	29	10

Os espermatozoides foram recolhidos e filtrados (2.2.1.2), seguidos de maturação durante 45 minutos em condições estáticas a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , através de banho-maria numa caixa de plástico com água arrefecida com o auxílio de um chiller (Hailea, HC-300A, Hailea Group).

Os oócitos, foram recolhidos, filtrados e maturados com um banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) (Acros Organic), conforme descrito em 2.2.1.1., a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , em banho-maria, semelhante ao descrito para a maturação dos espermatozoides.

Três amostras de espermatozoides de 20µl, previamente diluídas 1:1000 e fixadas com lugol (Acros Organic), foram observadas, com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Neubauer-improved, Alemanha), ao microscópio ótico (ZEISS, Primostar 3,

Carl ZEISS Microscopy GmbH), contabilizando os espermatozoides presentes nas quatro quadrados das extremidades da grelha, determinando a concentração destes. A concentração de oócitos foi determinada através da observação de amostras de 1ml, previamente diluídas 1:500, ao microscópio ótico, com o auxílio de uma câmara de Sedgewick (Pyser-SGI, S52, Reino Unido). Foi obtida uma concentração de  $5,47 \times 10^9 \pm 4,25 \times 10^8$  espermatozoides/ml e  $4,05 \times 10^4 \pm 1,73 \times 10^3$  oócitos/ml.

A reprodução foi iniciada com 100 oócitos/ml e  $1 \times 10^7$  oócitos/ml num goblet de 5L e num erlenmeyer de 5L. Estes foram levados a incubar a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , em banho-maria durante 180 minutos, em condições estáticas.

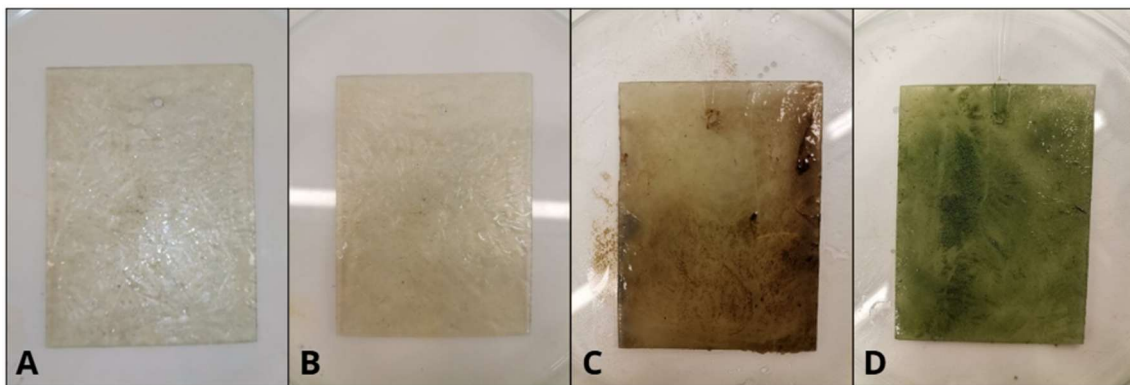
Decorridos 180 minutos, as soluções incubadas foram filtradas com uma rede de malha de  $41\mu\text{m}$ , retendo os oócitos e deixando passar os espermatozoides, seguida da lavagem dos oócitos com água, contribuindo para a remoção dos restantes espermatozoides. Os oócitos foram ressuspensos em recipientes semelhantes aos iniciais que foram reenchidos até ao volume igual ao inicial. Em seguida, foram observadas amostras de 1ml por réplica, com uma câmara de Sedgewick, ao microscópio ótico, contabilizando os oócitos fecundados e obtendo uma taxa de fertilização de  $32,33 \pm 4,63\%$ .

Em seguida, os recipientes foram novamente mantidos sem arejamento, com fotoperíodo 12/12, a  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  através do uso de banho-maria.

Ao fim de 24 horas após a fertilização, foram observadas três amostras de 1ml, fixadas com lugol, numa câmara de Sedgewick por réplica, ao microscópio ótico, com contabilização das larvas trocóforas existentes o que resultou numa taxa de eclosão de  $61,29 \pm 4,44\%$ . Em seguida, foi sifonado o topo da coluna de água dos goblets de modo a transferir as larvas saudáveis para goblets recém esterilizados, adicionando água até perfazer o volume inicial. Os novos goblets contendo as larvas saudáveis voltaram a ser incubados até ao dia seguinte. Ao fim de 48 horas após o início da fertilização, repetiu-se o mesmo processo de amostragem, observando e contabilizando as larvas sobreviventes, previamente fixadas com lugol, determinando a respetiva taxa de sobrevivência larvar, seguido da sifonagem das larvas saudáveis para um novo goblet e voltaram a ser incubadas às condições anteriores de temperatura e arejamento. Ao fim de 72 horas pós fertilização, a sobrevivência larvar voltou a ser calculada, recorrendo à metodologia utilizada previamente. A sobrevivência larvar 48 e 72 horas pós fertilização foram de  $6,75 \pm 2,65\%$  e  $3,57 \pm 2,77\%$ , respetivamente.

As larvas sobreviventes 72 horas pós fertilização de ambos os recipientes foram sifonadas para um goblet de 5L. Efetuou-se o cálculo da concentração de larvas no goblet através da observação e contagem de larvas existentes em três amostras de 1ml. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e distribuída por 12 goblets de 1L, de modo a cada um conter 150 larvas.

A cada goblet foi adicionado 3 placas do mesmo tipo de biofilme (Figura 23), conforme descrito na tabela, suspensas verticalmente, com o auxílio de um fio de pesca amarrado a uma vareta de vidro, de modo a se encontrarem aproximadamente a meio do goblet e igualmente espaçadas entre si e as paredes do mesmo. O processo de obtenção dos biofilmes está descrito no ponto 2.4.2.



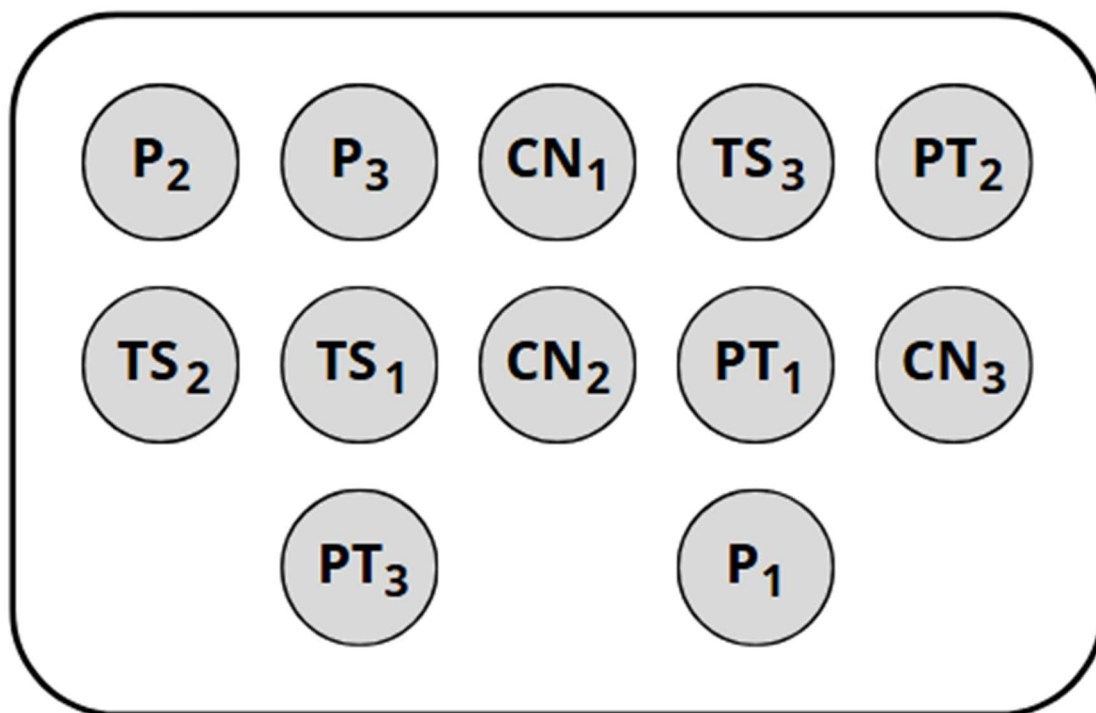
**Figura 23.** Placas de fibra de vidro com resina correspondentes ao: A – Controle negativo (sem biofilme); B – Biofilme obtido através da submersão das placas num tanque com *Holothuria sp.*; C – Biofilme de *Phaeodactylum tricornutum*; D – Biofilme de *Tetraselmis suecica*.

