

**Estudo dos fatores de seleção de habitat para o assentamento
bentónico em ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck,
1816)**

Beatriz dos Reis Duarte

2025

**Estudo dos fatores de seleção de habitat para o assentamento
bentónico em ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck,
1816)**

Beatriz dos Reis Duarte

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora
Sílvia Alexandra Pereira Lourenço

2025

Estudo dos fatores de seleção de habitat para o assentamento bentónico em ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Copyright © Beatriz dos Reis Duarte

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.

Resumo

O ouriço-do-mar comum *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), é uma espécie de elevado valor comercial devido à acentuada procura pelas suas ovas. Este facto tem levado à sobre-exploração dos seus stocks e conseqüente diminuição acentuada das populações. Com o avanço da aquacultura e o crescente interesse no restauro de ecossistemas marinhos, têm sido desenvolvidas estratégias que visam mitigar estas quebras e promover a recuperação das populações naturais. Um dos principais desafios da aquacultura de ouriços-do-mar é a transição entre as fases planctónica e bentónica, momento crítico do ciclo de vida. Durante esta transição, as larvas sofrem metamorfose e fixam-se num substrato que deve fornecer proteção e alimento para o início de vida bentónica. Em meios controlados, é essencial reproduzir as condições naturais, identificando fatores que promovam o sucesso do assentamento e reduzam a mortalidade. O principal objetivo deste estudo foi otimizar a etapa do assentamento larvar através da utilização de placas de cerâmica impressas em 3D, acondicionadas de diferentes formas para criar biofilme. Complementarmente, foi testado um protocolo de marcação com calceína para otimizar a monitorização dos juvenis assentados. Os reprodutores foram capturados na costa de Peniche e induzidos à fertilização artificial, monitorizando-se o desenvolvimento das larvas até à fase de metamorfose. Foram testados diferentes tipos de acondicionamento para formação de biofilme: Cultivo de Microalgas, composto por duas diatomáceas bentónicas (*Skeletonema costatum* e *Nitzschia acicularis*) em meio laboratorial; *Indoor*, composto por fitoplâncton natural recolhido numa praia rochosa e cultivado em laboratório; e *Outdoor*, formado naturalmente em placas submersas a 1 metro de profundidade no porto e numa praia de Peniche. Após a metamorfose, foram avaliados o sucesso de assentamento e o crescimento dos ouriços-do-mar ao longo de oito semanas. O acondicionamento *outdoor* apresentou a taxa de assentamento larvar mais elevada, possivelmente devido à sua maior semelhança com meio natural. No crescimento dos juvenis, o acondicionamento *indoor* destacou-se até à quarta semana, sendo posteriormente ultrapassado pelo biofilme de microalgas. No entanto, não foi observada efeito significativo entre o tipo de biofilme e o crescimento, reforçando a importância da progressão temporal no desenvolvimento juvenil. Com os indivíduos obtidos neste ensaio, foram testadas diferentes concentrações de calceína, sendo estas inicialmente de 10, 20 e 50 mg/L em indivíduos menores (Diâmetro: 0,11-2,80 mm), seguidas de 100, 150 e 200 mg/L em indivíduos de tamanhos superiores (Diâmetro: 2,52 – 7,24 mm). A marcação revelou eficácia em juvenis de tamanho superior, apresentando baixa mortalidade e ausência

de efeitos negativos no crescimento. Embora se tenha observado uma limitação na observação da marcação de calceína ao longo do tempo. Em síntese, os condicionamentos testados foram adequadamente aceites pelas larvas de *P. lividus*, destacando-se o tratamento *outdoor* pela maior taxa de assentamento. Os resultados obtidos reforçam a importância da integração entre fatores biológicos e ambientais para o sucesso das fases iniciais de desenvolvimento da espécie, contribuindo para o avanço de práticas sustentáveis de aquacultura e repovoamento.

Palavras-chave: Aquacultura regenerativa; assentamento; crescimento; biofilme; calceína

Abstract

The purple sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) is a species of high commercial value due to the high demand for their roe. This has led to the overfishing of species' stocks and a consequent decline in populations. With the advancement of aquaculture and growing interest in restoring marine ecosystems, strategies have been developed to mitigate these declines and promote the recovery of natural populations. One of the main challenges of aquaculture for this species is the transition from the planktonic to the benthic phase, a critical moment in the life cycle. During this phase, the larvae undergo metamorphosis and become fixed to the substrate, which must provide suitable conditions for protection and food to support the beginning of benthic life. In controlled environments, it is essential to reproduce natural conditions, identifying factors that promote successful settlement and reduce mortality. The main objective of this study was to optimize the larval settlement process through the use of 3D-printed ceramic plates, conditioned in different ways to create biofilm. Additionally, a calcein marking protocol was tested to optimize the monitoring of settled juveniles. Adults were collected off the coast of Peniche and induced to undergo artificial fertilization, with the larvae being monitored until the metamorphosis stage. Different types of conditioning were tested for biofilm formation: Microalgae Culture, consisting of two benthic diatoms (*Skeletonema costatum* and *Nitzschia acicularis*) in a laboratory environment; Indoor, consisting of natural phytoplankton collected from a rocky beach and cultivated in the laboratory; and Outdoor, formed naturally on submerged at a depth of 1 meter in the port and beach of Peniche. After two weeks of settlement, individuals were assessed for the number of settlements and growth over eight weeks. Outdoor conditioning showed the highest larval settlement rate, possibly due to its greater similarity to the natural environment. Regarding juvenile growth, indoor conditioning stood out until the fourth week, subsequently being surpassed by microalgae biofilm. However, no significant effect was observed between biofilm type and growth, reinforcing the importance of temporal progression in juvenile development. These juveniles were marked in different concentrations of calcein, initially at 10, 20, and 50 mg/L in smaller individuals (D: 0.110–2.800 mm), followed by 100, 150, and 200 mg/L in larger individuals (D: 2.518–7.242 mm). The marking proved effective in larger juveniles, with low mortality and no negative effects on growth, although the duration of fluorescence was limited. In summary, the tested condition was adequately accepted by *P. lividus* larvae, with the outdoor treatment standing out for its higher settlement rate. The results obtained reinforce the importance of integrating

biological and environmental factors for the success of the initial stages of development of the species, contributing to the advancement of sustainable aquaculture and restocking practices.

Keywords: Regenerative aquaculture; settlement; growth; biofilm; calcein

Conteúdo

1.	Introdução	13
1.1	Valor ecológico e ameaças dos ouriços-do-mar	13
1.2	A aquacultura de ouriços-do-mar	15
1.2.1	Aquacultura para ações de repovoamento:	16
1.2.2	Soluções de base natural para ações de repovoamento	19
1.3	Ouriço-do-mar comum, <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	21
1.3.1	Fatores que desencadeiam no assentamento bentónico:	24
1.4	Objetivos do estudo:	25
2.	Materiais e métodos:	25
2.1	Cultivo de microalgas:	25
2.2	Desenvolvimento e condicionamento de placas de assentamento:	26
2.3	Recolha do stock reprodutor:	28
2.3.1	Recolha de dados biométricos:.....	28
2.3.2	Análise histológica:.....	29
2.4	Indução da desova e fertilização:	30
2.4.1	Desenvolvimento larvar:.....	31
2.5	Sistema assentamento dos ouriços-do-mar:	32
2.5.1	Sistema pré-assentamento:.....	32
2.5.2	Sistema pós-assentamento:	33
2.6	Marcação de juvenis com calceína:.....	34
2.7	Análise estatística:	35
3	Resultados:	36
3.1	Caracterização dos stocks de reprodutores:	36
3.2	Desenvolvimento larvar:	38
3.3	Assentamento dos juvenis:.....	40
3.4	Crescimento dos juvenis:	44
3.5	Marcação de juvenis com calceína:.....	48
4.	Discussão:	50
4.1	Caracterização dos stocks de reprodutores:	50
4.2	Assentamento e crescimento de juvenis:.....	55
4.3	Marcação de juvenis do calceína:	61
5.	Conclusão:.....	65
6.	Referências bibliográficas:	67
7.	Anexos:	78

Lista de Figuras

- Figura 1: a) Habitat de *Paracentrotus lividus*, na zona rochosa intertidal, ocupando alvéolos rochosos (A) formados pelos ouriços-do-mar; b) Placas de cerâmica 3D para assentamento dos ouriços-do-mar; c) Demonstração da estrutura de fixação das placas de assentamento no meio natural. 20
- Figura 2: Fases do ciclo de vida de *Paracentrotus lividus*. Período embriogénese: Zigoto; 2-células; 4-células; 8-células; Blástula; Gástrula; Prisma. Início do período larvar: Pluteus; 4-braços; 6-braços; 8-braços; competência. Período adulto: Após assentamento. 24
- Figura 3: Ilustração dos vários tratamentos avaliados durante o ensaio I e II: a) Placa Controlo Negativo; b) Placa Biofilme Microalga; c) Placa Biofilme Indoor; d) Placa Biofilme Outdoor Marina; e) Placa Biofilme Outdoor Praia. 28
- Figura 4: Desenho experimental das experiências de assentamento planeadas para o ensaio I e ensaio II. 33
- Figura 5: Distribuição relativa dos estádios de maturação sexual dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* usados como reprodutores nos ensaios de desenvolvimento larvar I e II [Fêmeas (♀); Machos (♂)]. O símbolo * representa a diferença estatisticamente significativa entre ensaios para as fêmeas ($\chi^2=8,000$; $p=0,029$). 38
- Figura 6: Proporção das diferentes fases larvares ao longo dos dias (após fertilização) de cultivo para o ensaio I e ensaio II. 39
- Figura 7: Distribuição temporal do número de juvenis de *Paracentrotus lividus* observados na superfície das placas de assentamento sob diferentes tipos de acondicionamento, após o ensaio de desenvolvimento larvar. Números diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de referência (4ª semana * Outdoor * Tanque). Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela VI do Anexo. 42
- Figura 8: Distribuição do número de juvenis de *Paracentrotus lividus* observados na superfície das placas de assentamento sob diferentes tipos de acondicionamentos. As letras “a” e “b” indicam diferenças estatisticamente significativas para o fator Tipo de acondicionamento ($p<0,05$) em relação ao acondicionamento outdoor. Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela VII do Anexo. 44
- Figura 9: A) Diâmetro médio \pm desvio padrão dos juvenis de *Paracentrotus lividus* (mm), em função da interação Tempo/Tipo de acondicionamento. O símbolo * indica o grupo selecionado como referência no modelo estatístico. As letras a e b indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de referência ($p < 0,05$). Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela VIII do Anexo. B) Diâmetro médio \pm desvio padrão dos juvenis ao longo da 2ª, 3ª e 4ª semanas, em diferentes tipos de acondicionamentos do ensaio I. 46
- Figura 10: Diâmetro médio \pm desvio padrão dos ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* ao longo do tempo do ensaio I (2ª-8ª semana), observados nas superfícies das placas de assentamento com diferentes tipos de acondicionamento. O símbolo * representa a diferença estatisticamente significativa descrita na combinação de fatores no biofilme indoor na quarta semana. Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela IX do Anexo. 48
- Figura 11: Intensidade da marcação de calceína em ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus*, ao longo do tempo das três concentrações testadas (100, 150 e 200 mg/L). 49
- Figura 12: Representação ilustrativa: a) e b) Copepoda observado em amostras dos cultivos larvares do ensaio II; c) Larvas de menor dimensão observadas no ensaio II, quase em fase de competência; d) Larva *P. lividus* fase 4-braços sem anomalias; e) e f) Larva *P. lividus* com malformações identificadas pelas setas. 53
- Figura 13: Observação do assentamento de *Paracentrotus lividus* em placas de cerâmica: a) Placas de assentamento do acondicionamento outdoor, como representação da colonização natural de comunidade marinha; b) Placa de cerâmica, evidenciando um juvenil assentado no orifício; c) Juvenil assentado no orifício da placa, demonstrando a camuflagem na observação das placas; d) Juvenil a alimentarem-se com lamínaria desidratada; e) Vista dorsal de um juvenil, ilustrando o desenvolvimento pós-metamórfico e estrutura de espículas visíveis. 57
- Figura 14: Secções histológicas representativas das gónadas femininas (a-c) e masculinas (d-g) de *Paracentrotus lividus* nos três e quatro estágios de maturidade, respetivamente, obtidos neste ensaio laboratorial, definidos por Byrne, (1990). Gónadas femininas: (a) Fase III – Prematuro: presença de

Oócitos Primários (OP) com núcleo visível e espaços vazios (E) resultantes de uma desova parcial; (b) Fase IV – Maduro: Ovário rico em oócitos (O) no lúmen e uma fina camada de fagócitos nutritivos (FN) ao longo da parede; (c) Fase V – Parcialmente desovado: Ovário com espaços vazios (E) entre oócitos desagregados (OD) no centro; Gónadas masculinas: (d) Fase II – Crescimento: Testículo com colunas de espermatócitos em desenvolvimento a migrar (EM) e fagócitos nutritivos (FN); (e) Fase III – Prematuro: Testículo prematuro com espermatozoides (Es) e fagócitos nutritivos (FN) ao redor da periferia; (f) Fase IV – Maduro: Testículo repleto de espermatozoides (Es); (g) Fase V - Parcialmente desovado: Testículo parcialmente fecundado com espaços vazios (E) deixados pelos espermatozoides fecundados (Es)..... 78