Em seguida, perfez-se o volume com água salgada até à marca dos 500ml (Figura 24) e manteve-se os goblets, distribuídos de forma aleatória, sem arejamento, em banho-maria a  $16,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  até ao fim do ensaio (Figura 25).



**Figura 24.** Exemplo da suspensão das placas para assentamento no goblet, com 500ml de água salgada.

Nos 5 dias seguintes, foi adicionado diariamente um volume de 100 ml de água salgada a cada goblet, até totalizar 1L de água por cada um. Neste momento, foi adicionado arejamento fraco a cada cultivo.



**Figura 25.** Distribuição aleatória dos goblets durante o ensaio, sujeitos aos diferentes biofilmes para assentamento: CN – controlo negativo (sem biofilme); P - biofilme obtido através da imersão de placas em tanques de cultivo de *Holothuria* sp; PT – biofilme de *Phaeodactylum tricornutum*; TS – biofilme de *Tetraselmis suecica*. Os números subscritos (1, 2 e 3) indicam o número da réplica correspondente a cada tratamento.

Após os primeiros 5 dias, e até ao fim do ensaio, descartou-se diariamente aproximadamente 1/4 da coluna de água através da sua sifonagem, com uma rede de 41µm na ponta inserida dentro do goblet de modo a evitar a perda de larvas. O descarte desta água foi seguido da adição do mesmo volume de água recém esterilizada.

Duas semanas após o início da fertilização, observaram-se as duas faces das placas à lupa (ZEISS, Stemi 305, Alemanha) e registou-se o número de pós-larvas assentadas existentes, permitindo o cálculo da percentagem de assentamento ocorrida através da seguinte equação:

$$\text{Assentamento (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ pós-larvas}}{n^{\circ} \text{ larvas inicial}} \times 100$$

Três semanas pós fertilização repetiu-se este processo, calculando novamente a taxa de assentamento das larvas.

O ensaio foi encerrado três semanas depois do início da fertilização.

## **2.4. Cultivos auxiliares**

### **2.4.1. Scale Up de *Phaeodactylum tricornutum***

Alguns dos ensaios requereram o uso de *Phaeodactylum tricornutum*, tanto para alimentação das larvas como para a criação de biofilme para assentamento das mesmas.

De modo a ter esta alga sempre disponível quando necessária, foi efetuado o seu cultivo. Todo o *scale up* em balões foi feito em duplicado, de modo a assegurar o acesso à microalga na eventualidade de um dos cultivos ter sofrido contaminações e, conseqüentemente, se encontrar inutilizável.

Todo o material e água utilizados nesta etapa, exceto os carboys, foram previamente autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Os carboys, contendo 10L de água, foram esterilizados através da adição e homogeneização de 4ml de hipoclorito, seguidos de um tempo de espera de no mínimo 24 horas. Após este tempo de espera, foi adicionado 10ml de tiosulfato de sódio, homogeneizado e posteriormente mantendo o carboy com arejamento forte durante no mínimo 30min, estando esterilizado e pronto a ser usado ao fim deste tempo de espera.

O cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* iniciou-se, à chama, com a adição de 15ml da microalga, que se encontrava em stock, a um balão volumétrico de 250ml contendo 85ml de água salgada, juntando a esta solução 500µl de Nutribloom (Phytobloom) e 250µl de silicatos (Phytobloom). Posteriormente, a solução foi homogeneizada e mantida durante uma semana numa sala aclimatizada a  $20,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , com arejamento forte e regime de 14h luz/10h escuro.

Ao fim de uma semana, foi observada uma amostra da solução ao microscópio com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Neubauer-improved, Alemanha), previamente fixada com lugol, verificando a não existência de contaminações do cultivo. Após esta confirmação, foi transferido 75ml da microalga em cultivo, à chama, para um novo balão volumétrico de 500ml com 425ml de água salgada, adicionando posteriormente 1ml de Nutribloom e 500µl de silicatos. Novamente, homogeneizou-se a solução e voltou-se a manter durante uma semana na sala aclimatizada a  $20,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ,

com arejamento forte e 10h luz/14h escuro. A solução do cultivo inicial que sobrou foi descartada.

Ao fim de uma semana, voltou-se a verificar a não existência de não contaminações. Posteriormente, à chama, adicionou-se 150ml de microalga do cultivo existente, 2ml de Nutribloom e 1ml de silicatos para um balão de 1L contendo 850ml de água salgada, homogeneizando a solução final. A solução resultante foi depois mantida nas condições anteriormente descritas de temperatura, luz e arejamento.

O mesmo decorreu na semana seguinte, observou-se a não existência de contaminações, adicionou-se 500ml de microalgas, 5ml de Nutribloom e 2,5ml de silicatos a um balão volumétrico contendo 4,5L de água salgada, homogeneizando a solução e mantendo a mesma durante uma semana em condições de temperatura, luz e arejamento iguais às anteriormente descritas.

Por fim, ao fim de uma semana, após a verificação da ausência de contaminações, foi transferido 3L de microalga para um carboy contendo 7L de água salgada, adicionando ainda 10ml de Nutribloom e 10ml de silicatos. Posteriormente, semelhante ao realizado com o cultivo em balões volumétricos, os carboys foram mantidos numa sala aclimatizada de  $20,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ , a regime de luz de 10h luz/14h escuro e com arejamento forte. Este cultivo podia manter-se durante 1 mês, ao final do qual era necessária a troca de carboys para higienização, repetindo-se o processo aqui descrito. Adicionalmente, sempre que necessária a remoção de um volume de cultivo para utilização no ensaio, voltou-se a adicionar ao carboy um volume de água igual ao volume de cultivo retirado, juntamente com 2ml/L de Nutribloom e 1ml/L de silicatos.

#### **2.4.2. Biofilmes**

O ensaio de assentamento larvar fez uso de biofilmes para promover o assentamento das larvas de *P. depressa*. Foram utilizados 3 biofilmes diferentes: biofilme com a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, biofilme com a microalga *Tetraselmis suecica* e biofilme resultante de inserção em tanques de *Holothuria* sp.

Foram utilizadas placas de fibra de vidro de resina, de  $80 \times 60 \times 1,5$  mm, com um furo na região central superior desta. Estas foram lavadas abundantemente com água destilada antes da sua utilização. Foram utilizadas 9 placas por tipo de biofilme.

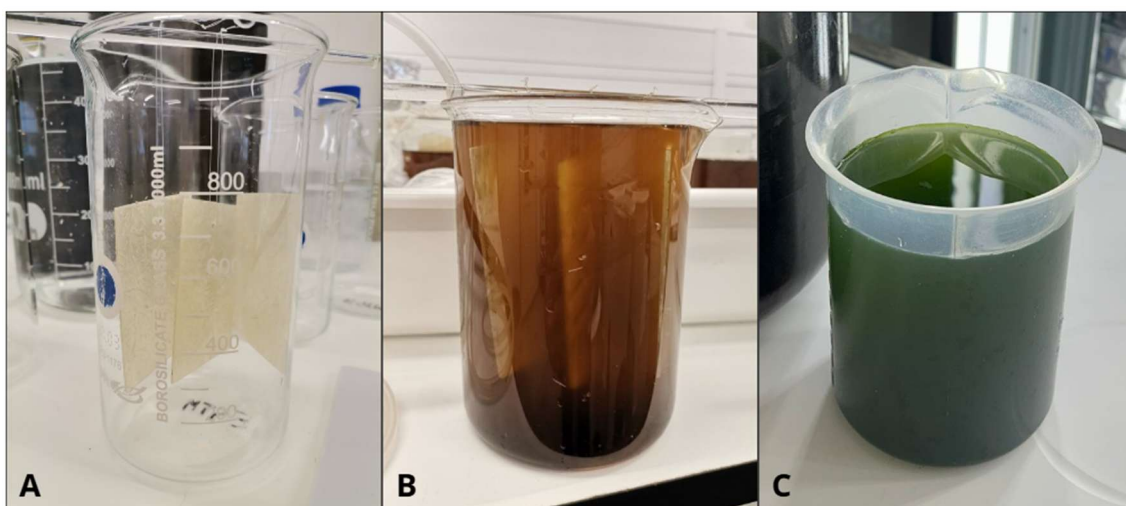
### 2.4.2.1. Biofilmes com *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis suecica*

De forma a iniciar a produção dos biofilmes, foram colocadas três placas na vertical dentro de um goblet de 600ml, penduradas numa vareta na horizontal através do uso de fio de pesca, de forma a não tocarem no fundo do recipiente e a ficarem espaçadas de modo a não se tocarem entre si nem às paredes do goblet (Figura 26A). Foram utilizadas 9 placas, distribuídas por goblets como descrito, por microalga.

Para o biofilme de *Phaeodactylum tricornutum*, transferiu-se cerca de 200ml desta diatomácea, proveniente do cultivo realizado anteriormente explicado, para o goblet contendo as placas. Seguidamente, fez-se o volume até 500 ml com água salgada da Docapesca, adicionando 1ml de Nutribloom (Phytobloom) e 500µl de silicatos (Phytobloom). No fim deste processo, o *Phaeodactylum tricornutum* encontrava-se a  $5,86 \times 10^6 \pm 5,73 \times 10^5$  células/ml.

O biofilme de *Tetraselmis suecica* foi iniciado pela transferência de cerca de 200ml da microalga para o goblet com as placas de fibra de vidro, originária de um cultivo de *Tetraselmis suecica* existente no edifício Cetemares. Em seguida, adicionou-se 300ml de água salgada e 1ml de Nutribloom. A concentração final de *Tetraselmis suecica* foi de  $7,25 \times 10^5 \pm 3,19 \times 10^5$ .

Os goblets, contendo as placas submersas na solução de microalgas e nutrientes, foram mantidos durante 10 dias numa sala aclimatada a  $20,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , a 10h luz/14h escuro, com arejamento forte, até à sua utilização no ensaio de assentamento larvar.



**Figura 26.** Estrutura concebida para gerar os biofilmes de microalgas: A – Goblet com as placas de fibra de vidro antes de adicionar a microalga; B – Goblet com placas de fibra de vidro e solução da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* ao fim de 10 dias de cultivo; C – Goblet com placas de fibra de vidro e solução da microalga *Tetraselmis suecica* ao fim de 10 dias de cultivo.

#### 2.4.2.2. Biofilmes em tanque de *Holothuria* sp.

Para este tipo de biofilme, 9 placas foram presas com fio de pesca a um tubo existente de modo a ficarem na vertical e submersas num tanque de cultivo de *Holothuria* sp. (Figura 27). As placas foram mantidas neste tanque durante 10 dias, até a sua utilização para o ensaio de assentamento larvar.



Figura 27. Placas de fibra de vidro e resina submersas no tanque de cultivo de *Holothuria* sp.

### 2.5. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, versão 29.0.0.0, EUA). O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,050$ .

A normalidade e homogeneidade dos dados foi calculada através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente.

No pré-ensaio PE1, a percentagem de oócitos ativos de cada tratamento foi analisada com um teste de Kruskal-Wallis, uma vez que não se verificou o pressuposto de distribuição normal de dados, seguido de comparações múltiplas com o teste de Dunn, com correção de Bonferroni. No pré-ensaio PE2, utilizou-se uma one-way ANOVA, seguida de comparações pairwise com o post-hoc de Tukey.

Diferenças na taxa de fertilização entre tratamentos no pré-ensaio PE3 foram analisadas através de um t-test de amostras independentes. A taxa de eclosão falhou o pressuposto de homogeneidade de variâncias, pelo que foi analisada com um Welch's test.

No pré-ensaio PE4, as taxas de fertilização correspondentes a cada água utilizada foram comparadas com um teste de Mann-Whitney U, por não se cumprir o pressuposto de

normalidade, enquanto para PE5 foi utilizado um t-test de amostras independentes. As taxas de eclosão de PE4 e PE5 foram analisadas com Welch's tests, devido à ausência de homogeneidade de variâncias. No PE6, as taxas de fertilização obtidas a 18°C às 3 e 4 horas pós-fertilização foram analisadas com t-tests de amostras independentes, enquanto as taxas equivalentes a 16°C, por falta de homogeneidade, foram comparadas com Welch's tests. As taxas de eclosão para ambas as temperaturas foram comparadas com t-tests de amostras independentes. Para o tempo ótimo de fertilização, as taxas de fertilização foram comparadas foram analisadas com Mann-Whitney U tests, devido à falta de distribuição normal e homogeneidade dos dados. Finalmente, para avaliar o efeito da temperatura sobre as taxas de fertilização e eclosão, foram utilizados um teste de Mann-Whitney U (taxas de fertilização sem distribuição normal nem homogeneidade de variâncias) e um Welch's test (taxas de eclosão sem homogeneidade de variâncias), correspondentemente.

No ensaio E1, as taxas de fertilização e a sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização, por não cumprirem o pressuposto de normalidade, foram analisadas com Mann-Whitney U para comparar as diferenças entre as concentrações de oócitos. As taxas de eclosão correspondentes às diferentes condições de concentrações de oócitos foram avaliadas com um t-test de amostras independentes. Já a sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização, por não apresentar distribuição normal, não pode ser analisada em simultâneo para os fatores concentração de oócitos e regime de alimentação com uma two-way ANOVA. Como alternativa, procedeu-se à avaliação separada de cada fator através de um teste de Kruskal-Wallis.

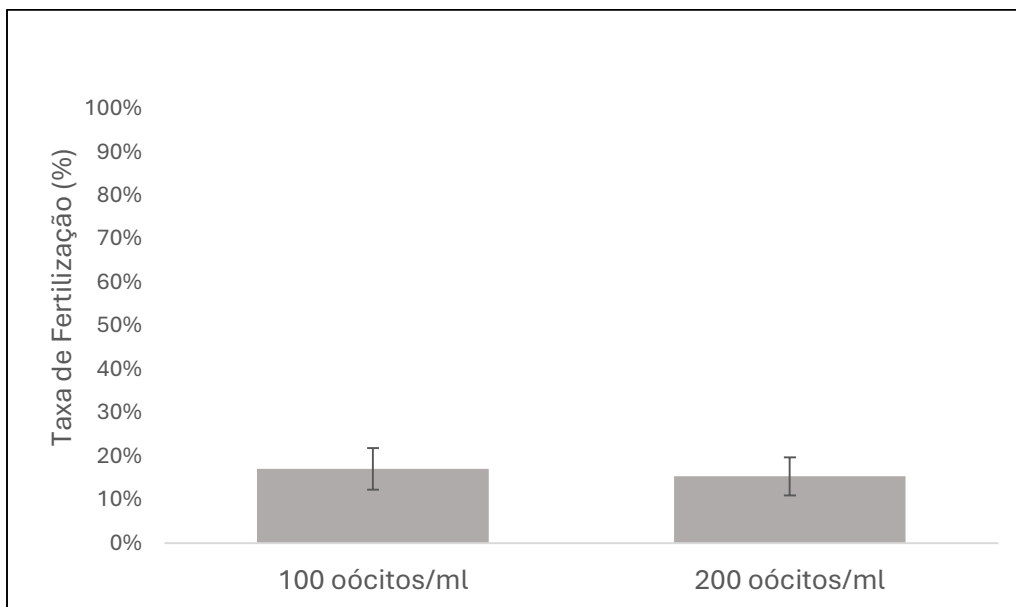
No ensaio E2 não foi possível realizar análise estatística, uma vez que os resultados obtidos foram nulos, não permitindo a execução de testes comparativos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Ensaio E1: Efeito da concentração de oócitos inicial e alimentação às 48 horas pós fertilização

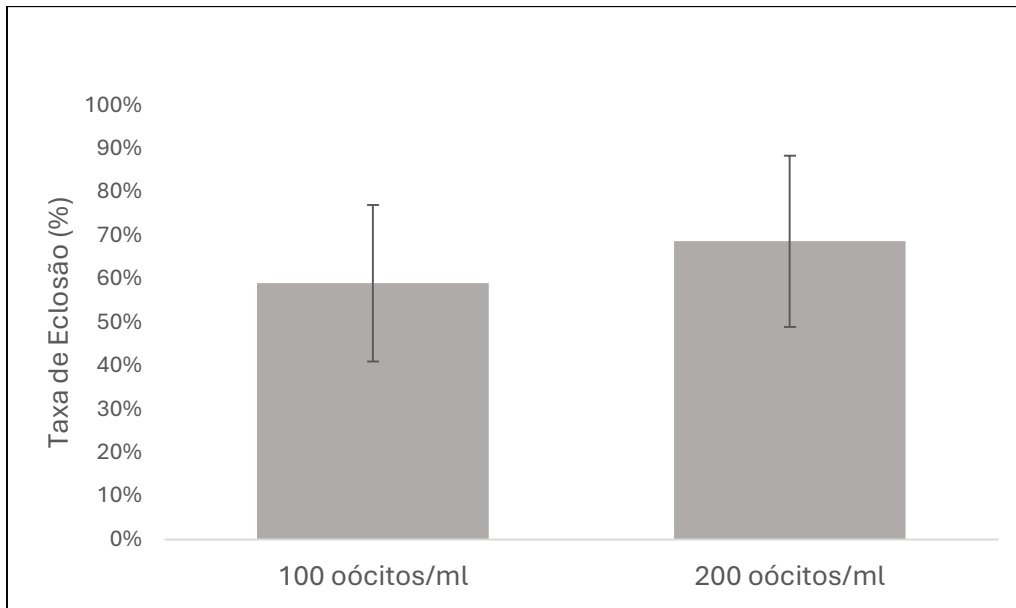
O ensaio iniciado a 10 de junho de 2025 (E1), foi realizado com o objetivo de determinar qual a concentração de oócitos inicial (100 oócitos/ml ou 200 oócitos/ml), e regime de alimentação 48 horas pós fertilização: sem alimentação ou com alimentação (com 500 microalgas de *Phaeodactylum tricornutum* por larva).