Lista de tabelas

Tabela I: Proporção de células (cel/mL) de cada microalga a fornecer ao cultivo larvar de acordo com o volume celular de cada microalga e para cada fase do desenvolvimento larvar (Gomes et al., 2021).	26
Tabela II Caracterização das diferentes fases de maturação gonadal de <i>Paracentrotus lividus</i> , de acordo com Byrne (1990).	30
Tabela III: Dados biométricos [Peso Individual (g); Diâmetro (cm);] e caracterização histológica das gónadas [IGS (%); Fase de maturação] dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> usados como reprodutores no ensaio larvar I e no ensaio larvar II. O símbolo ♀ representa o sexo feminino e o símbolo ♂ representa o sexo masculino. A descrição do estágio de maturação encontra-se descrita na Tabela II.....	37
Tabela IV: Número total de larvas de <i>Paracentrotus lividus</i> no ensaio I e II, com diferenciação das fases larvares e identificação do dia inicial e final em que cada fase larvar foi observada. Os valores do ensaio I são relativamente aos quatro tanques de cultivo. Os valores do ensaio II são relativamente aos três tanques de cultivo.....	40
Tabela V: Dados biométricos e percentagem da taxa de sucesso de marcação com calceína em ouriços-do-mar, <i>Paracentrotus lividus</i> , para as duas experiências. O símbolo * representa diferenças estatísticas no crescimento (m_t) em relação ao fator tempo.	50
Tabela VI: Resultados da análise de regressão binomial de Poisson ao efeito da combinação entre os tipos de acondicionamento das placas, local e tempo decorrido no assentamento dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> . Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio de assentamento é inferior à referência (4ª semana*Tanque*Outdoor), enquanto a azul é superior à referência. Os valores de p-value a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).	79
Tabela VII: Resultados da análise do modelo de regressão binomial negativa com função de ligação log ao fator tipos de acondicionamento decorrido no assentamento dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> . Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio de assentamento é inferior à referência (Outdoor), enquanto a azul é superior à referência. Os valores de p-value a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).	79
Tabela VIII: Resultados da análise do modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log ao efeito da combinação entre o tempo e tipos de acondicionamento em relação ao crescimento dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> . Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio do crescimento é inferior à referência, enquanto a azul é superior à referência. Os valores de p-value a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).	80
Tabela IX: Resultados da análise do modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log ao efeito da combinação entre o tempo e tipos de acondicionamento das placas em relação ao crescimento dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> . Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio do crescimento é inferior à referência, enquanto a azul é superior à referência. Os valores de p-value a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).	81

1. Introdução

1.1 Valor ecológico e ameaças dos ouriços-do-mar

Os invertebrados constituem um grupo de animais desprovidos de vértebras, que atualmente inclui entre 30 a 35 filos (Migotto & Marques, 2003) incluindo, o filo Echinodermata. Este filo é composto exclusivamente por espécies marinhas, como é o caso dos ouriços-do-mar. Atualmente, são conhecidas mais de 1 000 espécies de ouriços-do-mar, com características morfológicas e ecológicas variadas. Os ouriços-do-mar encontram-se distribuídos por todos os oceanos. O seu habitat é bastante diversificado, abrangendo desde espécies que habitam a zona entremarés, junto à costa rochosa, até ao oceano profundo. O registo mais profundo da presença de ouriços-do-mar corresponde a uma espécie da família Pourtalesiidae encontrada a 7 340 metros na Fossa de Banda (Mironov, 1978). De forma geral, os ouriços-do-mar da classe Echinoidea são organismos omnívoros, com uma alimentação predominantemente herbívora, baseada em algas e, ocasionalmente, em invertebrados como pepinos-do-mar, mexilhões e esponjas marinhas. Os ouriços-do-mar são considerados espécies-chave na manutenção dos ecossistemas costeiros, uma vez que regulam a biomassa de algas (FAO, 2023b) através da alimentação.

Os ouriços-do-mar são ectotérmicos e dependem de fontes de calor externas para regularem a sua temperatura corporal. Assim, apresentam flutuações térmicas consoante o ambiente em que se encontram. Por esta razão o aquecimento dos oceanos afeta significativamente o metabolismo dos ouriços-do-mar. Estas mudanças de temperatura afetam diversos processos fisiológicos, incluindo a taxa de alimentação (Watts *et al.*, 2011), diretamente associada ao crescimento (Zhan *et al.*, 2019); o ciclo reprodutivo (Gibbs *et al.*, 2007); a resposta imune (Murano *et al.*, 2023) e, sobretudo, a sua sobrevivência a longo prazo (Hammond & Hofmann, 2010). As alterações climáticas têm ainda provocado a acidificação dos oceanos, processo caracterizado pela diminuição do pH resultante do aumento da absorção de dióxido de carbono nos oceanos (Prabhakaran *et al.*, 2025). Organismos que necessitam de carbonato de cálcio para a formação das estruturas de suporte e proteção são os principais afetados (Medeiros & Souza, 2023). Consequentemente, os ouriços-do-mar desenvolvem carapaças mais finas e fragilizadas, comprometendo a sua sobrevivência no habitat natural (Leung *et al.*, 2022). Face a estes impactos, os ouriços-do-mar são normalmente usados como modelos biológicos e referências para a avaliação da qualidade ambiental (Ternengo *et al.*, 2018).

As gónadas dos ouriços-do-mar, vulgarmente designadas ovas, são consideradas uma iguaria por todo o mundo. Na Ásia, destacam-se como grandes consumidores, a China, Japão e a Coreia do Sul; na Europa, França e Espanha; na Oceânia, a Nova Zelândia; e na América do Sul o Chile. Em Portugal, a procura por estes organismos é relativamente reduzida e, conseqüentemente, o mercado interno apresenta uma baixa expressão. No entanto, segundo Mendes *et al.*, (2019), mesmo não existindo uma tradição de consumo no país, registou-se uma intensa atividade de captura, sobretudo em praias rochosas da costa norte, destinadas à exportação. Esta exploração acentuada acrescenta uma ameaça adicional à espécie, sob forma de sobrepesca. Neste contexto, a Comissão Geral das Pescas do Mediterrâneo (CGPM) da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estabeleceu orientações específicas, em 2023, para o desenvolvimento de práticas de aquacultura de restauro (FAO, 2023a).

A *Bald Sea Urchin Disease* é um fenómeno de mortalidade em massa, com cada vez mais ocorrências na área de distribuição do ouriço-do-mar comum. Esta patologia caracteriza-se pela perda dos espinhos e dos pés-ambulacrários, bem como pelo aparecimento de lesões de diferentes dimensões no exoesqueleto (Shaw *et al.*, 2023). Os ouriços-do-mar infetados podem recuperar totalmente ou, em casos mais graves, morrer em consequência da infeção. Carella *et al.*, (2025) reportam uma variação significativa na patogenicidade, sugerindo que a diversidade de microrganismos e a presença de bactérias oportunistas poderão estar na origem da doença. Esta síndrome foi descrita pela primeira vez por Johnson, (1971) na espécie *Mesocentrotus franciscanus* (A. Agassiz, 1863), na costa da Califórnia (EUA).

Além do aquecimento e da acidificação dos oceanos, a defaunação marinha tem-se agravado nas últimas décadas devido às atividades humanas. A ação humana tem reduzido drasticamente a abundância de espécies, desde grandes cetáceos até pequenos peixes (McCauley *et al.*, 2015), alterando profundamente os ecossistemas e as cadeias alimentares. Mesmo espécies móveis que conseguem escapar do *stress* climático enfrentam riscos ao ocupar habitats inadequados. Como dependemos desses ecossistemas, os impactos da destruição marinha afetam diretamente a humanidade e representam uma ameaça significativa para o futuro. Como exemplo, desde 2022, a Turquia proibiu totalmente a pesca de *P. lividus* no Mar de Mármara, devido ao esgotamento do stock de *Paracentrotus lividus*, ao longo das áreas costeiras (Toso *et al.*, 2025). A aquacultura de ouriços-do-mar surge assim, como uma alternativa estratégica, contribuindo para a sustentabilidade das pescas futuras mitigando o risco de defaunação marinha.

1.2 A aquacultura de ouriços-do-mar

A aquacultura surge como uma alternativa promissora para combater a sobre-exploração do stock, permitindo a produção de ouriços-do-mar tanto para fins de comercialização das gónadas (ovas), como para o repovoamento de populações em risco ou sobrepesca.

Na China, a elevada procura levou a um rápido crescimento do setor aquícola durante a década de 1980 (Liu & Chang, 2015), impulsionado pelo desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo e pela diversificação da comercialização de diferentes espécies, nomeadamente no grupo dos ouriços-do-mar. As gónadas destes organismos, constituem um alimento tradicional, especialmente valorizado entre idosos, devido ao elevado teor em vitaminas e ácidos gordos polinsaturados (Polyunsaturated fatty acids - PUFA's). No Japão, o consumo de ovas é ancestral, particularmente entre populações costeiras, e a partir da década de 1950, com a introdução da refrigeração, este alimento passou a ser amplamente distribuído e apreciado em diferentes regiões do país (Unuma *et al.*, 2015).

No Golfo da Biscaia (Galiza e Cantábria), a produção de ouriços-do-mar tem vindo a ser impulsionada pela necessidade de gestão das pescarias selvagens, que enfrentam um declínio populacional acentuado. Na Cantábria, procede-se à avaliação de *stocks* para definição de zonas de captura sustentável, enquanto a Galiza introduziu medidas de gestão da apanha de ouriços-do-mar com a implementação de épocas de defeso e de práticas de aquacultura com o objetivo de restaurar populações naturais (Fernández-Boán *et al.*, 2012). De forma semelhante, em Portugal, a gestão das populações de ouriços-do-mar tem vindo a integrar medidas de conservação, com restrições sazonais à captura. De acordo com o Despacho n.º 20/DG/2025 (DGRM), a apanha das espécies *Echinus spp.*, *P. lividus* e *Sphaerechinus granularis* encontra-se interdita por motivos biológicos nas seguintes áreas e períodos: a) A Norte do estuário do rio Tejo entre 15 de junho e 15 de setembro; b) A Sul do estuário do rio Tejo entre 15 de julho e 15 de outubro. Estas medidas refletem uma tendência crescente de gestão sustentável das populações de equinodermes na Península Ibérica, aliando a monitorização da captura à implementação de práticas de aquacultura para repovoamento. Um exemplo de iniciativa sustentável é a empresa *Porto-Muiños*, dedicada à produção de macroalgas, que integrou ouriços-do-mar no seu cultivo, com a finalidade de repovoar locais de pesca vulneráveis, promovendo simultaneamente a recuperação dos ecossistemas e o aproveitamento sustentável dos recursos marinhos.

Na ilha de Procida (Itália), os ouriços-do-mar enfrentam a sobre-exploração das populações. Para responder a este problema, a Comissão Geral de Pesca do Mediterrâneo, em colaboração com investigadores locais, realizou campanhas de amostragens com vista ao repovoamento de populações locais com ouriços-do-mar produzidos em laboratório. Neste âmbito, destaca-se a empresa Echinus que, em parceria com o instituto de investigação Anton Dohrn Zoology Centre, produziu ouriços-do-mar através da fertilização artificial (FAO, 2023b). Após atingirem a fase juvenil e estarem aptos para sobreviver em ambiente natural, estes indivíduos são reintroduzidos em áreas designadas para aquacultura e repovoamento (Echinus Procida, 2021).

Estação piloto de piscicultura de Olhão (EPPO) tem desempenhado um papel central na otimização do ciclo reprodutivo de *P. lividus* em meio laboratorial, com especial destaque no desenvolvimento de protocolos que promovem a sobrevivência larvar (Mendes *et al.*, 2019). Paralelamente, têm sido conduzidos estudos ecológicos relacionados com os padrões de distribuição e classes de tamanho (Bertocci *et al.*, 2014; Domínguez *et al.*, 2015); a otimização do ciclo reprodutivo em condições controladas (Gomes *et al.*, 2021); técnicas de marcação para fins de repovoamento (Correia *et al.*, 2023).

Apesar dos avanços já alcançados no controlo do ciclo de vida do ouriço-do-mar em aquacultura, um dos maiores desafios consiste ainda na necessidade de obtenção de reprodutores a partir do meio natural, de forma a garantir o sucesso das populações.

Neste contexto, a aquacultura voltada para ações de restauro e repovoamento não só contribui para a criação de ambientes mais sustentáveis, como também promove novos serviços no ecossistema, reforçando a importância da integração destas práticas na gestão marinha.

1.2.1 Aquacultura para ações de repovoamento:

De acordo com FAO, (2023a), os objetivos centrais das ações de repovoamento incluem: a) o aumento da produção de stocks comerciais; b) a recuperação de espécies ameaçadas à extinção; c) a criação de novas culturas na atividade pesqueira, permitindo que a pesca se baseie na recaptura de indivíduos repovoados; d) a introdução de novas práticas de restauro, sobretudo quando a capacidade natural de expansão do stock é limitada pela destruição de áreas de desova ou pela perda de habitat. Estas ações requerem um elevado nível de

planeamento, dada a exigência de potenciais ameaças ecológicas e socioeconómicas associadas ao repovoamento.

Um exemplo frequentemente referido em iniciativas de restauro ecológico é a recuperação de recifes de corais. Ao longo do tempo, diversos estudos têm desenvolvido novas abordagens, desde os Estados Unidos (costa da Carolina do Norte) com a criação de protótipos de exoformas que favorecem a colonização e o desenvolvimento da vida marinha (Dunn *et al.*, 2019; Yoris-Nobile *et al.*, 2023); em Prado (Marselha, França) onde se localiza o maior recife artificial do Mediterrâneo (Charbonnel *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2022); até ao norte de Taiwan, onde são realizados transplantes de corais com o objetivo de avaliar a sua viabilidade (Carballo-Bolaños *et al.*, 2024).

Estes projetos devem ser fundamentados em razões ecológicas, apoiados em diretrizes éticas: a) utilização de materiais inertes, isentos de resíduos contaminantes; b) seleção de materiais resistentes às forças hidrodinâmicas; c) a facilidade de remoção das estruturas, caso necessário. A complexidade estrutural e morfológica dos materiais constitui uma características-chave para o sucesso dos projetos de repovoamento (Berman *et al.*, 2023).