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos quanto à taxa de fertilização ( $p = 0,203$ ) (Figura 28).



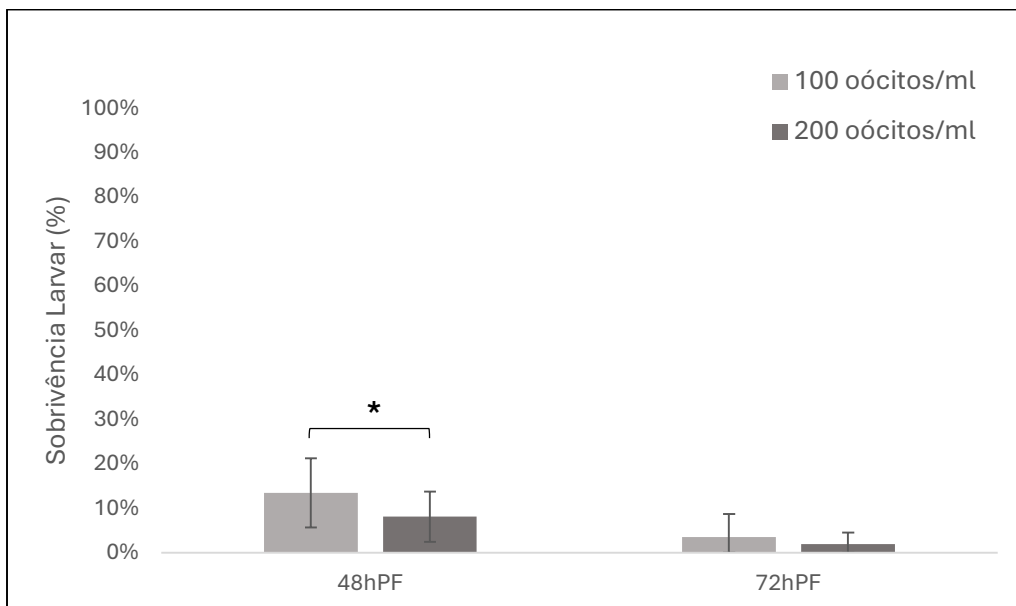
**Figura 28.** Taxa de fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultante da reprodução com concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml ( $n = 6$ ).

Também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de eclosão referentes às duas concentrações de oócitos ( $p = 0,133$ ) (Figura 29).



**Figura 29.** Taxa de eclosão (média  $\pm$  DP), em porcentagem, resultante da reprodução com concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml ( $n = 6$ ).

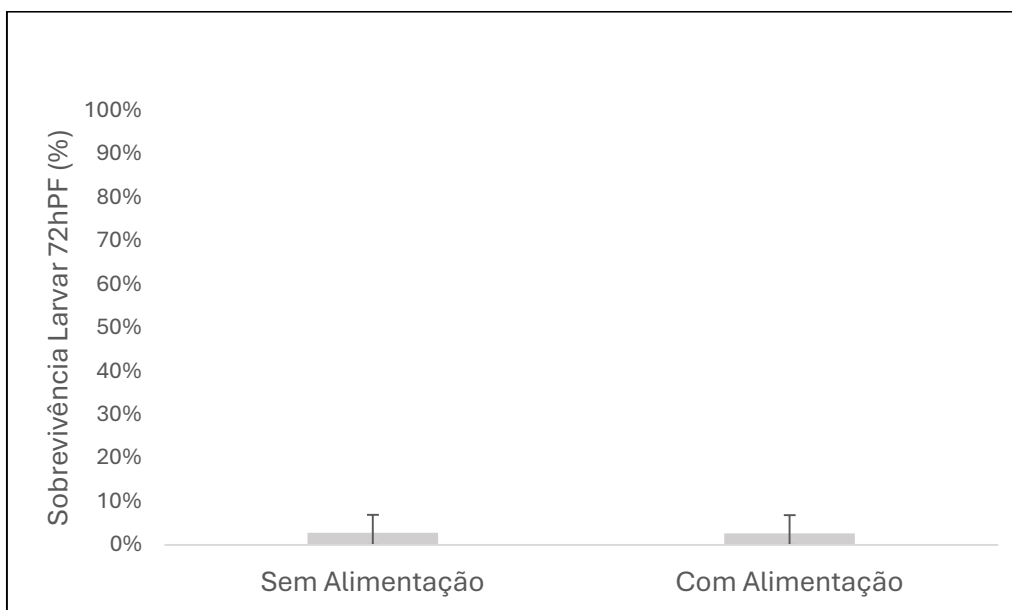
A concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml permitiu uma sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização. Relativamente à concentração de 200 oócitos/ml, sendo este resultado estatisticamente diferente do correspondente à concentração de 100 oócitos/ml ( $p = 0,019$ ) (Figura 30).



**Figura 30.** Sobrevivências larvares 48 horas pós fertilização (48hPF) e 72 horas pós fertilização (72hPF) (média  $\pm$  DP), em porcentagem, resultante da reprodução com concentração inicial de oócitos de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml ( $n = 6$ ). Resultados marcados com asterisco (\*) são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

A sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização (Figura 30) mostrou não variar significativamente ( $p = 0,719$ ) entre as concentrações iniciais de 100 oócitos/ml e 200 oócitos/ml.

Por fim, a taxa de fertilização 72 horas pós fertilização não variou significativamente entre regimes de alimentação ( $p = 0,888$ ) (Figura 31), com alimentação às 48 horas pós fertilização e sem alimentação.



**Figura 31.** Sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização (média  $\pm$  DP), em percentagem, resultantes do regime de alimentação, Sem Alimentação e Com Alimentação de 500 células de *Phaeodactylum tricornutum* por larva às 48 horas pós fertilização ( $n = 6$ ).

### 3.2. Ensaio E2: Assentamento larvar em diferentes biofilmes

O ensaio iniciado a 24 de junho de 2025 (E2) visou determinar qual o biofilme que permite melhores resultados no assentamento larvar de *P. depressa*. Para tal, foram comparadas as taxas de assentamento 2 e 3 semanas pós fertilização correspondentes ao uso de biofilme com *Phaeodactylum tricornutum*, biofilme com *Tetraselmis suecica* e biofilme criado em tanques com *Holothuria* sp e controlo negativo, sem biofilme.

Duas semanas após o início da fertilização, não foram observadas larvas assentadas, pelo que a taxa de assentamento foi nula para todos os tratamentos testados. O mesmo aconteceu três semanas pós fertilização, sendo a taxa de assentamento novamente nula para todos os biofilmes testados.

## 4. Discussão

### 4.1. Pré-ensaios

#### 4.1.1. Resultados dos pré-ensaios 1 a 3: Efeito de diferentes métodos de maturação de oócitos sobre a percentagem de oócitos ativos e reprodução

Antes da aplicação dos métodos para indução da maturação dos oócitos, a percentagem de oócitos ativos de *Patella depressa* para os pré-ensaios PE1 e PE2 foi bastante baixa, efetivamente nula ou quase nula. De facto, quando acabados de extrair, os oócitos tendem a possuir uma forma irregular e a membrana que os circunda, o córion (Castejón et al., 2022b). Este fenómeno explica a elevada quantidade de oócitos inativos, com córion, e escassez de oócitos ativos, com o córion parcial ou totalmente desintegrado, resultando nas baixas taxas de percentagem de oócitos ativos obtidas.

A exposição dos oócitos a água salgada demonstrou não originar nenhum benefício estatisticamente relevante a nível da percentagem de oócitos ativos quando comparado com antes deste contacto. Já o uso de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  demonstrou promover uma percentagem de oócitos ativos superior à obtida antes da aplicação desta técnica. Resultados semelhantes foram obtidos para *P. depressa* por Aquino De Souza et al. (2009), onde a maturação dos oócitos com banho alcalino com a base NaOH (pH 9.5, 1.5 horas) resultou em aproximadamente 35% de oócitos ativos. De forma semelhante, a alcalinização de oócitos de *P. candei* com NaOH (pH 9.5) durante 3 e 4 horas resultou em uma percentagem de oócitos ativos de 38 e 51%, respetivamente. Estes resultados vão de encontro ao descrito por Hodgson et al. (2007) e Colas & Dubé (1998), em que o aumento do pH da solução em que os oócitos de *Patella* se encontram leva à desintegração do córion, resultando em um aumento de oócitos ativos.