Com base nestes princípios, diversos países têm vindo a desenvolver iniciativas de repovoamento, aplicando metodologias ajustadas às suas realidades ecológicas e socioeconómicas. Em Itália destacam-se projetos de restauro de populações vulneráveis de garoupa-escura (*Epinephelus marginatus*), após anos de sobrepesca. A aquacultura para repovoamento constitui uma estratégia para mitigar perdas potencialmente irreversíveis, incluindo a extinção de espécies ameaçadas pertencentes à Lista Vermelha da IUCN (Hamel & Mercier, 2013). Um exemplo notável é o pepino-do-mar (*Apostichopus japonicus*), cuja conservação das populações selvagens, em articulação com programas de repovoamento, tem demonstrado resultados promissores (Zhang *et al.*, 2015). Nos cefalópodes, as ações de repovoamento emergiram a partir da crescente consciencialização sobre o esgotamento dos recursos naturais e da necessidade da sua conservação (Nabhitabhata & Segawa, 2014). Os esforços mais relevantes concentram-se sobretudo no Japão e na Tailândia, envolvendo espécies como *Sepioteuthis lessoniana* (Nabhitabhata & Ikeda, 2014), *Sepia spp.* (Dan *et al.*, 2008; Nabhitabhata, 2014) e *Octopus vulgaris* (Okumura *et al.*, 2005) selecionadas pelo sucesso demonstrado em ensaios de aquacultura, e pela sua importância socioeconómica na pesca. Para além da recuperação populacional, estas iniciativas permitem avaliar o sucesso da sobrevivência de juvenis no meio natural (La Mesa *et al.*, 2008). Para isso, é necessário

desenvolver metodologias de marcação eficientes, pois as avaliações obtidas permitem comprovar o potencial desta prática para a recuperação de populações selvagens. No mediterrânico, encontra-se em curso a aquacultura de larvas de atum-rabilho-do-Atlântico (*Thunnus thynnus*), marcadas para fins de repovoamento (Bridges *et al.*, 2020). Também no Mar Negro têm sido implementados programas consistentes desde 1999, com destaque para o melhoramento do pregado (*Scophthalmus maximus*), o reforço de populações de truta (*Salmo labrax*) e de esturjão (família Acipenseridae) (Ak *et al.*, 2016). Estes programas, desenvolvidos na Turquia, procuram mitigar os efeitos da sobre-exploração, das alterações ambientais e das pressões antropogénicas, promovendo a recuperação da biomassa reprodutora, ultrapassando as limitações no recrutamento de peixes (FAO, 2023a).

A libertação de animais para fins de repovoamento tem registado um aumento contínuo. No Canadá e no Japão, incubadoras de Salmão libertam anualmente juvenis no Oceano Pacífico Norte (NPAFC, 2025). Na Suécia, enguias-de-vidro europeias (*Anguilla anguilla*) são libertadas ao longo do norte da Europa (Wickström & Sjöberg, 2014). Na Bacia Murray-Darling, na Austrália, espécies nativas como *Bidyanus bidyanus*, *Maccullochella peelii* e *Macquaria ambigua* são igualmente repovoadas (Gillanders *et al.*, 2006).

Além dos peixes e cefalópodes, espécies bentónicas como ouriços-do-mar têm recebido atenção crescente em programas de repovoamento, não apenas para restaurar populações, mas também para preservar o equilíbrio dos ecossistemas costeiros.

Recentemente, Malta iniciou um projeto de repovoamento de ouriços-do-mar com a duração de três anos. A iniciativa está alinhada com o Plano Nacional Plurianual de Aquacultura Sustentável (2022-2030), e tem como objetivos integrar a produção de ouriços-do-mar em Sistemas Integrados de Aquacultura Multitrófica (IMTA) e reintroduzi-los no habitat natural, após a moratória implementada pelo Governo de Malta (Environment and Resources Authority, 2023). Programas de reforço de populações por meio da libertação de ouriços-do-mar criados em regimes controlados na natureza têm sido objeto de estudos limitados, destacando-se iniciativas no Japão (Agatsuma, 2011), nas Filipinas (Junio-Meñez *et al.*, 2008) e no Mar Mediterrâneo (Couvray *et al.*, 2015).

Existe uma lacuna no conhecimento sobre o sucesso das práticas de repovoamento (Warren-Myers *et al.*, 2018). Os métodos de rastreio permitem determinar preferências de habitat, padrões de migração, tamanho populacional e taxas de crescimento, possibilitando ainda gestão da mortalidade. Existem três tipos principais de marcação (Kshatri *et al.*, 2025; Santos

et al., 2022): a) a biológica, baseia-se em características naturais, como parasitas ou marcadores genéticos para identificação individual; b) a química utiliza substâncias conhecidas como marcadores identificáveis, que permanecem nos tecidos ou estruturas dos organismos; c) a física envolve a anexação de etiquetas visíveis aos organismos, permitindo uma monitorização direta.

A marcação química com calceína (2,4-bis-[N,N'-di(carbomethyl)-aminomethyl]-fluoresceína) constitui um método menos invasivo e de fácil aplicação em programas de estudos de juvenis de ouriços-do-mar (Rodríguez *et al.*, 2016). Este fluorocromo incorpora-se em estruturas calcificadas, devido à ligação irreversível aos iões de cálcio, durante o processo de biomineralização (Santos *et al.*, 2022). Nos ouriços-do-mar, a calceína cora as estruturas calcificadas, tornando visível, sob microscopia de epifluorescência, uma marca fluorescente verde brilhante, persistente ao longo do tempo (Haag *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2013). Os fluorocromos podem ser administrados por via injetável, por imersão em banhos químicos ou adicionados à ração. Entre estes, a marcação por imersão é o método mais comum para organismos em fases de vida iniciais (Purcell & Blockmans, 2009), uma vez que é um método acessível de baixa toxicidade (Purcell *et al.*, 2006). A avaliação do custo/benefício das ações de aumento das populações no meio natural é fundamental para sustentar a atividade pesqueira, estimando-se as taxas de sobrevivência após o repovoamento dos ouriços-do-mar e o seu crescimento (Correia *et al.*, 2023). Aproveitando os avanços tecnológicos, novos métodos de marcação podem ser desenvolvidos, permitindo aprimorar a recolha de dados e delinear com maior precisão os ecossistemas aquáticos (Kshatri *et al.*, 2025; Santos *et al.*, 2022). Estes dados apoiam práticas de pesca sustentáveis e reforço na conservação.

1.2.2 Soluções de base natural para ações de repovoamento

No seu habitat natural, em particular na zona intertidal, os ouriços-do-mar são encontrados frequentemente em alvéolos rochosos (Carvalhido *et al.*, 2016; Jacinto & Cruz, 2012) (Figura 1a). Estas cavidades são escavadas pelos próprios indivíduos, à medida que se fixam, criando micro-habitats que acolhem e fornecem abrigo a uma grande variedade de algas, invertebrados e pequenos peixes, funcionando como abrigo para os ouriços-do-mar (Jacinto *et al.*, 2013). Ainda de acordo com este estudo, uma análise comparativa entre Itália e Portugal, concluiu que a mesma espécie apresenta diferentes formas de refúgios. No

sudoeste de Portugal, os ouriços-do-mar encontram-se frequentemente alojados em alvéolos, enquanto no noroeste da Itália é mais frequente ocuparem fendas. Estes resultados sugerem um comportamento adaptativo, que lhes permite uma maior resistência às condições hidrodinâmicas.

O projeto *Living Surfaces*, desenvolvido em parceria com o Laboratório de Investigação em Design e Artes (LIDA), centro de investigação da Escola Superior de Artes e Design do Politécnico de Leiria. Este projeto tem como objetivo central o desenvolvimento de estruturas físicas destinadas a albergar ouriços-do-mar após o assentamento. Os substratos produzidos através de impressão cerâmica 3D, servirão para apoiar a regeneração das populações de ouriços-do-mar ao longo da costa portuguesa, demonstrando o potencial do *design* aplicado à regeneração ecológica.

Estruturas de assentamento foram projetadas e produzidas através da impressão 3D conforme os substratos naturalmente colonizados pelos ouriços-do-mar. A sua principal função é fornecer alimento e proteção durante uma fase crítica do ciclo de vida, a metamorfose e assentamento bentónico, caracterizada por elevadas taxas de mortalidade.

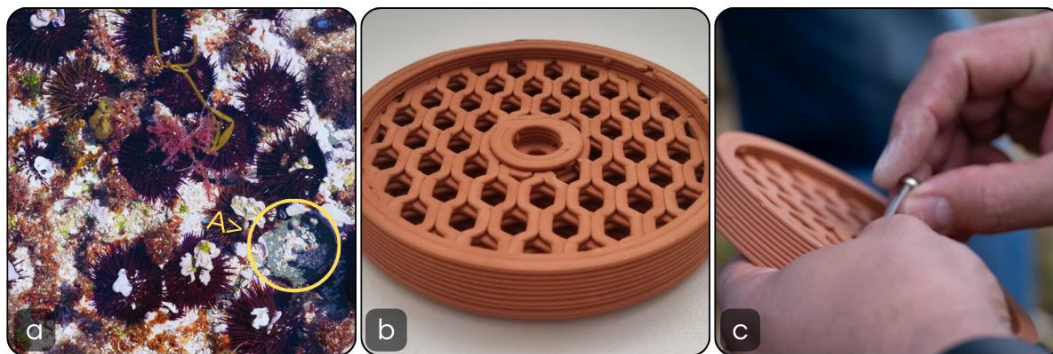


Figura 1: a) Habitat de *Paracentrotus lividus*, na zona rochosa intertidal, ocupando alvéolos rochosos (A) formados pelos ouriços-do-mar; b) Placas de cerâmica 3D para assentamento dos ouriços-do-mar; c) Demonstração da estrutura de fixação das placas de assentamento no meio natural.

Segundo Levy *et al.*, (2022) e Berman *et al.*, (2023), a impressão 3D utilizando o barro vermelho demonstrou ser particularmente eficaz na produção de geometrias biocompatíveis, como alvéolos. Ensaio preliminares revelaram que o design das placas (Figura 1b e 1c), favorece a formação de biofilmes, sustentados pelo crescimento de algas, tanto em condições laboratoriais como em meio natural, devido à porosidade do material. Adicionalmente, as placas de assentamento têm como segunda função a proteção física dos ouriços-do-mar, possibilitando o seu alojamento após a metamorfose. Esta fase é especialmente delicada,

exigindo elevados cuidados, uma vez que os indivíduos apresentam dimensões reduzidas e elevada sensibilidade ambiental.

Tendo como objetivo o repovoamento, a instalação destas placas de assentamento nas zonas intertidais ao longo da costa portuguesa, deve assegurar resistência e durabilidade face ao desgaste provocado pelas forças hidrodinâmicas. A permanência destes substratos deve ser garantida pelo tempo necessário até que os ouriços-do-mar juvenis migrem para estruturas naturais circundantes, sendo igualmente essencial assegurar que não ocorre a libertação de resíduos contaminantes para o ambiente marinho (Correia *et al.*, 2023).

O projeto *Living Surfaces*, para além de facilitar a observação das diferentes fases de desenvolvimento dos ouriços-do-mar, promove também a sensibilização pública para a importância da preservação dos ecossistemas marinhos.

1.3 Ouriço-do-mar comum, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

O ouriço-do-mar comum, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), é um equinoderme com distribuição natural desde a Escócia, na costa nordeste do Oceano Atlântico, arquipélagos da Macaronésia, Açores, Madeira e Canárias, até ao mar Mediterrâneo (Boudouresque & Verlaque, 2020; Hereu *et al.*, 2004). Nestas regiões, o ouriço-do-mar comum é encontrado, desde o intertidal até aos 30 metros, sendo mais comum na faixa entre os 0 e 10 metros de profundidade (Boudouresque & Verlaque, 2020; Hereu *et al.*, 2004).

A estrutura populacional de *P. lividus* apresenta variações significativas, nomeadamente no noroeste do Mediterrâneo (Sala & Zabala, 1996), em consequência da diminuição dos stocks de peixes predadores resultante da atividade pesqueira. De acordo com os mesmos autores, em reservas marinhas, as populações de *P. lividus* são principalmente reguladas pela predação, enquanto em zonas desprotegidas a sua abundância é determinada sobretudo pela intensidade das capturas. Assim, a elevada pressão pesqueira, aliada ao facto de *P. lividus* ser um herbívoro bentónico, desencadeia um efeito em cascata que influencia a estrutura das comunidades bentónicas infralitorais. A guilda de predadores naturais de *P. lividus* inclui os esparídeos *Diplodus sargus* e *Diplodus vulgaris*, o labrídeo *Coris julis* (Sala & Zabala, 1996), o caranguejo-aranha *Maja crispata* e o gastrópode *Hexaplex trunculus* (Boudouresque & Verlaque, 2001). Todas estas espécies estão atualmente classificadas como de “*Least Concern*” pela União Internacional para a Conservação da Natureza. Contudo, o desenvolvimento de iniciativas de repovoamento de *D. sargus*, em algumas regiões, reflete

uma crescente preocupação local com a pressão pesqueira (Giacalone *et al.*, 2022). Assim, compreende-se que a sobre-exploração dos recursos pode conduzir ao desequilíbrio e descontrolo dos ecossistemas marinhos. Apesar de não estar classificada como espécie ameaçada, diversos estudos relatam que pressões significativas, tais como o aumento da temperatura do mar, a sobrepesca e ocorrência de eventos de mortalidade em massa, podem comprometer a longo prazo a sustentabilidade das populações de *P. lividus* (Becker *et al.*, 2008; Bertocci *et al.*, 2018; Carella *et al.*, 2025; Toso *et al.*, 2025; Yeruham *et al.*, 2015).

Paracentrotus lividus, pertencente à classe Echinoidea, apresenta um corpo esférico coberto por um esqueleto rígido (carapaça), revestido por espinhos móveis. O aparelho mastigatório, designado lanterna de Aristóteles, confere aos ouriços-do-mar a capacidade de morder e rasgar substratos (Jangoux & Lawrence, 1982). Ao seu redor dispõem-se os pés ambulacrários, que permitem a locomoção lenta por pressão hidráulica (Flammang & Santos, 2024) e adesão química mediada por secreções (Hennebert *et al.*, 2012), desempenhando também funções de defesa. O endoesqueleto, formado por placas firmemente articuladas, confere rigidez à carapaça, que protege os órgãos internos e suporta os espinhos móveis. Nos primeiros dois anos de vida, pode atingir um diâmetro médio de 2 cm (Boudouresque & Verlaque, 2013), embora varie de acordo com fatores alimentares e de temperatura.

Embora os ouriços-do-mar sejam gonocóricos, a maioria das espécies não apresenta dimorfismo sexual externamente evidente (Formery *et al.*, 2022), característica comum entre os invertebrados marinhos. Existem diferentes tipos de dimorfismo sexual, de acordo com Brundu *et al.*, (2023): o primário, com função reprodutiva direta; secundário, associado à otimização do sucesso reprodutivo; e o ecológico, quando os sexos desempenham diferentes papéis ecológicos. No caso de *P. lividus*, observa-se dimorfismo sexual do tipo secundário ao nível da abertura dos gonóporos, característica anatômica que favorece a eficiência da reprodução através da libertação de gametas na coluna de água. Os machos apresentam protuberâncias cónicas, enquanto as fêmeas exibem aberturas geralmente planas e ligeiramente afundadas (Brundu *et al.*, 2023). A identificação deste dimorfismo sexual, constitui um avanço relevante, permitindo o desenvolvimento de estudos em meio laboratorial, sem necessidade de induzir *stress* ou causar mortalidade nos indivíduos reprodutores, representando assim um método não invasivo.