No ensaio de reprodução PE3, verificou-se que o uso de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  originou uma taxa de fertilização em *Patella depressa* superior à obtida quando a indução de maturação ocorreu somente em água salgada. Estes resultados estão de acordo com o observado por Hodgson et al. (2007) em *P. ulyssiponensis*, onde a aplicação de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  levou à otimização da taxa de fertilização de cerca de 30% para aproximadamente 85%, quando comparada com aquela obtida quando os oócitos foram pré-incubados em água salgada normal. Em *P. candei*, o uso de banho alcalino com esta base permitiu otimizar a taxa de fecundação de aproximadamente 10% para aproximadamente 90% (Castejón et al., 2023b). Apesar

mais baixa que a reportada para outras espécies de *Patella*, a taxa de fecundação obtida no tratamento com banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 9) vai de encontro às obtidas em *P. depressa* por Ribeiro (2008) e por Aquino De Souza et al. (2009) com  $\text{NaOH}$  (pH 10) que não excedem os 20%.

A taxa de eclosão obtida com o uso de banho alcalino,  $34,79 \pm 20,26\%$ , foi semelhante à obtida quando ocorreu maturação em água salgada,  $30,18 \pm 8,44\%$ . Estes resultados estão de acordo com os relatados por Pérez et al. (2016) em *P. depressa*, onde a incubação dos oócitos em água alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , resultou em 38,7% de larvas trocóforas normais. Ribeiro (2008), observou taxas de larvas trocóforas normais entre 1,3 e 17,8% em *P. depressa*, sob tratamento semelhante. Em outras espécies de *Patella*, semelhante ao descrito em *P. depressa*, a alcalinização de oócitos com  $\text{NH}_4\text{OH}$  tende a originar um efeito positivo na percentagem de larvas trocóforas normais: 30,3% em *P. vulgata* (Ribeiro, 2008); 69,7% em *P. ulyssiponensis* (Hodgson et al., 2007); 27,6% a 46,3% (Pérez et al., 2016; Ribeiro, 2008); entre 60 e 70% em *P. candei* (Castejón et al., 2023b).

A literatura documenta a base  $\text{NaOH}$  agente alcalinizador eficiente na indução da maturação de oócitos na reprodução de *Patella* e subsequente fecundação e desenvolvimento larvar (Aquino De Souza et al., 2009; Cañizares et al., 2021; Castejón et al., 2022a, 2023b; Pérez et al., 2016). No entanto, esta base requer tempos de aplicação iguais ou superiores a 1 hora, enquanto  $\text{NH}_4\text{OH}$  permite alcançar resultados semelhantes em apenas 10 a 30 minutos de aplicação (Castejón et al., 2023b). Por este motivo, a base  $\text{NH}_4\text{OH}$  torna-se mais atrativa para a alcalinização de oócitos de *Patella*, tornando o protocolo de reprodução mais curto e eficiente (Castejón et al., 2023b; Pérez et al., 2016).

Deste modo, os resultados obtidos neste estudo confirmam que a alcalinização da água com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 9,0, 10 minutos) é um método eficaz na maturação dos oócitos de *P. depressa*, melhorando a taxa de fertilização, ainda que não tão acentuado como descrito por Castejón et al. (2023b) e Hodgson et al. (2007). Mesmo não originando um efeito significativo na taxa de eclosão de *P. depressa*, os benefícios da aplicação de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  são evidentes. Deste modo, deve-se proceder com os próximos ensaios de reprodução de *P. depressa* recorrendo ao uso de banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  como descrito e como já realizado em outros ensaios com *P. depressa* (Pérez et al., 2016, 2019; Ribeiro, 2008), *P. vultaga* (Hodgson et al., 2007; Pérez et al., 2016, 2019; Ribeiro, 2008), *P. ulyssiponensis* (Hodgson et al., 2007; Pérez et al., 2016, 2019;

Ribeiro, 2008), *P. aspera* (Castejón et al., 2022b, 2024b), *P. ordinaria* (Castejón et al., 2024b; García et al., 2025).

#### **4.1.2. Pré-ensaios 4 a 6: Água, temperatura e tempo de fertilização ideal à reprodução e desenvolvimento larvar**

Os resultados obtidos nestes pré-ensaios permitiram perceber que a água disponível pode influenciar os resultados obtidos, em particular a sobrevivência larvar durante os estágios iniciais. Deste modo, é necessário garantir que a água a utilizar é adequada para a reprodução que, para esta espécie, água proveniente da Docapesca demonstra ser a mais indicada. Adicionalmente, o tempo que se deve aguardar entre o início da fecundação e avaliação da eficácia da mesma (3 ou 4 horas), mostrou não ser relevante, pelo que se aconselha a avaliar este parâmetro 3 horas pós fertilização.

A temperatura de incubação demonstrou ter efeito sobre o sucesso reprodutivo de *Patella depressa*. A reprodução a 16°C resultou numa taxa de fertilização inferior ( $7,76 \pm 5,18\%$ ) à obtida a 18°C ( $13,00 \pm 3,08\%$ ), enquanto a taxa de eclosão foi superior a 16°C ( $59,98 \pm 31,70\%$ ) em comparação com 18°C ( $11,28 \pm 6,71\%$ ).

De forma semelhante, Ribeiro (2008) reportou a gama ótima de temperatura para a sobrevivência de larvar de *P. depressa*, com indivíduos recolhidos no Sul da Grã-Bretanha, se encontra entre 12 e 16°C, sendo a sobrevivência larvar superior a 16°C. O mesmo autor observou que a gama ótima de temperatura varia entre espécies: 8 a 12°C em *P. vulgata*; 12 a 16°C em *P. ulyssiponensis*. Por sua vez, Pérez et al. (2016), ao testar o efeito de duas temperaturas de incubação (13 e 18°C), com indivíduos de *P. vulgata* recolhidos no Noroeste de Espanha, verificaram que o sucesso embrionário foi superior quando sujeitos a 18°C, bem como identificaram que o período de desenvolvimento larvar foi superior na temperatura mais baixa.

Este padrão é coerente com o reportado por outros autores (Ferranti et al., 2022; Guallart et al., 2020; Ribeiro, 2008), como é o caso de larvas de *P. ferruginea*, que demoram cerca de 4 dias a atingir o estágio de pedivelígera quando são mantidas entre 15 e 17°C, mas somente 3 dias quando sujeitas a temperaturas entre 18 e 19°C (Ferranti et al., 2022).

Adicionalmente, ainda que baixas, a temperatura de 16°C resultou em sobrevivências larvares 48 e 72 horas superiores às obtidas a 18°C que foram nulas. Estes resultados

vão de encontro aos de Ribeiro (2008) para *P. depressa*, onde o cultivo larvar a 16°C permitiu a maior sobrevivência larvar, onde aproximadamente de 4% de larvas atingiram o estágio de velígera, mas somente cerca de 1% sobreviveram até ao estágio de pedivelígera. Este declínio na sobrevivência larvar ao longo do cultivo larvar a todas as temperaturas testadas, e temperaturas acima e abaixo de 16°C resultaram em sobrevivências larvares mais baixas, chegando a ser nulas a 24°C. De facto, temperaturas acima da gama ótima de temperatura tendem a reduzir a sobrevivência larvar (Ribeiro, 2008; Rodríguez et al., 2020).

De um modo geral, existe pouca informação sobre a gama de temperatura ótima para a reprodução de *P. depressa* em cativeiro, sobretudo para populações da costa portuguesa, reforçando a necessidade de estudos regionais que permitam ajustar os protocolos de reprodução às condições locais.

## 4.2. Ensaio

### 4.2.1. Ensaio E1: Efeito da concentração de oócitos inicial e alimentação às 48 horas pós fertilização

A taxa de fertilização resultante do início da reprodução de *Patella depressa* com 100 oócitos/ml ( $17,11 \pm 4,81\%$ ) ou 200 oócitos/ml ( $15,39 \pm 4,41\%$ ) não variou entre tratamentos. De forma semelhante, a taxa de eclosão correspondente à reprodução com 100 oócitos/ml ( $58,99 \pm 18,01\%$ ) foi semelhante à obtida com o uso de 200 oócitos/ml ( $68,68 \pm 19,73$ ). Pérez et al. (2016) testaram as concentrações de 100 e 200 oócitos/ml, reportando taxas de larvas trocóforas normais semelhantes, de cerca de 23% e 30%, respetivamente, quando fecundados com  $10^7$  espermatozoides/ml. Os autores não continuaram com os ensaios de reprodução para além das 24h pós fertilização, pelo que não há informação relativa a diferenças nas sobrevivências larvares 48 e 72 horas pós fertilização.

No presente estudo, a sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização correspondente à concentração de 100 oócitos/ml no momento da fecundação,  $13,45 \pm 7,78\%$ , foi superior à obtida quando se iniciou a fecundação com 200 oócitos/ml  $8,13 \pm 5,67\%$ . Contudo, realizar a fecundação com 100 oócitos/ml resultou numa sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização ( $2,64 \pm 5,25\%$ ) semelhante à correspondente à fecundação com 200 oócitos/ml ( $1,91 \pm 2,64\%$ ).

A literatura disponível sobre a densidade ótima de oócitos para a reprodução de espécies do género *Patella* é escassa. Em *P. aspera* e *P. candei* é recomendado o uso de 50 a 100 oócitos/ml para efetuar a fertilização artificial *in vitro* (De Girolamo et al., 2024). De facto, a maioria dos estudos sobre lapas deste género recorre a concentrações dentro deste intervalo (Cañizares et al., 2021; Castejón et al., 2022b, 2024b; García et al., 2025; Nunes et al., 2024).

A sobrevivência larvar 72 horas pós fertilização obtida quando não se ofereceu alimento, ( $2,64 \pm 4,25\%$ ) foi semelhante à registada quando as larvas de *P. depressa* foram avaliadas com 500 células de *Phaeodactylum tricornutum* por larva às 48 horas pós fertilização ( $2,77 \pm 4,20\%$ ). Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Ferranti et al. (2018), onde a alimentação de larvas de *P. caerulea* 2 dias pós fertilização com um mix de *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis suecica* (500 células de algas por larva) não teve efeito no seu desenvolvimento nem sobrevivência larvar. Também Smith (1935) observou que alimentar larvas de *P. vulgata* com *Nitzschia* sp. não aumentou a

sobrevivência larvar em comparação com a correspondente a larvas que não foram alimentadas. Contudo, o mesmo autor apontou que a alimentação com esta diatomácea tem potencial de afetar negativamente as larvas, uma vez que, em grandes quantidades, pode promover o aprisionamento das larvas em aglomerados desta diatomácea. De modo semelhante, Dodd (1957) verificou que excesso de *Phaeodactylum tricornutum* pode ser prejudicial para larvas de *P. vulgata* e *P. caerulea*.

Semelhante aos resultados obtidos, estudos preliminares realizados por Castejón et al. (2022c) com larvas de *P. aspera* revelaram que esta espécie não necessita de alimentação, reforçando a teoria de que as larvas de *Patella* são lecitotróficas, não sendo necessária alimentação durante os estágios iniciais da sua vida (Castejón et al., 2022c; Pérez et al., 2016; Wanninger et al., 1999). Guallart et al. (2020) classificaram larvas de *P. ferruginea* como estritamente lecitotróficas, ou seja, estas dependem somente das suas reservas vitelinas e não se alimentam durante a sua fase planctónica, e somente após a metamorfose é que se começam a alimentar quando atingem a sua fase pós-larvar (Kempf & Hadfield, 1985; Thorson, 1950).

Por este motivo, estudos mais recentes (Cañizares et al., 2021; Castejón et al., 2022c, 2023b, 2023a; Ferranti et al., 2022; García et al., 2025; Nunes et al., 2024), não alimentam as larvas nos primeiros dias de vida, simplificando os protocolos de reprodução e fornecendo alimento somente no início dos ensaios de assentamento larvar, quando as larvas pedivelígeras demonstram competência para iniciar a metamorfose.

Este padrão é semelhante ao observado em outros gastrópodes marinhos, como os abalones (*Haliotis* spp.), cujas larvas também são lecitotróficas (Jaekle & Manahan, 1989a, 1989b; Vavra & Manahan, 1999). Nestes organismos, a alimentação inicia-se após a metamorfose, consumindo diatomáceas presentes no substrato onde assentam após a abertura da sua cavidade bucal (Xing et al., 2008), apresentando comportamento alimentar ativo 24 horas após metamorfose (Kawamura & Takami, 1995).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo enquadram-se no padrão lecitotrófico já descrito em alguns gastrópodes marinhos (*Patella* e *Haliotis* spp.), evidenciando que a alimentação de *P. depressa* não é necessária e deve ser dispensada.

#### 4.2.2. Ensaio E2: Assentamento larvar em diferentes biofilmes

Os biofilmes formados com *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis suecica* mostraram ser ineficazes no assentamento larvar de *Patella depressa*, uma vez que, em ambos não se observou assentamento. O mesmo foi observado com biofilmes provenientes de tanques de *Holothuria* sp. e no controlo negativo (sem biofilme).

A informação sobre o assentamento de *P. depressa* em laboratório é escassa, mas resultados semelhantes têm sido relatados para outras espécies do mesmo género. Nunes et al. (2024) determinaram que em *P. aspera*, biofilmes de *Amphora* sp., *Entomoneis* sp., *N. salinicola* e *Nitzschia* sp. não são bons substratos de assentamento, resultando em taxas de assentamento desta espécie quase nulas. De forma semelhante, Castejón et al. (2022c) observaram que biofilmes de *H. coffeaeformis*, *N. salinicola*, *Pavlova* sp., e um mix de *Pavlova* sp. e *H. coffeaeformis* também resultaram num assentamento quase nulo de larvas de *P. aspera*. O mesmo foi descrito em lapas da espécie *Lottia digitalis*, onde biofilmes de *Navicula* sp. não mostraram ser eficazes no assentamento larvar (Kay, 2002).

Segundo Castejón et al. (2022c), o assentamento e metamorfose em lapas poderá estar associado a um mecanismo dividido em dois passos essenciais: i) Estímulo que influencia a transição da capacidade natatória larvar para a deslocação no substrato; ii) Estímulo que induz o assentamento e metamorfose para pós-larvas. Devido à longa fase de exploratória das larvas quando sujeitas a biofilmes de diatomáceas, durante a qual estas procuram o local ideal para assentar, juntamente com o baixo assentamento, levam Nunes et al. (2024) a teorizar que estes não causam um estímulo forte do suficiente para desencadear o assentamento e metamorfose das larvas.

Contudo contrariamente ao observado neste estudo e em estudos com *P. aspera* (Nunes et al., 2024), o uso de biofilmes com a diatomácea *N. salinicola* parece ser capaz de promover assentamento larvar de aproximadamente 20% em *P. ordinaria* (García et al., 2025) e *P. candei* (Castejón et al., 2023). Deste modo, a decisão de utilização ou não de biofilmes como substrato de assentamento deve ser realizada especificamente para cada espécie, uma vez que a resposta de larvas ao tipo de biofilme disponível demonstra ser interespecífica.

Tung & Alfaro (2011) testaram 20 estirpes de microalgas das famílias Cyanophyta, Triceratiaceae, Entomoneidaceae, Naviculaceae e Bacillaraceae como potenciais para o assentamento do abalone *Haliotis iris*, e, apesar de promover o assentamento de larvas desta espécie, nenhuma das estirpes resultou numa performance larvar

excelente, onde 35% das larvas atingiram a metamorfose, mas somente 25% sobreviveu. Adicionalmente, conseguiram perceber que microalgas cujo crescimento fosse rápido resultaram, de um modo geral, em melhores taxas de metamorfose e sobrevivência das larvas.

Em contraste com os resultados obtidos com biofilmes, as algas coralinas incrustantes têm mostrado grande potencial como indutoras de assentamento em algumas espécies de *Patella*. Castejón et al. (2022c) testaram estas algas no assentamento de *P. aspera*, resultando no assentamento de aproximadamente 20% das larvas. Em larvas de *P. ordinaria*, o uso de algas coralinas incrustantes permite um assentamento de aproximadamente 50%, como observado por García et al. (2025). De facto, o uso de algas coralinas incrustantes, bem como somente água onde estas foram acondicionadas durante 4 a 5 dias, demonstram ser um bom estímulo para o assentamento e metamorfose de *P. aspera* e *P. ordinaria* Castejón et al. (2024b). Adicionalmente, Castejón et al. (2023a) demonstraram a eficácia do uso destas algas no assentamento de *P. candei*, com resultados de assentamento superiores quando se recorreu ao uso de *Titanoderma pustulatum* (aproximadamente 60%) e *Neogoniolithon* sp. com *H. farinosum* (aproximadamente 40%) como algas dominantes no substrato de assentamento. Este autor verificou ainda que *A. inamoena* como alga coralina incrustante dominante promoveu um assentamento de aproximadamente 20%. O uso destas algas no assentamento de larvas de lapas mostra-se bastante promissor em *P. aspera* (Castejón et al., 2022c, 2024b; Nunes et al., 2024), *P. ordinaria* (Castejón et al., 2024b; García et al., 2025) e *P. candei* (Castejón et al., 2023a), sendo necessário avaliar a eficácia destas no assentamento de outras espécies de *Patella*, em particular *P. depressa*. Seabra et al. (2023) descobriram que a abundância de *P. depressa* dentro de poças de maré está positivamente relacionada com a presença de algas coralinas incrustantes nestes locais. Isto desperta curiosidade quanto à eficácia destas algas como substrato e estímulo de assentamento em *P. depressa*.