O ciclo reprodutivo de *P. lividus* em Portugal, inicia-se com a maturação das gónadas durante o outono-inverno, sendo seguida por uma única, mas prolongada época de desova na primavera-verão (Raposo *et al.*, 2023). A desova ocorre na coluna de água, em eventos sincronizados e com fertilização externa (Formery *et al.*, 2022).

Tal como noutras espécies de ouriço-do-mra, o ciclo de vida do *Paracentrotus lividus* apresenta quatro períodos principais: o embrionário, o larvar, o juvenil e o adulto (Figura 2) (Formery *et al.*, 2022).

O período embrionário abrange o desenvolvimento do embrião desde a fertilização até à fase de prisma. Esta fase inclui a transformação do zigoto, que sofre sucessivas divisões celulares até atingir cerca de 60 células. A estrutura passa então a ser designada por blástula, seguindo-se a gástrula. Nesta etapa dá-se a invaginação do polo vegetal do embrião para dar origem ao primórdio do trato digestivo e inicia-se a formação do endoesqueleto, através da deposição de carbonato de cálcio. O período embrionário termina imediatamente antes da abertura da boca da larva e da formação da cavidade corporal larvar.

O período larvar corresponde ao desenvolvimento da larva *pluteus*, evoluindo para as quatro, seis e oito braços, e na fase final o desenvolvimento do rudimento (Hodin *et al.*, 2016). O rudimento é uma estrutura resultante da invaginação do ectoderma no lado esquerdo da larva, em associação com uma vesícula celómica, que dará origem ao juvenil (Hodin *et al.*, 2016). Durante o desenvolvimento larvar, as estruturas juvenis diferenciam-se progressivamente no interior da larva, até que o organismo atinja a competência (Hodin *et al.*, 2016). Esta etapa marca o momento em que a larva se encontra morfologicamente apta para sofrer metamorfose, embora a sua concretização dependa da deteção de sinais ambientais adequados (Burke, 1980).

O período juvenil inicia-se imediatamente após a metamorfose, quando o organismo adota o estilo de vida bentónico com simetria pentarradial. Este período compreende o crescimento do juvenil até à aquisição da maturidade sexual, quando se transforma em adulto. O período adulto, prolonga-se até à morte do indivíduo, que em populações selvagens de *P. lividus* ocorre, em média, entre os 6 e os 9 anos de idade (Crapp & Willis, 1975).



Figura 2: Fases do ciclo de vida de *Paracentrotus lividus*. **Período embriogénese:** Zigoto; 2-células; 4-células; 8-células; Blástula; Gástrula; Prisma. **Início do período larvar:** Pluteus; 4-braços; 6-braços; 8-braços; competência. **Período adulto:** Após assentamento.

1.3.1 Fatores que desencadeiam o assentamento bentónico:

A produção de juvenis de ouriços-do-mar é um grande desafio, tanto ao nível da investigação como da aquacultura comercial. Os principais fatores críticos estão associados às complexas relações bióticas que ocorrem durante a metamorfose (Mendes *et al.*, 2019). Durante esta etapa, a taxa de mortalidade pode atingir valores próximos de 99% na natureza (Boudouresque & Verlaque, 2013), devido ao insucesso na transição para a fase bentónica. Para melhorar o sucesso produtivo, torna-se essencial otimizar estes pontos críticos. Interligado à fase da metamorfose, destaca-se ainda o fator alimentar. O desenvolvimento do animal não se conclui após esta etapa, sendo fundamental a definição de um regime alimentar eficiente (Cirino *et al.*, 2017).

Logo após a metamorfose, os juvenis ainda apresentam a boca e o ânus fechados, com o trato digestivo não funcional, encontrando-se, portanto, numa fase endotrófica. Assim, as larvas devem acumular reservas lipídicas suficientes antes de iniciar a metamorfose (Uz *et al.*, 2013). Posteriormente, quando o trato digestivo se torna funcional, o juvenil passa a ser exotrófico, sendo a primeira alimentação um momento de extrema importância.

A elevada taxa de mortalidade pode estar associada à ausência de uma boca funcional nos primeiros dias após a metamorfose (Fadl *et al.*, 2019). Um atraso no desenvolvimento muscular compromete o funcionamento das peças bucais durante vários dias, mantendo a boca efetivamente fechada. Estes períodos iniciais prolongados resultam em *stress* nutricional significativo para os juvenis. No seu estudo, Fadl *et al.*, (2019), concluíram ainda, através da utilização de técnicas moleculares, que um gene associado ao *stress* nutricional é abundantemente expresso, antes do trato digestivo se tornar funcional. Esse gene é expresso

nos pés ambulacrais, junto aos órgãos sensoriais, o que poderá indicar o envolvimento na detecção de nutrientes, desencadeando eventos celulares como sinalização nutricional.

A transição de larvas planctónicas para juvenis bentónicos representa uma fase crítica. Em aquacultura, esta etapa é geralmente promovida com placas de assentamento colonizadas por diatomáceas, que funcionam como alimento inicial (Araújo *et al.*, 2020). No entanto, Brundu *et al.*, (2016), demonstram que existem outros estímulos capazes de otimizar este processo, tais como a presença de coespecíficos, que resulta numa maior taxa de assentamento.

1.4 Objetivos do estudo:

Este trabalho propôs-se a investigar estratégias para a otimização do ciclo de vida de *Paracentrotus lividus*, em condições controladas. Para tal, os objetivos específicos consistiram em:

- i) Avaliação do nível de maturação do stock reprodutor como fator influenciador da sobrevivência larvar;
- ii) Análise da viabilidade de diferentes biofilmes desenvolvidos nas placas de cerâmica 3D para o assentamento, e no diâmetro dos juvenis;
- iii) Otimizar a detecção e monitorização dos juvenis assentados nas placas, mediante a marcação química com calceína.

2. Materiais e métodos:

2.1 Cultivo de microalgas:

Diferentes espécies de microalgas foram cultivadas, com finalidades distintas. A espécie *Rhodomonas lens* e *Chaetoceros gracilis* foram utilizadas como alimento das diferentes fases larvares dos ouriços-do-mar, enquanto *Skeletonema costatum* e *Nitzschia acicularis* para formação de biofilmes na superfície das placas de assentamento.

As culturas foram mantidas em balões volumétricos com capacidades entre 250 mL e 2L, contendo água do mar esterilizada (autoclavada a 120 °C durante 20 minutos) enriquecida com uma solução de nutrientes comercial f/2 (Nutribloom Plus, Necton, Portugal) para microalgas. As condições de cultivo foram mantidas numa sala de ambiente controlado: temperatura constante de 20 °C, fotoperíodo de 10 horas de luz e 14 horas de escuridão e arejamento constante.

Os balões volumétricos, previamente esterilizados, eram preenchidos com 1/3 da cultura de microalga e completados com água salgada esterilizada, à qual se adiciona o meio de cultura f/2 e, no caso das diatomáceas (*Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum* e *Nitzschia acicularis*) também uma solução de silicatos (SiO₃Na) (45 g/L) na proporção de 1 mL por litro de cultivo. As culturas eram mantidas com arejamento suave com ar ambiente previamente filtrado, para assegurar uma mistura homogênea e oxigenação contínua dos cultivos. Semanalmente eram realizadas repicagens e *scale-up* de cada microalga, de acordo com as necessidades alimentares das larvas.

As microalgas em cultivo eram fornecidas às larvas de ouriço-do-mar na fase exponencial do crescimento do cultivo de acordo com a Tabela I. A alimentação foi padronizada para garantir concordância entre o volume e número celular de cada microalga. As concentrações de microalgas nos balões de cultivo, eram verificadas regularmente, utilizando uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Germany), por meio de um microscópio óptico AxioLab (Carl Zeiss, Germany).

Tabela I: Proporção de células (cel/mL) de cada microalga a fornecer ao cultivo larvar de acordo com o volume celular de cada microalga e para cada fase do desenvolvimento larvar (Gomes *et al.*, 2021).

Dieta Mix	Volume da célula	Alimentação Diária (cel/mL)		
		4-braços	6-braços	8-braços
<i>Rhodomonas lens</i>	248 µm ³	500	1000	2000
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	88 µm ³	1500	3000	6000

2.2 Desenvolvimento e condicionamento de placas de assentamento:

As placas de assentamento, feitas em colaboração com a equipa LIDA foram acondicionadas de forma a criar biofilmes de três naturezas diferentes: microalgas diatomáceas, biofilme natural *indoor* e biofilme natural *outdoor*.

Para o acondicionamento com microalga diatomáceas (Figura 3b), oito placas de cerâmicas foram colocadas no interior dos aquários de cultivo de *Skeletonema costatum* e *Nitzschia acicularis* juntamente com meio f/2 comercial com exposição a luz (10D:14N). Semanalmente, era adicionada água juntamente com meio de cultivo (Nutribloom Plus, Necton, Portugal) e solução de silicatos para compensar a evaporação.

Para o acondicionamento das placas com biofilme *indoor* (Figura 3c), usou-se água do mar recolhida na praia do Carreiro de Joanes, Peniche (39°21'17.7"N 9°23'40.4"W). Esta foi filtrada com um filtro de 100 µm de forma a separar a fração zooplânctónica. Após esta

filtração, a água do mar foi transferida para aquários e enriquecida com meio f/2 e silicatos, com exposição a luz (10D:14N). Este acondicionamento requeria do mesmo cuidado, adicionando água da praia previamente filtrada, nutrientes e silicatos para compensar evaporação.

O acondicionamento com biofilme *outdoor*, as placas de assentamento foram tratadas de duas formas. No ensaio I, oito placas foram colocadas numa caixa, a 1 metro de profundidade, na marina de Peniche (39°21'07"N 9°22'36"W) (Figura 3d). No ensaio II, quatro placas foram fixadas à rocha, na zona intertidal da praia da Gambôa - Peniche (39°21'54.4"N, 9°22'25.5"W) (Figura 3e).

O ensaio I teve como tratamentos os acondicionamentos com biofilme de microalgas, *indoor* e *outdoor* da marina, mantidos em cultivo durante 21 dias. Em relação ao ensaio II o tratamento a analisar foi o biofilme de *outdoor* da praia da Gambôa com as mesmas condições que as descritas anteriormente, mas num período de 60 dias de acondicionamento. Após os 60 dias de condicionamento *outdoor*, estas placas estavam colonizadas por algas pioneiras (Figura 3e), pertencentes aos três principais grupos taxonómicos, nomeadamente:

- Chlorophytas: *Ulva clathrata* e *Ulva intestinalis*;
- Phaeophyceae: *Colpomenia peregrina* e *Scytosiphon lomentaria*;
- Rhodophyta: *Asparagopsis armata*, *Ceramium ciliatum*, *Chondracanthus acicularis*, *Vertebrata fruticulosa* e *Vertebrata nigra*.

Para prevenir qualquer tipo de contaminação com outros organismos competidores das larvas de ouriço-do-mar, as placas passaram por um processo de lavagem química com uma solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) a 8% por uma hora, seguido de um enxaguamento com água do mar filtrada, antes de serem transferidos para os tanques dos reprodutores. As placas foram transferidas, durante sete dias para os tanques dos reprodutores para obtenção de fatores coespecíficos, um dos estímulos usados laboratorialmente para melhorar a etapa de assentamento das larvas de ouriço-do-mar (Brundu *et al.*, 2016).

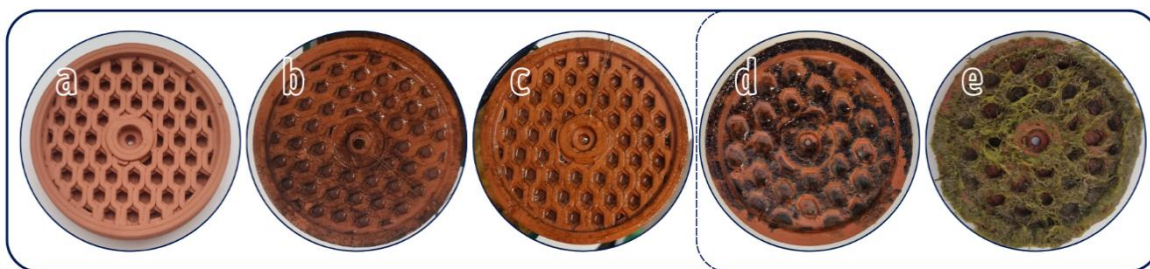


Figura 3: Ilustração dos vários tratamentos avaliados durante o ensaio I e II: a) Placa Controlo Negativo; b) Placa Biofilme Microalga; c) Placa Biofilme *Indoor*; d) Placa Biofilme *Outdoor* Marina; e) Placa Biofilme *Outdoor* Praia.

2.3 Recolha do stock reprodutor:

Para a realização dos dois ensaios de desenvolvimento larvar, foram recolhidos ouriços-do-mar adultos da espécie *P. lividus*: 27 indivíduos em abril de 2025 e 28 indivíduos em junho de 2025. Todos os indivíduos foram recolhidos na Praia do Porto Batel (39° 19.35' N; 9° 21.5' W), Atouguia da Baleia em Peniche, Portugal.

Os organismos foram recolhidos manualmente, de forma aleatória, em diversas poças de maré na zona intertidal, sendo selecionados indivíduos com diâmetro compreendido entre 3,5 cm e 5,7 cm. Após a recolha, os ouriços-do-mar foram transportados para o laboratório de Aquacultura do MARE - Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, onde foram submetidos a um processo de limpeza com água salgada para remover pedras, conchas e organismos epibiontes.

Dos 27 indivíduos capturados para o ensaio I, 18 foram direcionados para a reprodução e 9 destinados à análise histológica. No ensaio II, 16 indivíduos foram usados para reprodução e 12 para análise histológica.

2.3.1 Recolha de dados biométricos:

No laboratório, os organismos foram pesados individualmente (P – peso húmido), numa balança de precisão Kern & Sohn GmbH Ziegelei (Balingen, Germany; 2500 ± 0,01 g) e medido o diâmetro da carapaça (DC), com auxílio de uma craveira analógica (150 mm ± 0,02 mm).