Estudos recentes observaram o assentamento de larvas de *P. aspera* (Nunes et al., 2024) e *P. ferruginea* (Ferranti et al., 2022) em *Ulvela lens*, revelando esta epífita como potencial substrato para o assentamento de larvas, sendo necessário avaliar a sua eficácia em assentamento de larvas de outras espécies de *Patella*.

## 5. Considerações finais e perspectivas futuras

O presente estudo permitiu avaliar diversos fatores que influenciam a reprodução e sobrevivência larvar em *Patella depressa* em cativeiro.

Os pré-ensaios permitiram definir o banho alcalino com  $\text{NH}_4\text{OH}$  como método mais eficiente para a indução da maturação de oócitos e  $16^\circ\text{C}$  como a temperatura mais indicada à reprodução desta espécie em laboratório. Adicionalmente, percebeu-se que a taxa de fertilização deve ser calculada 3 horas pós fertilização e ainda que futuros ensaios com *P. depressa* no edifício do CETEMARES deve fazer uso de água da Docapesca.

Definiu-se o valor de 100 oócitos/ml como concentração com melhor sobrevivência larvar 48 horas pós fertilização. Percebeu-se que a alimentação de larvas na fase inicial de desenvolvimento não é necessária e pode ser dispensada, simplificando e diminuindo o custo da reprodução. Por fim, determinou-se que o uso de microalgas e uso de biofilme criado em tanques onde se cultivam pepinos do mar como substratos de assentamento não são eficazes.

Apesar dos resultados obtidos, permanece um grande número de lacunas no conhecimento necessário ao desenvolvimento de um protocolo de reprodução efetivo para *P. depressa*.

Embora exista informação relativa à temperatura ótima para *P. depressa* no Sul da Grã-Bretanha, este conhecimento diminui quando se altera o foco para a Península Ibérica, em particular Portugal. Torna-se então necessário determinar qual a gama de temperatura ideal à reprodução e sobrevivência de *P. depressa* para adaptar os protocolos de reprodução ao clima de Portugal Continental.

A concentração de oócitos ideal para a reprodução de *P. depressa* necessita de ser estudada de forma mais profunda, a fim de determinar o seu valor ótimo, aumentando as baixas taxas de fertilização características da espécie. Pesquisas futuras devem focar-se em explorar intervalos mais amplos de concentrações e a sua interação com outros fatores, como a temperatura, de modo a desenvolver e estabelecer protocolos de reprodução otimizados para esta espécie.

Por fim, a maior lacuna no conhecimento da reprodução em laboratório de *P. depressa* reside no facto de não haver informação sobre assentamento larvar bem-sucedido nesta espécie. Algas carolinas incrustantes possuem um potencial interessante para o assentamento larvar de *P. depressa*, uma vez correlacionadas positivamente com a

abundância desta na natureza, e com resultados positivos no assentamento de outras espécies de *Patella*. Deste modo, são necessários estudos que determinem a eficácia destas como substrato e estímulo de assentamento.

## 6. Bibliografía

- Aquino De Souza, R., Tyler, P., & Hawkins, S. J. (2009). Artificial oocyte maturation in *Patella depressa* and *Patella vulgata* using NaOH-alkalinized seawater. *Marine Biology Research*, 5(5), 503–510. <https://doi.org/10.1080/17451000802603645>
- Barbedo, J. (2013). *Automatic Object Counting In Neubauer Chambers*. <https://doi.org/10.14209/sbrt.2013.34>
- Borges, C. D. G., Doncaster, C. P., Maclean, M. A., & Hawkins, S. J. (2015). Broad-scale patterns of sex ratios in *Patella* spp.: a comparison of range edge and central range populations in the British Isles and Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(6), 1141–1153. <https://doi.org/10.1017/S0025315415000417>
- Branch, G. M. (1985). Limpets: Evolution and Adaptation. In *Evolution* (pp. 187–220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751410-9.50012-5>
- Brazão, S., Boaventura, D., Morais, S., Narciso, L., & Re, P. (2003). Reproduction of “*Patella depressa*” Pennant, 1777 on the central Portuguese coast. *Boletín Del Instituto Español de Oceanografía, ISSN 0074-0195, N.º. 1-4, 2003, Pags. 453-460, 19*.
- Burgos-Rubio, V., De la Rosa, J., Altamirano, M., & Espinosa, F. (2015). The role of patellid limpets as omnivorous grazers: a new insight into intertidal ecology. *Marine Biology*, 162(10), 2093–2106. <https://doi.org/10.1007/S00227-015-2739-0/FIGURES/7>
- Cañizares, J. M., Castejón, D., Haroun, R., Nogueira, N., & Andrade, C. A. P. (2021). Enhancing oocyte maturation and fertilisation in the black-foot limpet *Patella candei* d’Orbigny, 1840 (Patellidae, Mollusca). *Aquaculture Reports*, 21. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2021.100856>
- Casal, G., Aceña-Matarranz, S., Fernández-Márquez, D., & Fernández, N. (2018). Distribution and abundance patterns of three coexisting species of *Patella* (Mollusca Gastropoda) in the intertidal areas of the NW Iberian Peninsula: Implications for management. *Fisheries Research*, 198, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.10.011>
- Castejón, D., Cañizares, J. M., Nogueira, N., & Andrade, C. A. P. (2022a). Artificial maturation and larval production of the limpet *Patella aspera* Röding, 1798 (Patellogastropoda, Mollusca): Enhancing fertilization success of oocytes using

- NaOH-alkalinized seawater. *Aquaculture Research*, 52(5), 1904–1914.  
<https://doi.org/10.1111/ARE.15039>
- Castejón, D., García, L., & Andrade, C. A. P. (2023a). Crustose coralline algal factors determining the success of limpet (Patellogastropoda: Patellidae) settlement: species, exposure time, area and soluble cues. *Marine Biology*, 170(12), 1–21.  
<https://doi.org/10.1007/S00227-023-04321-1/FIGURES/9>
- Castejón, D., García, L., Cañizares, J. M., De Girolamo, M., Nunes, C., Isidro, E., Courtois de Viçose, G., Nogueira, N., & Andrade, C. A. P. (2022b). Methodologies for Patellid Limpets' Aquaculture: From Broodstock Management to Juveniles. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.884262>
- Castejón, D., García, L., Nogueira, N., & Andrade, C. A. P. (2023b). Improving efficiency of methods for hatchery production of the limpet *Patella candei* (Patellogastropoda: Patellidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(4), 945–964.  
<https://doi.org/10.1111/JWAS.12938>
- Castejón, D., Hodgson, A., Nakano, T., Hawkins, S. J., & Andrade, C. A. P. (2024a). Editorial: True limpets as living resources - biology, ecology, exploitation and sustainability. *Frontiers in Marine Science*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1364518>
- Castejón, D., Nogueira, N., & Andrade, C. A. P. (2022c). Limpet larvae (*Patella aspera* Röding, 1798), obtained by gonad dissection and fecundation in vitro, settled and metamorphosed on crustose coralline algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 101(7), 991–1002.  
<https://doi.org/10.1017/S0025315421000916>
- Castejón, D., Sousa, P., & Andrade, C. A. P. (2024b). Specific settlement strategies for two exploited limpet species (*Patella aspera* and *P. ordinaria*) using coralline algae and conditioned seawater. *Aquaculture*, 593, 741263.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741263>
- Colas, P., & Dubé, F. (1998). Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(5), 539–548. <https://doi.org/10.1006/SCDB.1998.0248>
- Cook, A., Bamford, O. S., Freeman, J. D. B., & Teideman, D. J. (1969). A study of the homing habit of the limpet. *Animal Behaviour*, 17(PART 2), 330–339.  
[https://doi.org/10.1016/0003-3472\(69\)90019-0](https://doi.org/10.1016/0003-3472(69)90019-0)