2.3.2 Análise histológica:

A análise histológica inicia-se pela incisão da membrana peristomal e recolha das gónadas do interior da cavidade celómica para determinação do peso total das gónadas. A partir do peso das gónadas, foi calculado o índice gonadossomático seguindo a fórmula (Carboni *et al.*, 2015; Sartori & Gaion, 2016):

$$GS = \frac{\text{Peso húmido das gónadas (g)}}{\text{Peso húmido total (g)}} \times 100$$

Uma gónada de cada indivíduo foi fixada numa solução de formol a 4% durante um período de 48 horas. Após a fixação, esta foi transferida para uma solução de etanol a 70% para manter em armazenamento até ao seu processamento histológico.

Este processo inicia-se com a desidratação das gónadas pelo auxílio de um processador automático de tecidos Leica® TP1020 (Leica Microsystems GmbH). Aqui as amostras são sucessivamente submersas em etanol de concentrações crescentes (80%, 96% e 99%), seguidas de imersão em xilol para limpeza. O processo termina com a impregnação dos tecidos com a imersão destes num banho de parafina.

Após as 24 horas no processador, as amostras de gónadas foram manualmente incluídas em blocos de parafina a 100% (v/v). Após a secagem, os blocos de parafina foram cortados num micrótomo rotativo Accu-Cut® SRM™ 200 (Sakura Finetek Europe BV, Países Baixos) de forma a obter secções de 5µm de cada gónada, em triplicado.

As secções histológicas foram, por fim, coradas com uma combinação de hematoxilina de Harris (Scharlab S.L., Sentmenat, Barcelona, Espanha) e eosina Y (VWR International, Leuven, Bélgica). O corante hematoxilina, apresenta um comportamento basófilo, o que leva a corar estruturas ácidas de uma cor azul/roxa, como é o caso dos ácidos nucleico. O corante eosina, apresenta um comportamento acidófilo, corando estruturas básicas como proteínas com uma coloração rosa/avermelhada (McCann *et al.*, 2015). São por isso corantes complementares, devido aos seus comportamentos químicos opostos.

A análise histológica foi procedida com auxílio do microscópio óptico AxioLab acoplado de uma Câmara digital Zeiss AxioCam MRc3 (Carl Zeiss, Germany), através de um software ZEN 3.11 (*lite edition*) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), classificando as diferentes fases de maturação (Tabela II) conforme descrito por Byrne (1990).

Tabela II Caracterização das diferentes fases de maturação gonadal de *Paracentrotus lividus*, de acordo com Byrne (1990).

Fase I	Recuperação	♀	Oócitos primários (coloração: roxo-escuro) com fagócitos nutritivos. Ovário com aparência vacuolada.
		♂	Espermatogónios e espermatócitos primários com fagócitos nutritivos.
Fase II	Crescimento	♀	Oócitos primários aumentam de tamanho (coloração: roxo-claro), rodeados por fagócitos nutritivos.
		♂	Espermatócitos projetam-se centralmente, rodeado de fagócitos nutritivos.
Fase III	Prematuro	♀	Grandes oócitos primários (coloração: Rosa) nos diferentes estágios de desenvolvimento, com reduzidos fagócitos nutritivos.
		♂	Testículos prematuros onde os espermatozoides acumulam-se no lúmen. Os fagócitos nutritivos afastados devido aos espermatozoides.
Fase IV	Maduro	♀	Oócitos maduros, sendo que fagócitos nutritivos estão parcialmente ausentes.
		♂	Testículos maduros repletos de espermatozoides e os fagócitos nutritivos estão limitados à periferia.
Fase V	Parcialmente Desovado	♀	Ovários vagamente preenchidos com espaços deixados pelos oócitos. Fagócitos nutritivos ausentes.
		♂	Espaço no lúmen e os espermatozoides menos concentrados
Fase VI	Esgotado	♀	Ovários desprovidos de conteúdo.
		♂	Testículos desprovidos de conteúdo.

2.4 Indução da desova e fertilização:

Para indução da desova foram usados no ensaio I, 18 organismos ($P = 35,51 \pm 9,74$ g), já no ensaio II, 16 organismos ($P = 43,23 \pm 10,49$ g).

A desova foi induzida através da administração de cloreto de potássio (KCl) a 0,5M (40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso corporal) na membrana peristomial com movimentações circulatorias dos ouriços-do-mar para uniformizar a solução no interior do organismo (Carboni, 2013; Gago, 2009; Rahman *et al.*, 2012). O aumento da concentração de potássio provoca despolarização das membranas das células musculares das gónadas dos reprodutores, causando contrações. Estas contrações levam à libertação dos gâmetas pelos gonoporos, por isso os ouriços-do-mar foram colocados com a região oral virada para baixo. Esta posição permite que as cinco placas genitais estejam voltadas para cima, onde ocorre a saída dos gâmetas, facilitando a

identificação do sexo do indivíduo. Os oócitos são recolhidos pelo auxílio de um esguicho de água salgada esterilizada (FSW) diretamente para um copo graduado de 1L já com FSW. Os espermatozoides são transferidos, com uma pipeta de *Pasteur*, para um microtubo mantido em gelo (4°C). O frio diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, não realizando gastos energéticos desnecessariamente e prolongando a sua viabilidade. As temperaturas baixas reduzem ainda os processos de degradação enzimática e oxidativa, ajudando assim a manter a qualidade dos gametas por mais tempo (Mita *et al.*, 1984).

Para determinar a concentração dos óvulos, foi usado uma câmara de Segdewick (Pysers-Sgi, Kent, Reino Unido) com uma ampliação de 50x, utilizando um microscópio óptico AxioLab. No caso da concentração de espermatozoides, foi necessária a utilização de uma câmara de Neubauer numa ampliação de 400x.

Para estabelecer o rácio previamente definido de 50 espermatozoides por oócito (Fabbrocini *et al.*, 2016), num copo graduado de 5 litros, foi adicionado à solução de oócitos o volume calculado de espermatozoides, garantindo a proporção ideal para a fertilização. O sucesso de fertilização foi determinado 2 horas após o início da mesma, através da observação da membrana de fertilização que rodeia o ovo (Figura 2). Após 12 horas do início da fertilização, os oócitos não fecundados, foram recolhidos e descartados para assegurar a qualidade do meio, tal como monitorização da oscilação de salinidade e constante arejamento fraco para homogeneizar o meio. Durante 48 horas, todas as fases da embriogénese foram monitorizadas, até chegarem à fase larvar de quatro-braços (4-braços) (Figura 2).

2.4.1 Desenvolvimento larvar:

Quando cerca de 75% das larvas estavam na fase de 4-braços, estas foram transferidas para quatro tanques cilíndricos de 50L em sistema fechado, garantindo uma densidade de 4 larvas/mL. A água utilizada para o cultivo das larvas era, previamente, filtrada através de quatro filtros de diferentes malhas (1 µm; 5 µm; 20 µm e 50 µm) seguidamente exposta a um tratamento UV. Após filtração a água era armazenada em dornas na sala do ensaio, com arejamento contínuo garantindo eliminação de cloro. A sala era mantida a uma temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 horas dia: 12 horas noite. No ensaio II, para evitar proliferação de zooplâncton na água de cultivo, esta foi tratada com hipoclorito de sódio (1mL:10L) com contínuo arejamento durante 24 horas seguido de neutralização com tiosulfato de sódio

(10mL:10L). Este tratamento extra garantia que a água utilizada para o desenvolvimento larvar não apresentava outros organismos que competiam por alimento e espaço.

Os parâmetros temperatura (°C); oxigênio dissolvido (%) e salinidade (ppt) eram monitorizados regularmente com uma sonda multiparamétrica portátil Oxímetro Handy Polaris (OxyGuard International A/S, Farum, Denmark). No caso das concentrações de nitritos (NO₂⁻) (mg/mL) e da amônia (NH₄⁺) (mg/mL), estas foram monitorizadas após trocas de água e purgas diárias através de testes colorimétrico da Tropic Marin. Regularmente, eram ainda feitas contagens, relativamente à fase de desenvolvimento larvar, com auxílio de uma câmara de Sedgewick.

A cada dois dias, era fornecida uma alimentação composta por microalga (*Rhodomonas lens* e *Chaetoceros calcitrans*), ajustada ao biovolume calculado e tendo em conta a fase de desenvolvimento larvar (Tabela I) (Azad *et al.*, 2011; Brundu *et al.*, 2016, Brundu *et al.*, 2017; Castilla-Gavilán *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2009; Rassoulzadegan *et al.*, 1984). Para garantir uma dosagem mais precisa, analisou-se o biovolume das microalgas, sendo que, segundo as equações pré-definidas (Hillebrand *et al.*, 1999), *Chaetoceros calcitrans* apresenta um biovolume de 88 μm³, enquanto *Rhodomonas lens* atinge 248 μm³ - aproximadamente o triplo do volume da diatomácea. Nestes mesmos dias, eram feitas contagens de três amostras de 20 ml de cada tanque para determinação da sobrevivência larvar (%) (Castilla-Gavilán *et al.*, 2018):

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{Densidade larvar do tanque}}{\text{Densidade larvar inicialmente distribuída pelo tanque}} \times 100$$

O desenvolvimento larvar dura entre 18 a 21 dias, dependendo da temperatura ambiental, em que as larvas sofrem mudanças morfológicas, atingindo a competência de assentamento quando o rudimento é igual ou superior ao tamanho do estômago (Carboni *et al.*, 2012; Gosselin & Jangoux, 1998; Kelly *et al.*, 2000) (Figura 2).

2.5 Sistema assentamento dos ouriços-do-mar:

2.5.1 Sistema pré-assentamento:

As placas vindas dos sistemas de manutenção de reprodutores para obter os fatores coespecíficos, foram direcionadas para dois sistemas diferentes como demonstrado na

Figura 4. Uma vez que cada tratamento (microalga, *outdoor* e *indoor*) apresentava 8 placas (8x), metade (4x) foram colocadas em aquários de 15L e a outra metade (4x) nos tanques cilindrocônicos (50L) onde foram cultivadas as larvas. Para cada tratamento foram usados dois aquários e um tanque cilindrocônico. No ensaio II, como o número de larvas não era suficiente, apenas foi possível testar quatro placas com acondicionamento *outdoor* (praia) e quatro placas de controlo, nos aquários de 15L.

Para promover o assentamento, no fundo dos tanques e aquários foram colocadas conchas de ostra e carapaça de ouriços-do-mar triturada, como fonte lenta de carbonato de cálcio, uma vez que em contacto com água do mar e dióxido de carbono, liberta iões de cálcio (Ca^{2+}). Além de fornecimento do composto necessário, as conchas, antes de serem transferidas para os sistemas, estiveram 60 dias nos tanques de reprodutores de *P. lividus* a criar biofilme a partir da matéria orgânica.

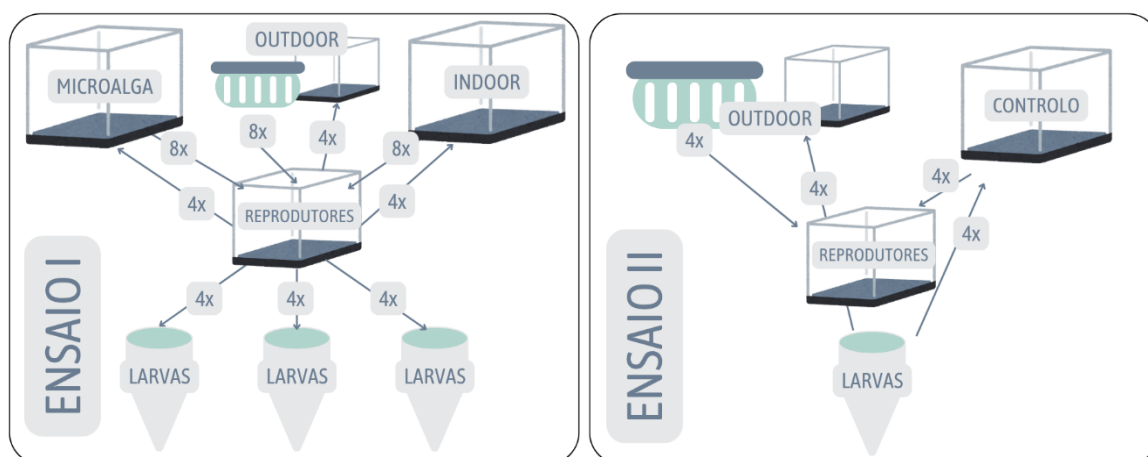


Figura 4: Desenho experimental das experiências de assentamento planejadas para o ensaio I e ensaio II.

2.5.2 Sistema pós-assentamento:

A partir da segunda semana após o assentamento larvar, as placas foram observadas semanalmente com o auxílio da lupa microscópica trinocular Stemi 508 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), com intuito de verificar a presença de ouriços-do-mar assentados. Os indivíduos encontrados eram contabilizados conforme o respetivo tratamento e, caso presentes, cerca de 30 ouriços-do-mar por placas eram medidos utilizando o software ZEN 3.11.

No ensaio I, as medições ocorreram até à quarta semana. Após este período, os ouriços-do-mar presentes nos aquários e tanques foram transferidos para uma sala de aquacultura

equipada de um sistema RAS (Sistema de Recirculação Aquícola), com um aquário dedicado a cada tratamento. A partir dessa semana, as amostragens foram retomadas e continuaram até à oitava semana, momento em que já não fosse observado biofilme nas placas de assentamento. No caso do ensaio II, o início da análise foi na segunda semana após o assentamento, até à quarta semana, porém não foram observados ouriços-do-mar assentados, levando ao término deste ensaio.

2.6 Marcação de juvenis com calceína:

A eficácia de marcação dos juvenis com marcador químico foi testada com um banho de calceína. Como referido anteriormente, a calceína é um identificador fluorescente que se liga ao cálcio (Correia *et al.*, 2023; Moran, 2000; Purcell & Blockmans, 2009; Rodríguez *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2022), permitindo não só identificação do organismo quando expostos uma luz ultravioleta, como também permite avaliar a taxa de crescimento do organismo uma vez que é incorporada em estruturas crescentes de carbonato de cálcio.