- De Girolamo, M., Courtois de Viçose, G., Andrade, C., & Isidro, E. (2024). *Production of marine invertebrates at early stages – Manual for best practices: Vol. Supplement 14*. Arquipelago. Life and Marine Sciences. <https://oceanos.uac.pt/arquipelago>
- Dodd, J. (1957). Artificial fertilisation, larval development and metamorphosis in *Patella vulgata* L. and *Patella caerulea* L. *Pubblicazioni Della Stazione Zoologica Di Napoli*, 29, 172–185.
- FAO. (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- Fernandes, I., Fernandes, T., & Cordeiro, N. (2019). Nutritional value and fatty acid profile of two wild edible limpets from the Madeira Archipelago. *European Food Research and Technology*, 245(4), 895–905. <https://doi.org/10.1007/S00217-019-03234-Y/FIGURES/3>
- Ferranti, M. P., Guallart, J., Fanciulli, G., Panzalis, P. A., & Chiantore, M. (2022). Advancements towards restoration of the endangered limpet *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 through controlled reproduction. *Aquaculture Research*, 53(3), 782–798. <https://doi.org/10.1111/ARE.15614>
- Ferranti, M. P., Monteggia, D., Asnaghi, V., & Chiantore, M. (2018). Artificial reproduction protocol, from spawning to metamorphosis, through noninvasive methods in *Patella caerulea* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research*, 49(10), 3386–3391. <https://doi.org/10.1111/ARE.13802>
- Firth, L. (2021). What have limpets ever done for us? On the past and present provisioning and cultural services of limpets. *International Review of Environmental History*, 7, 5–45. <https://doi.org/10.22459/IREH.07.02.2021.01>
- García, L., de Viçose, G. C., Andrade, C. A. P., & Castejón, D. (2025). Role of neurotransmitters in the settlement and metamorphosis of the limpet *Patella ordinaria*. *Aquaculture Reports*, 42, 102806. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.102806>
- Guallart, J., Peña, J. B., Pérez-Larruscaín, J., Luque, A. A., & Templado, J. (2020). Filling gaps: closing the life cycle of the endangered Mediterranean limpet *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Gastropoda, Patellidae). *Mediterranean Marine Science*. <https://doi.org/10.12681/mms.22508>

- Guerra, M. T., & Gaudencio, M. J. (1986). Aspects of the ecology of *Patella* spp. on the Portuguese coast. *Hydrobiologia*, 142(1), 57–69. <https://doi.org/10.1007/BF00026747>
- Henriques, P., Delgado, J., & Sousa, R. (2017). Patellid Limpets: An Overview of the Biology and Conservation of Keystone Species of the Rocky Shores. In *Organismal and Molecular Malacology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67862>
- Hodgson, A. N., Le Quesne, W. J. F., Hawkins, S. J., & Bishop, J. D. D. (2007). Factors affecting fertilization success in two species of patellid limpet (Mollusca: Gastropoda) and development of fertilization kinetics models. *Marine Biology*, 150(3), 415–426. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0354-9>
- Jaekle, W. B., & Manahan, D. T. (1989a). Feeding by a “nonfeeding” larva: uptake of dissolved amino acids from seawater by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Marine Biology*, 103(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/BF00391067/METRICS>
- Jaekle, W. B., & Manahan, D. T. (1989b). Growth and Energy Imbalance During the Development of a Lecithotrophic Molluscan Larva (*Haliotis rufescens*). <https://doi.org/10.2307/1541939>, 177(2), 237–246. <https://doi.org/10.2307/1541939>
- Kawamura, T., & Takami, H. (1995). Analysis of Feeding and Growth Rate of Newly Metamorphosed Abalone *Haliotis discus hannai* Fed on Four Species of Benthic Diatom. *Fisheries Science*, 61(2), 357–358. <https://doi.org/10.2331/FISHSCI.61.357>
- Kay, M. C. (2002). Recruitment in the intertidal limpet *Lottia digitalis* (Patellogastropoda: Lottiidae) may be driven by settlement cues associated with adult habitat. *Marine Biology*, 141(3), 467–477. <https://doi.org/10.1007/S00227-002-0846-1/METRICS>
- Kempf, S. C., & Hadfield, M. G. (1985). PLANKTOTROPHY BY THE LECITHOTROPHIC LARVAE OF A NUDIBRANCH, *PHESTILLA SIBOGAE* (GASTROPODA). *The Biological Bulletin*, 169(1), 119–130. <https://doi.org/10.2307/1541392>
- Mau, A., & Jha, R. (2018). Aquaculture of two commercially important molluscs (abalone and limpet): existing knowledge and future prospects. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 611–625. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12190>
- Morais, S., Boaventura, D., Narciso, L., Ré, P., & Hawkins, S. J. (2003). Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda:

- Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 294(1), 61–80. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00258-2)
- Nunes, C., Ramirez, A., Rodeia, J., Isidro, E., & De Girolamo, M. (2024). Development of Limpet aquaculture: Advances on settlement and early growth of *Patella aspera* Röding, 1798. *Aquaculture Reports*, 34, 101906. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101906>
- Oróstica, M. H., Richardson, C. A., Estrella-Martínez, J., Jenkins, S. R., & Hawkins, S. J. (2021). Shell growth and age determined from annual lines in the southern warm-water limpet *Patella depressa* at its poleward geographic boundaries. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 101(4), 707–716. <https://doi.org/10.1017/S0025315421000539>
- Orton, J. H., Southward, A. J., & Dodd, J. M. (1956). Studies on the biology of limpets: II. The breeding of *Patella vulgata* L. in Britain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 35(1), 149–176. <https://doi.org/10.1017/S0025315400009036>
- Pereira, F., Piló, D., Carvalho, A. N., Rufino, M., Moura, P., Vasconcelos, P., & Gaspar, M. B. (2022). Epibiont assemblages on limpet shells: Biodiversity drivers in intertidal rocky shores. *Marine Environmental Research*, 174, 105556. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2022.105556>
- Pérez, S., Fernández, N., & Ribeiro, P. A. (2016). Standardization of a *Patella* spp. (Mollusca, Gastropoda) embryo–larval bioassay and advantages of its use in marine ecotoxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 175–186. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2016.01.025>
- Pérez, S., Sánchez-Marín, P., Bellas, J., Viñas, L., Besada, V., & Fernández, N. (2019). Limpets (*Patella* spp. Mollusca, Gastropoda) as model organisms for biomonitoring environmental quality. *Ecological Indicators*, 101, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.016>
- Rambli, M. M., Phuah, E. T., & Howell, N. K. (2025). Nutritional and functional properties of underutilized shellfish (molluscs), limpet (*Patella vulgata*). *Scientific Reports*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/S41598-025-08135-7>;SUBJMETA
- Ribeiro, P. (2008). *Dispersal and connectivity of northeastern atlantic patellid limpets: a multidisciplinary approach* [Thesis]. University of Southampton.

- Rodríguez, A., Vilanova, M., & Brito, A. (2020). Effects of ocean warming on larval development of *Patella ordinaria* from the Canary Islands. *Regional Studies in Marine Science*, 39, 101460. <https://doi.org/10.1016/J.RSMA.2020.101460>
- Seabra, M. I., Penteadó, N., Cruz, T., & Hawkins, S. J. (2023). Variability and connectivity in populations of different limpet species across rockpool-generated mosaic landscapes. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1206159. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2023.1206159/BIBTEX>
- Smith, F. G. W. (1935). The Development of *Patella vulgata*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 225(520), 95–125. <http://www.jstor.org/stable/92264>
- Smith, I. (2020). *Patella depressa* Pennant, 1777, Identification and Biology. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26462.05443>
- Thorson, G. (1950). REPRODUCTIVE and LARVAL ECOLOGY OF MARINE BOTTOM INVERTEBRATES. *Biological Reviews*, 25(1), 1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1950.tb00585.x>
- Tung, C. H., & Alfaro, A. C. (2011). Initial Attachment, Metamorphosis, Settlement, and Survival of Black-footed Abalone, *Haliotis iris*, on Microalgal Biofilms Containing Different Amino Acid Compositions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(2), 167–183. <https://doi.org/10.1111/J.1749-7345.2011.00454.X>
- Vavra, J., & Manahan, D. T. (1999). Protein Metabolism in Lecithotrophic Larvae (Gastropoda: *Haliotis rufescens*). <https://doi.org/10.2307/1542563>, 196(2), 177–186. <https://doi.org/10.2307/1542563>
- Wanninger, A., Ruthensteiner, B., Lobenwein, S., Salvenmoser, W., Dictus, W. J. A. G., & Haszprunar, G. (1999). Development of the musculature in the limpet *Patella* (Mollusca, Patellogastropoda). *Development Genes and Evolution*, 209(4), 226–238. <https://doi.org/10.1007/S004270050247>
- World Register of Marine Species. (2025). *WoRMS Editorial Board*. <https://www.marinespecies.org>
- Xing, R. L., Wang, C. H., Cao, X. Bin, & Chang, Y. Q. (2008). Settlement, growth and survival of abalone, *Haliotis discus hannai*, in response to eight monospecific benthic diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 20(1), 47–53. <https://doi.org/10.1007/S10811-007-9179-2/TABLES/2>

Yu, Z. L., Yang, M. J., Song, H., Zhang, T., & Yuan, X. T. (2023). Gastropod chemoreception behaviors—Mechanisms underlying the perception and location of targets and implications for shellfish fishery development in aquatic environments. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1042962. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.1042962/BIBTEX>