Dos ouriços-do-mar obtidos no ensaio larvar I, 270 foram medidos (m_i) (D: 0,11-2,80 mm) e selecionados aleatoriamente para o procedimento de marcação com calceína (Calcein disodium salt, ChemCruz, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Numa primeira experiência foram testadas 3 concentrações diferentes de calceína em triplicados 10, 20 e 50 mg/L. A calceína foi diluída em água do mar em copos graduados em triplicado de acordo com as concentrações selecionadas. Trinta ouriços-do-mar foram colocados em cada réplica da solução de calceína com arejamento, por um período de 24 horas, durante o qual não foram alimentados. Após as 24 horas os organismos foram lavados e observados numa Cabine de luz ultravioleta UVP UVGL-58 (Analytik Jena AG, Jena, Germany), para avaliar os organismos que se destacavam pela coloração amarelada. Após observação os ouriços-do-mar foram colocados nos mesmos copos graduados apenas com água do mar e arejamento durante 24 horas, sendo alimentados posteriormente, com alga laminaria ochroleuca desidratada (Figura 13d), recolhidas junto à costa de Peniche.

Já numa segunda experiência de marcação, foram selecionados 90 ouriços (D: 2,52 – 7,24 mm), submetidos às concentrações de 100 mg/L, 150 mg/L e 200 mg/L durante o mesmo período experimental e sob as mesmas condições. Neste segundo ensaio, as observações foram realizadas às 0 horas após a marcação com calceína (AMC); 1 dia AMC e 7 dias AMC, para determinação do sucesso de marcação:

$$\text{Sucesso de marcação} = \frac{n^{\circ} \text{ de indivíduos efetivamente marcados}}{n^{\circ} \text{ de indivíduos inicialmente sujeitos à marcação}}$$

Ao sétimo dia, os indivíduos foram novamente medidos (m_f) para avaliar um eventual crescimento.

2.7 Análise estatística:

Os testes estatísticos foram elaborados a partir do IBM SPSS™ Statistics 29 (IBM Corporation, Armonk, New York, U.S.). Os dados foram apresentados como média \pm desvio-padrão, com um nível de significância de $p < 0,05$.

Inicialmente, foram verificados os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, por meio dos testes de *Shapiro-Wilk* (para amostras com $n < 30$) ou *Kolmogorov-Smirnov* (para amostras com $n > 30$) e *Levene*, respetivamente.

Para comparação dos dados biométricos, foi usado o teste de *t*-student, para amostras independentes bilateral ($t_{(\text{graus de liberdade})} = \text{valor do teste}; p\text{-value}$). Diferenças na proporção das diferentes fases de maturação entre grupos de reprodutores foram analisadas, pelo teste do Qui-quadrado de associação ($\chi^2_{(\text{graus de liberdade})} = \text{valor do teste}; p\text{-value}$) aplicado às distribuições de fêmeas e machos em separado. Para a análise dos dados de assentamento dos juvenis de *P. lividus*, devido à natureza de contagem dos dados e à presença de sobredispersão no modelo de *Poisson*, foi ajustado um modelo de regressão binomial negativa com função de ligação log (*Pearson* $\chi^2/\text{df} = \text{valor do teste}$), verificada a verossimilhança por teste de efeitos do modelo tipo III ($\chi^2=B; p\text{-value}$), analisando as estimativas dos parâmetros ($\exp(B); p\text{-value}$). Como grupo de referência foi selecionado o grupo: Quarta Semana * Tanque * *Outdoor*.

Em relação ao estudo do crescimento dos juvenis de *P. lividus*, por se tratar de uma variável contínua, positiva e assimétrica, utilizou-se um modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log (Desvio/graus de liberdade = valor do teste), de forma a garantir um ajuste adequado aos pressupostos dos dados. Foi verificada também a verossimilhança por teste de efeitos do modelo tipo III ($\chi^2=B; p\text{-value}$), analisando as estimativas dos parâmetros ($\exp(B); p\text{-value}$) e as médias marginais estimadas [média \pm desvio-padrão (mm)]. Este modelo cria, de forma automática, uma referência para cada variável categórica. Por essa razão, os dados são interpretados consoante o efeito diferencial de cada tipo de condicionamento, dentro de cada semana analisada.

Para avaliar o sucesso de marcação de calceína de cada concentração foi utilizado um Qui-Quadrado de independência (χ^2 (graus de liberdade) = valor do teste; *p-value*).

3 Resultados:

3.1 Caracterização dos stocks de reprodutores:

No ensaio I, nove ouriços-do-mar com um peso médio de $33,73 \pm 6,78$ g e um diâmetro médio de $4,20 \pm 0,24$ cm, apresentaram um IGS médio de $9 \pm 4\%$ (Tabela III). No ensaio II, os doze ouriços-do-mar avaliados apresentaram um peso médio de $31,53 \pm 4,79$ g e um diâmetro médio de $4,47 \pm 0,38$ cm, com um IGS médio de $10 \pm 3\%$ (Tabela III).

A comparação estatística entre os dois grupos de *P. lividus* revelou que não houve diferenças significativas entre o peso ($t_{(19)} = 0,874$; $P = 0,393$), o diâmetro ($t_{(19)} = -1,837$; $P = 0,082$) e o IGS ($t_{(19)} = -0,624$; $p = 0,540$).

Relativamente ao estágio de desenvolvimento da gónada, tanto fêmeas como machos do ensaio I encontravam-se, na sua maioria, no estágio III (prematuro). No ensaio II, as fêmeas de *P. lividus* estavam predominantemente na fase V (desova) e os machos na fase IV (maturos) (Tabela III e Anexo-Figura 14). O teste de associação de χ^2 revelou diferenças estatisticamente significativas entre as fêmeas dos dois grupos ($\chi^2_{(2)} = 8,000$; $p = 0,029$), indicando variações no estágio de maturação das gónadas ao longo do tempo. No caso dos machos de *P. lividus*, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos ($\chi^2_{(3)} = 3,611$; $p = 0,543$), indicando que apesar do tempo decorrente entre as duas amostragens, os machos mantinham o nível de maturação sexual. A observação da Figura 5 sugere que, no ensaio II, as fêmeas encontravam-se em fases de maturação mais avançadas em comparação com o ensaio I.

Tabela III: Dados biométricos [Peso Individual (g); Diâmetro (cm);] e caracterização histológica das gónadas [IGS (%); Fase de maturação] dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* usados como reprodutores no ensaio larvar I e no ensaio larvar II. O símbolo ♀ representa o sexo feminino e o símbolo ♂ representa o sexo masculino. A descrição do estágio de maturação encontra-se descrita na Tabela II.

	Nº	Peso Individual (g)	Diâmetro (cm)	IGS	Sexo	Estádio de maturação
Ensaio I	1	43,85	4,4	7%	♀	III
	2	31,87	4,1	11%	♀	III
	3	30,02	4,1	6%	♀	IV
	4	37,01	4,4	5%	♀	IV
	5	31,14	4	6%	♂	II
	6	35,3	4,1	11%	♂	III
	7	29,53	4,3	10%	♂	III
	8	22,25	3,8	13%	♂	III
	9	42,62	4,6	16%	♂	III
Ensaio II	1	35,75	4,9	10%	♀	V
	2	26,79	4,58	6%	♀	V
	3	29,98	4,6	10%	♀	V
	4	31,77	4,1	13%	♀	V
	5	41,58	5,13	11%	♂	III
	6	35,03	4,56	14%	♂	III
	7	32,31	4,8	14%	♂	III
	8	24,67	4,08	3%	♂	III
	9	27,4	4	12%	♂	III
	10	28,15	4,53	11%	♂	IV
	11	35,5	3,9	10%	♂	V
	12	29,43	4,44	9%	♂	V

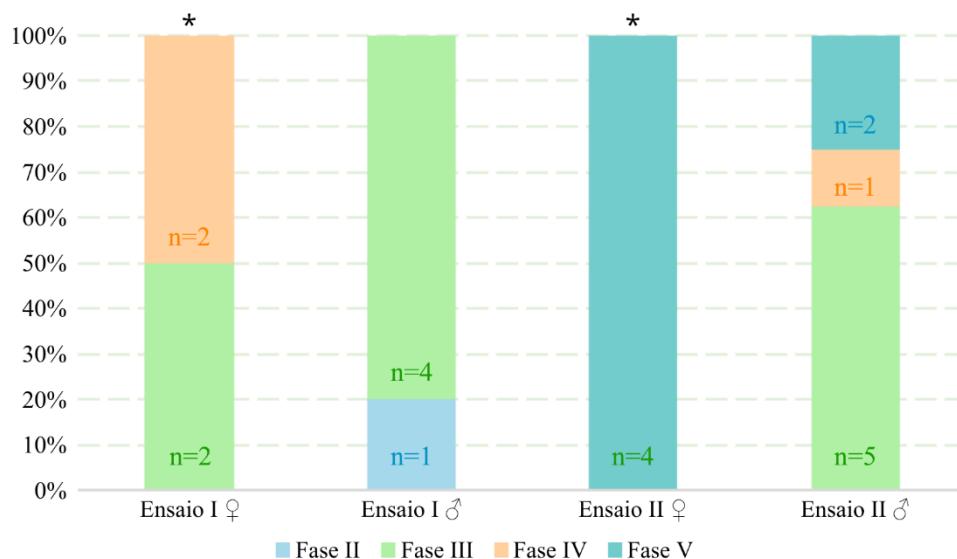


Figura 5: Distribuição relativa dos estádios de maturação sexual dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* usados como reprodutores nos ensaios de desenvolvimento larvar I e II [Fêmeas (♀); Machos (♂)]. O símbolo * representa a diferença estatisticamente significativa entre ensaios para as fêmeas ($\chi^2=8,000$; $p=0,029$).

3.2 Desenvolvimento larvar:

Após a fertilização, foi acompanhada a evolução do desenvolvimento larvar de *P. lividus*, assegurando uma alimentação adequada conforme cada fase, com o objetivo final de assentamento larvar.

Nos dois ensaios, as larvas de *P. lividus* desenvolveram-se de acordo com o esperado, levando entre 17 e 23 dias desde o início de desenvolvimento do embrião até ao surgimento do rudimento, a última fase de desenvolvimento larvar imediatamente antes da metamorfose. A Figura 6 apresenta a distribuição percentual das diferentes fases larvares ao longo do período de observação para ambos os ensaios. A Tabela IV resume o número total de larvas presentes nos tanques em cada fase do desenvolvimento larvar, assim como o correspondente dia, após fertilização, quando as larvas atingiram cada uma das fases de desenvolvimento, nos ensaios I e II.

O número total de larvas diferiu entre ensaios, uma vez que o ensaio I assegurou os quatro tanques de cultivo (densidade de 4 larvas/mL), enquanto o ensaio II apenas conseguiu assegurar três tanques, com a mesma densidade (4 larvas/mL). Independentemente do número total de larvas ter diferido, os valores médios da densidade entre tanques mantiveram-se semelhantes ao longo do tempo. Contudo, no final do ensaio II, apenas um

dos tanques apresentava larvas de *P. lividus*, e a quantidade observada não foi suficiente para abranger todos os tratamentos inicialmente previstos e desenvolvidos.

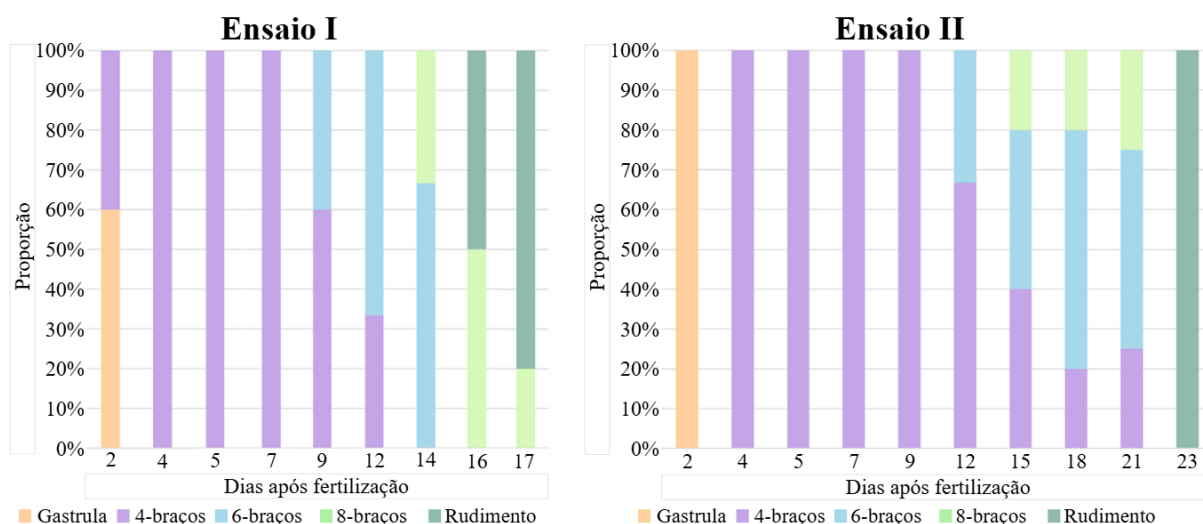


Figura 6: Proporção das diferentes fases larvares ao longo dos dias (após fertilização) de cultivo para o ensaio I e ensaio II.

A análise temporal evidencia ainda que o desenvolvimento larvar do ensaio II apresentou atrasos prolongados comparativamente ao desenvolvimento larvar do ensaio I. Neste, observou-se a sobreposição de apenas duas fases: quando a fase de 4-braços terminou (12º dia), a fase de 6-braços já tinha iniciado (9º dia). Seguidamente, a fase de 8-braços teve início no 14º dia, altura em que a fase 4-braços já não era observada. Cerca de 80% das larvas apresentavam rudimento ao 17º dia, com presença de larvas em fase de competência. Em contrapartida, o ensaio II apresentou sobreposição das três fases larvares em simultâneo, uma vez que, ao 15º, 18º e 21º dia, eram observadas larvas nas fases de 4-braços, 6-braços e 8-braços.

Tabela IV: Número total de larvas de *Paracentrotus lividus* no ensaio I e II, com diferenciação das fases larvares e identificação do dia inicial e final em que cada fase larvar foi observada. Os valores do ensaio I são relativamente aos quatro tanques de cultivo. Os valores do ensaio II são relativamente aos três tanques de cultivo.

Estádio de desenvolvimento	Ensaio I		Ensaio II	
	Nº de larvas	Dias após fertilização	Nº de larvas	Dias após fertilização
Gastrula	970 000	1	758 400	1
Início 4-braços	384 000	2	432 000	2
Fim 4-braços	9 600	12	7 200	21
Início 6-braços	192 000	8	7 200	12
Fim 6-braços	9 600	15	14 400	21
Início 8-braços	9 600	14	7 200	15
Fim 8-braços	19 200	16	7 200	21
Rudimento	19 200	16	1 383	23

3.3 Assentamento dos juvenis:

Após o desenvolvimento do rudimento, as larvas de *P. lividus* iniciaram a metamorfose, cuja fase crítica corresponde ao assentamento larvar. Nesta etapa, procedeu-se à redistribuição das larvas pelos diferentes tratamentos e respetivas placas de assentamento. Durante as primeiras quatro semanas, além do fator tipo de acondicionamento (microalga, *indoor*, *outdoor*), os juvenis foram testados em dois locais distintos de cultura: aquários e tanques.

Através do modelo de regressão binomial negativa com função de ligação log (*Pearson* $\chi^2/df = 0,4$), os testes de razão de verossimilhança relataram efeitos significativos dos fatores principais: Semana ($\chi^2 = 27,670$; $p = 0,001$); Local ($\chi^2 = 15,488$; $p = 0,001$); e Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 11,562$; $p = 0,003$). O mesmo aconteceu nas interações: Semana * Local ($\chi^2 = 8,187$; $p = 0,017$); Local * Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 6,284$; $p = 0,043$); Semana * Local * Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 80,479$; $p = 0,001$). Apenas a interação Semana * Tipo de acondicionamento não apresentou diferenças estatísticas significativas.

A análise de fatores principais mostrou que, ao longo das semanas, o número médio de ouriços-do-mar observados nas placas diminuiu, uma vez que a segunda semana apresentou 5,26 vezes mais indivíduos observados do que a quarta semana. Em relação ao local, as placas colocadas nos aquários registaram cerca de 64% menos juvenis de ouriços-do-mar do que as placas colocadas nos tanques ($\exp(B) = 0,36$; $p = 0,001$). Quanto ao tipo de

acondicionamento, as placas com acondicionamento *indoor* e com microalgas, foram as que se observou significativamente menor número de indivíduos nas placas de assentamento (36 %), quando comparado com o número de *P. lividus* observados nas placas com acondicionamento *outdoor* (54 %).

Na interação Semana * Local, apenas na quarta semana não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o número observado de juvenis nos aquários e nos tanques. Em contraste, as condições: segunda semana*aquário ($\exp(B) = 4,10$; $p = 0,018$); segunda semana*tanque ($\exp(B) = 14,72$; $p = 0,001$); terceira semana*aquário ($\exp(B) = 4,03$; $p = 0,032$); e terceira semana*tanque ($\exp(B) = 3,26$; $p = 0,039$) apresentaram diferenças significativas em relação à condição de referência (quarta semana*tanque). Estes dados indicam uma diminuição acentuada do número de juvenis nas placas de assentamento ao longo do tempo, em ambos os locais. Destaca-se, em particular, a variação observada entre a segunda para a quarta semana nos tanques com redução do número de juvenis em 93 %.

A interação Local* Tipo de acondicionamento, apresentou diferenças no tratamento em aquários, onde os acondicionamentos *indoor* e microalgas apresentaram valores médios assentamento de 29% e 24%, respectivamente, ao registado no tipo de acondicionamento *outdoor*. Nos tanques não foram observadas diferenças significativas entre tipos de acondicionamento.

Por fim a interação de três fatores (Semana * Local * Tipo de acondicionamento) (Figura 7), mostrou diferenças significativas principalmente na segunda semana em comparação com a referência (quarta semana*tanque* *outdoor*) (Anexo – Tabela VI). A única exceção foi a condição segunda semana*aquário**indoor* ($\exp(B) = 0,43$; $p = 0,258$), que não diferiu da referência. As restantes condições da segunda semana apresentaram um número observado dos juvenis de ouriços-do-mar, 4,16 a 7,01 vezes superior à referência (ex.: segunda semana*aquário*microalga; segunda semana*tanque**outdoor*). Em contrapartida, todas as combinações da quarta semana apresentaram menor número de indivíduos de *P. lividus* nas placas de assentamento, do que a referência (quarta semana*tanque* *outdoor*), variando entre reduções médias de 70% (quarta semana*aquário*microalgas) e 24% (quarta semana*aquário**indoor*).

De forma geral, os resultados indicam um registo superior do número de juvenis assentados nos tanques em placas com acondicionamento *outdoor*. Por outro lado, foi observado menor

número de ouriços-do-mar em placas acondicionadas com microalgas e *indoor*, particularmente a partir da 3ª semana após assentamento.

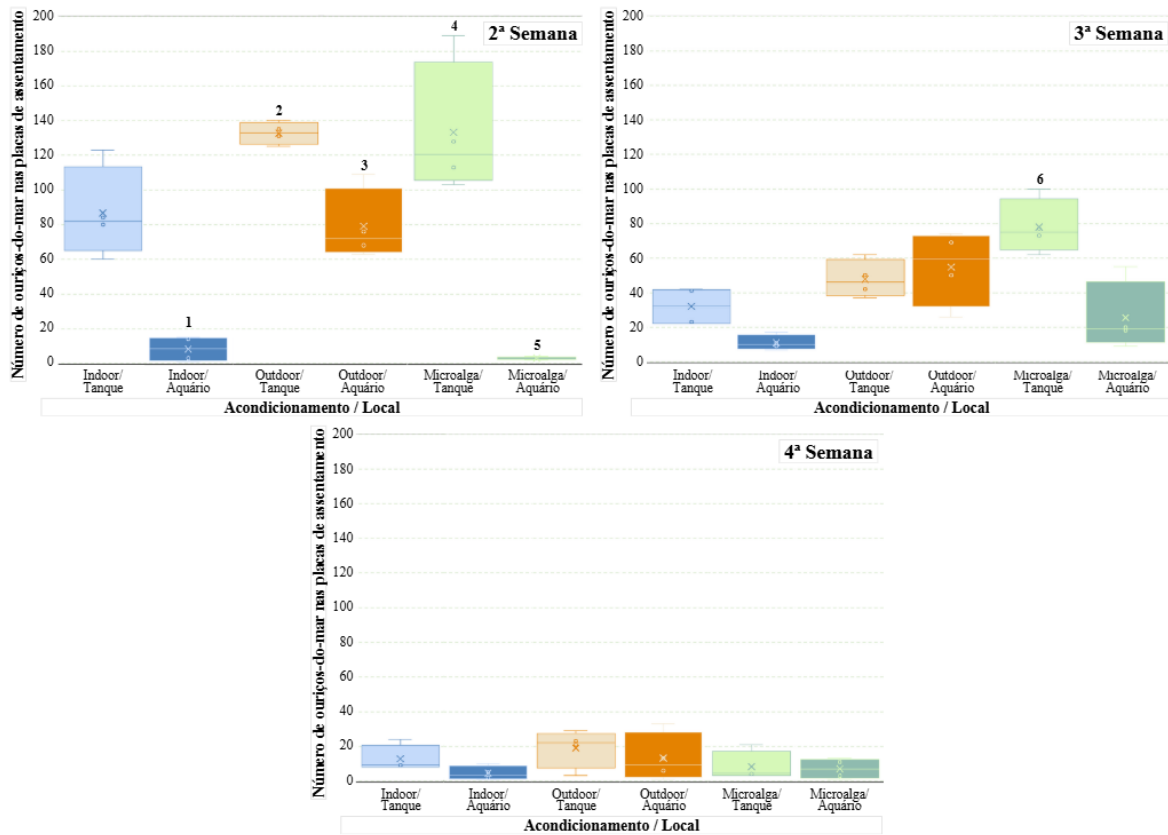


Figura 7: Distribuição temporal do número de juvenis de *Paracentrotus lividus* observados na superfície das placas de assentamento sob diferentes tipos de acondicionamento, após o ensaio de desenvolvimento larvar. Números diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de referência (4ª semana * Outdoor * Tanque). Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela VI do Anexo.

Após a quarta semana, o fator local deixou de ser considerado, uma vez que todas as placas foram transferidas para aquários. Desta forma foi realizada uma análise estatística considerando apenas os fatores do tipo de acondicionamento das placas de assentamento ao longo das semanas (segunda; terceira; quarta; sexta; sétima; e oitava). O modelo de regressão binomial negativa com função de ligação log (*Pearson* $\chi^2/df = 0,390$) mostrou efeitos estatísticos significativos dos fatores principais, Semana ($\chi^2 = 90,67$; $p = 0,001$) e Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 18,07$; $p = 0,001$), bem como da interação Semana * Biofilme ($\chi^2 = 19,63$; $p = 0,033$).

Como analisado anteriormente ao longo das semanas, a média de número de ouriços-do-mar na superfície das placas de assentamento, diminuiu progressivamente. Na segunda semana, foram observados 10,72 vezes mais ouriços-do-mar nas placas de assentamento do que na

oitava semana. Contudo, observou-se um ligeiro aumento da quarta semana ($\exp(B) = 1,63$; $p = 0,346$) para a sexta semana ($\exp(B) = 2,15$; $p = 0,139$), explicado pelo facto de alguns juvenis inicialmente fixados nas paredes dos tanques, terem sido transferidos para os aquários, promovendo transferência dos ouriço-do-mar para as placas de assentamento.

Em relação ao fator tipo de acondicionamento (Figura 8), as placas acondicionadas com microalgas ($\exp(B) = 0,29$; $p = 0,026$) apresentou um número de indivíduos nas placas significativamente menor em comparação com as placas acondicionadas em *outdoor*. Já as placas do acondicionamento *indoor* ($\exp(B) = 1,05$; $p = 0,925$) não diferiu das placas do acondicionamento *outdoor*, registando apenas um valor 5% superior.

A interação Semana * Tipo de acondicionamento (Figura 8) não revelou diferenças estatisticamente significativas entre as combinações analisadas. Apenas a condição terceira semana* acondicionamento microalgas mostrou uma tendência de diferença ($\exp(B) = 3,47$; $p = 0,097$), sugerindo um menor decréscimo do número relativo de ouriços-do-mar nas placas, em comparação com os restantes acondicionamentos, ainda que sem significância estatística.

No geral, o acondicionamento *outdoor* destacou-se de forma consistente como aquele que alojava mais juvenis ao longo do tempo, embora as diferenças tenham variado entre semanas e tratamentos, sem interações marcantes.

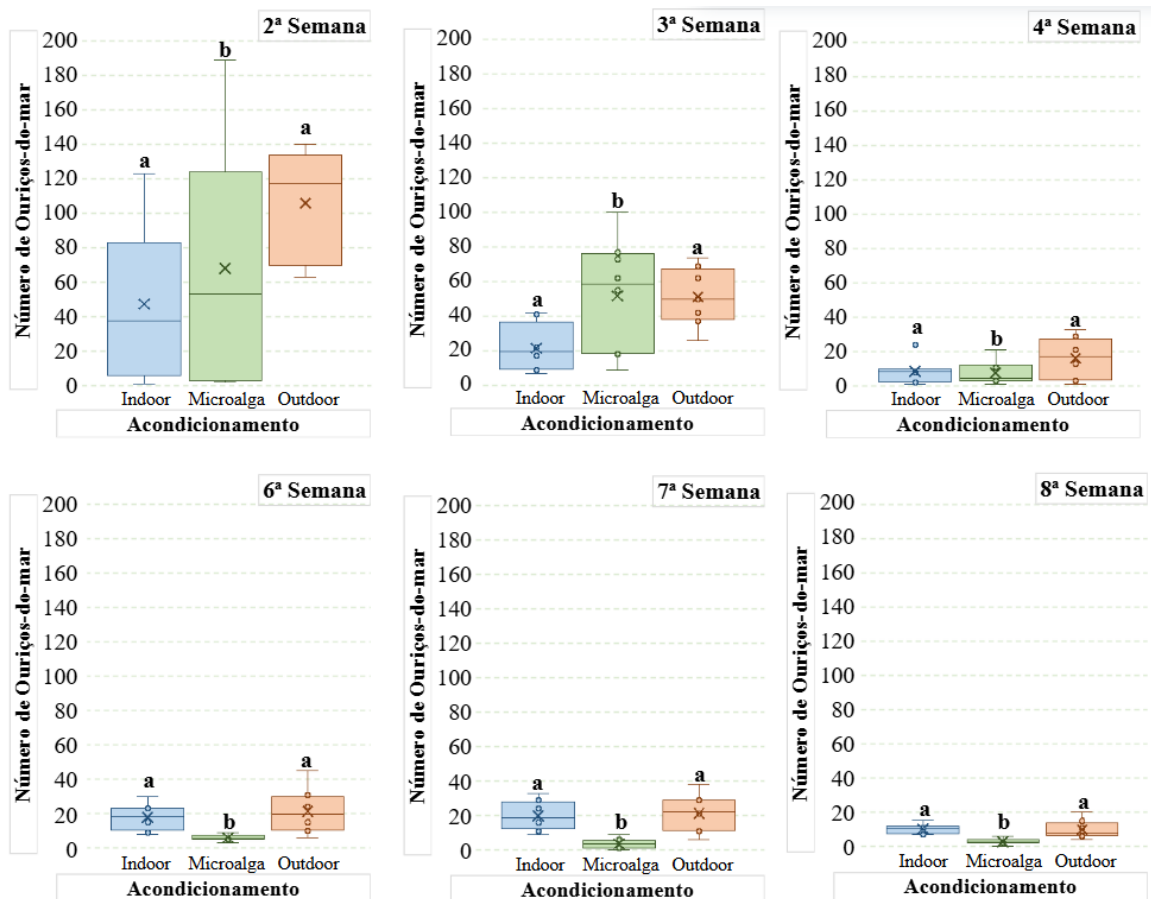


Figura 8: Distribuição do número de juvenis de *Paracentrotus lividus* observados na superfície das placas de assentamento sob diferentes tipos de acondicionamentos. As letras “a” e “b” indicam diferenças estatisticamente significativas para o fator Tipo de acondicionamento ($p < 0,05$) em relação ao acondicionamento *outdoor*. Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela VII do Anexo.

3.4 Crescimento dos juvenis:

Para além do número de ouriços-do-mar observados nas placas de assentamento, foi ainda avaliado o crescimento destes, através da medição do seu diâmetro ao longo das oito semanas seguintes ao assentamento.

Segundo o modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log (Desvio/grau de liberdade = 0,018), os testes de razão de verossimilhança revelaram efeitos significativos dos fatores semana ($\chi^2 = 139,535$; $p = 0,001$), local ($\chi^2 = 13,973$; $p = 0,001$) e Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 10,775$; $p = 0,005$) no diâmetro dos juvenis assentados nas diferentes placas. A interação dos fatores Semana * Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 35,985$; $p = 0,001$) também teve um efeito significativo nesta medida. Em contrapartida, as interações entre os fatores Semana * Local ($\chi^2 = 2,803$; $p = 0,246$); Local * Tipo de acondicionamento

($\chi^2 = 2,022$; $p = 0,364$); Semana * Local * Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 7,370$; $p = 0,118$) não afetaram significativamente o diâmetro dos juvenis medidos.

A análise dos parâmetros estimados demonstrou que, ao longo das semanas, existiu um aumento do diâmetro dos juvenis de 57% em relação à segunda semana. Em termos de local de manutenção, foi registrado um aumento do diâmetro de 7% dos ouriços-do-mar mantidos nos aquários em relação àqueles mantidos nos tanques. Quanto ao tipo de acondicionamento, o *indoor* promoveu um aumento do diâmetro dos ouriços-do-mar superior ($\exp(B) = 1,44$; $p = 0,001$), enquanto o acondicionamento de microalgas promoveu um aumento médio do diâmetro dos juvenis, ligeiramente inferior ($\exp(B) = 0,94$; $p = 0,039$), quando comparados com o acondicionamento *outdoor*.

As médias marginais estimadas confirmam este padrão: o diâmetro aumentou progressivamente da segunda semana ($0,57 \pm 0,01$ mm) para a quarta semana ($1,10 \pm 0,03$ mm). Em média, o diâmetro dos juvenis nos aquários ($0,79 \pm 0,01$ mm) é superior, comparativamente ao diâmetro de juvenis nos tanques ($0,70 \pm 0,01$ mm). Relativamente ao tipo de acondicionamento, o *indoor* promoveu um maior aumento do diâmetro ($0,79 \pm 0,02$ mm) em comparação com o acondicionamento de microalgas ($0,73 \pm 0,02$ mm) e *outdoor* ($0,71 \pm 0,02$ mm).

A interação Semana * Tipo de acondicionamento revelou que as diferenças se acentuaram ao longo do tempo (Figura 9A). Na segunda semana, o aumento do diâmetro foi semelhante entre os tipos de acondicionamento [$0,54 \pm 0,02$ mm (*indoor*) - $0,60 \pm 0,02$ mm (microalga)]. Contudo, na quarta semana, a diferença tornou-se evidente, com o acondicionamento *indoor* a promover maior crescimento ($1,42 \pm 0,06$ mm) em comparação com o acondicionamento de microalgas ($0,96 \pm 0,04$ mm) e *outdoor* ($0,98 \pm 0,04$ mm).

Durante as primeiras quatro semanas, o diâmetro dos juvenis de *P. lividus* aumentou significativamente ao do tempo (Figura 9B), sendo superior nos aquários em relação aos tanques. Entre os acondicionamentos testados, o *indoor* destacou-se por promover maior crescimento.

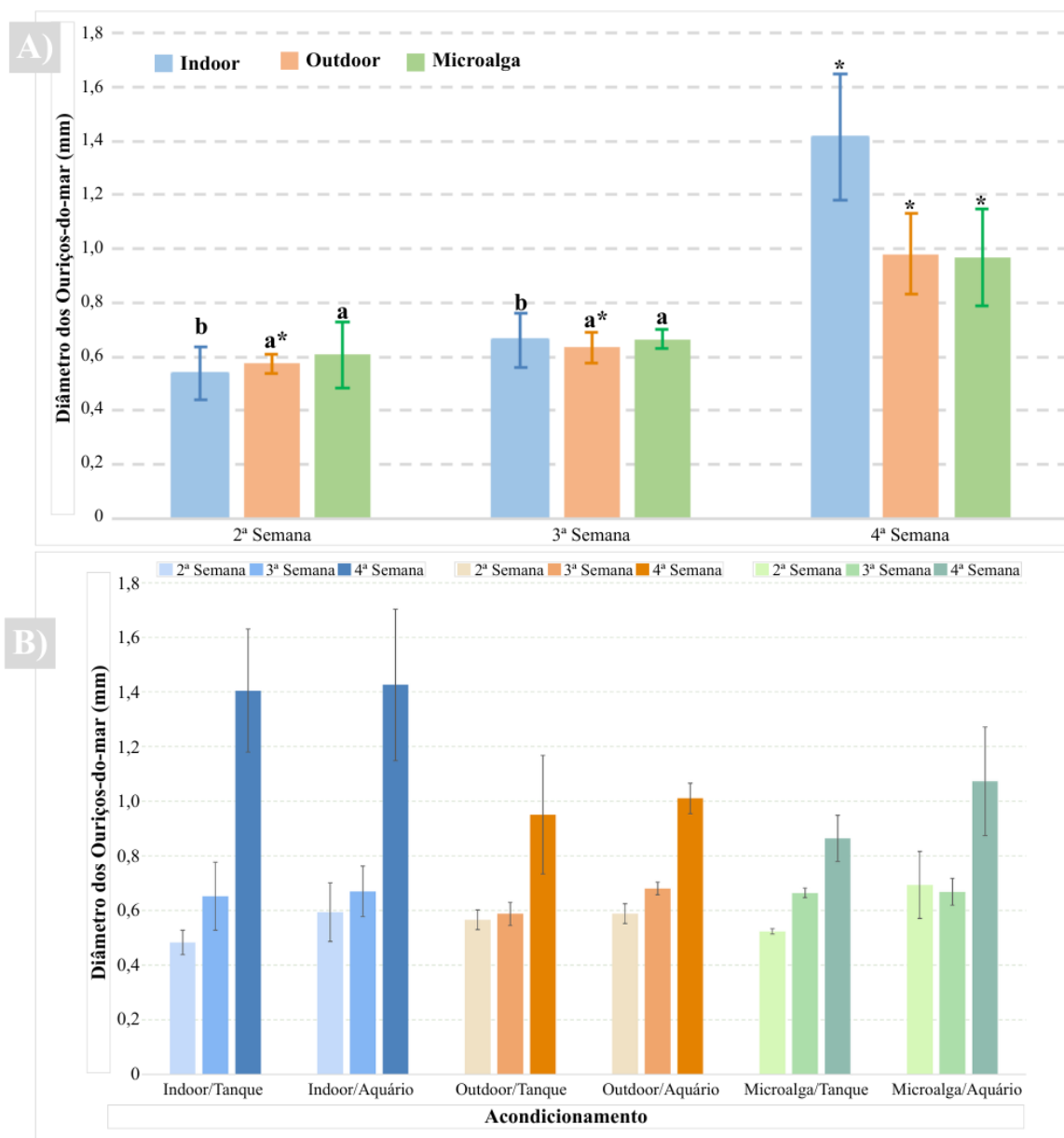


Figura 9: **A)** Diâmetro médio \pm desvio padrão dos juvenis de *Paracentrotus lividus* (mm), em função da interação Tempo/Tipo de acondicionamento. O símbolo * indica o grupo selecionado como referência no modelo estatístico. As letras **a** e **b** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de referência ($p < 0,05$). Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela VIII do Anexo. **B)** Diâmetro médio \pm desvio padrão dos juvenis ao longo da 2ª, 3ª e 4ª semanas, em diferentes tipos de acondicionamentos do ensaio I.

A partir da quarta semana o fator local deixou de ser considerado e foi analisado apenas o fator biofilme ao longo do tempo. O modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log apresentou Desvio/graus de liberdade = 0,04, evidenciando bom ajuste do modelo. Os testes de razão de verossimilhança revelaram efeitos estatísticos significativos para os fatores, Semana ($\chi^2 = 1262,372$; $p = 0,001$) e Tipo de acondicionamento

($\chi^2 = 9,505$; $p = 0,009$), bem como para a interação Semana * Tipo de acondicionamento ($\chi^2 = 27,449$; $p = 0,002$).

Como relatado anteriormente, ao longo das semanas verificou-se um aumento progressivo do diâmetro dos juvenis, não apresentando diferenças estatísticas desde a sexta semana até à oitava semana. As médias marginais estimadas confirmam esta tendência: na segunda semana ($\exp(B) = 0,29$; $p = 0,001$), os juvenis apresentaram um aumento médio do diâmetro de $0,57 \pm 0,02$ mm, atingindo $2,25 \pm 0,09$ mm na oitava semana.

Em relação ao tipo de acondicionamento, os valores médios do diâmetro dos juvenis são idênticos. Contudo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa no acondicionamento de microalgas ($\exp(B) = 1,27$; $p = 0,013$), que atingiu um crescimento médio de $1,28 \pm 0,03$ mm, cerca de 27% superior ao acondicionamento *outdoor* ($1,16 \pm 0,03$ mm).

A interação Semana * Tipo de acondicionamento descreve a dinâmica do crescimento dos juvenis de *P. lividus* entre a segunda e a oitava semana. Embora as médias indiquem diâmetros superiores no acondicionamento *indoor* até à quarta semana ($1,42 \pm 0,09$ mm) e uma tendência de maior crescimento dos juvenis no acondicionamento de microalgas nas semanas finais ($1,96 \pm 0,13$ mm a $2,54 \pm 0,18$ mm), a única diferença estatisticamente significativa (Figura 10) encontrada foi na quarta semana * acondicionamento *indoor* ($\exp(B) = 1,30$; $p = 0,046$), em que os juvenis apresentaram diâmetro superior em comparação ao acondicionamento *outdoor* (Figura 10).

Os resultados demonstraram que o diâmetro dos juvenis de *P. lividus* aumentou de forma consistente ao longo do tempo, estabilizando após a sexta semana. Entre os diferentes tipos de acondicionamento, apenas os juvenis presentes nas placas acondicionadas de microalgas apresentaram diâmetro significativamente superiores aos avaliados no acondicionamento *outdoor*, enquanto o acondicionamento *indoor*, destacou-se apenas na quarta semana.

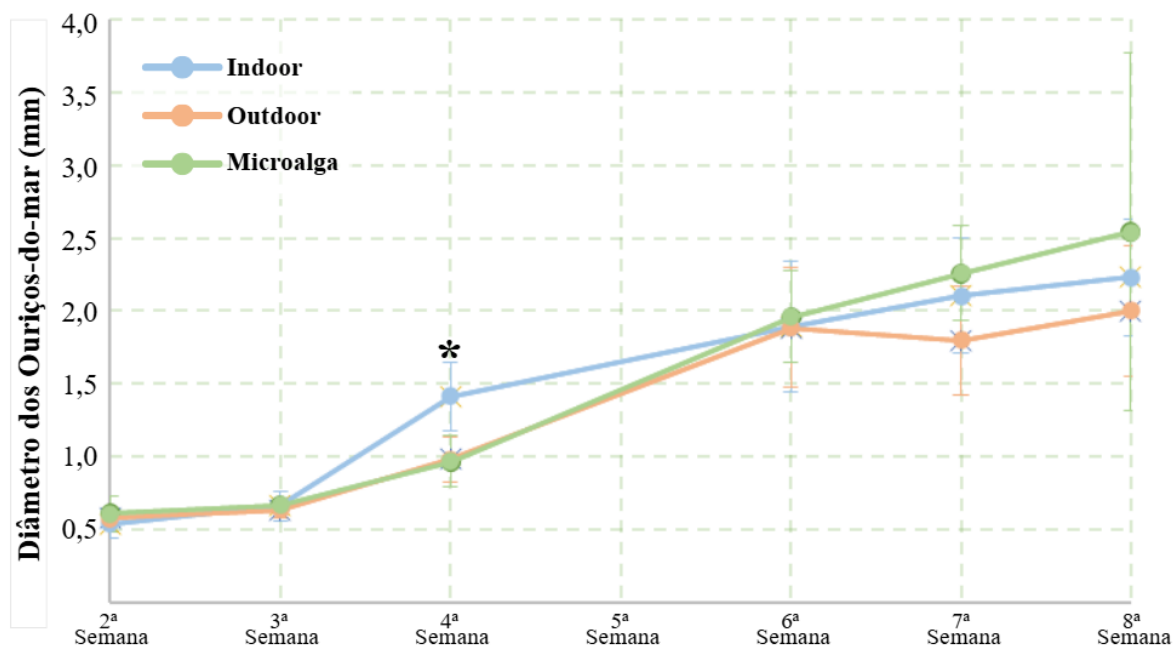


Figura 10: Diâmetro médio \pm desvio padrão dos ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* ao longo do tempo do ensaio I (2ª-8ª semana), observados nas superfícies das placas de assentamento com diferentes tipos de acondicionamento. O símbolo * representa a diferença estatisticamente significativa descrita na combinação de fatores no biofilme *indoor* na quarta semana. Resultados dos testes estatísticos detalhados na Tabela IX do Anexo.

3.5 Marcação de juvenis com calceína:

Na primeira experiência, a marcação da calceína não foi denotada nos ouriços-do-mar que apresentavam ainda tamanhos inferiores a 1 mm. Já na segunda experiência, a gama de tamanhos de *P. lividus* foi superior (D: 2,518 – 7,242 mm).

A partir do teste de Qui-Quadrado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de calceína (100, 150 e 200 mg/L) da segunda experiência, relativamente à taxa de sucesso de marcação do *P. lividus*, em nenhum dos tempos avaliados: 0 horas ($\chi^2_{(2)} = 0,415$, $p = 0,812$), 1 dia ($\chi^2_{(2)} = 0,714$, $p = 0,700$) e 7 dias ($\chi^2_{(2)} = 0,714$, $p = 0,700$). Estes resultados indicam que, para cada tempo, o sucesso de marcação foi estatisticamente independente da concentração.

Apesar da ausência de diferenças estatísticas, tendo em conta a mortalidade observada na concentração de 200 mg/L, e intensidade de coloração registada ao sétimo dia, a concentração de 150 mg/L foi a mais eficiente (93%) para a marcação de ouriços-do-mar nesta gama de diâmetro ($3,991 \pm 1,222$ mm) com calceína. Destaca-se, ainda, a observação da Figura 11, na qual é visível a diminuição da intensidade da cor amarelada nos indivíduos ao longo do tempo em todos os tratamentos.

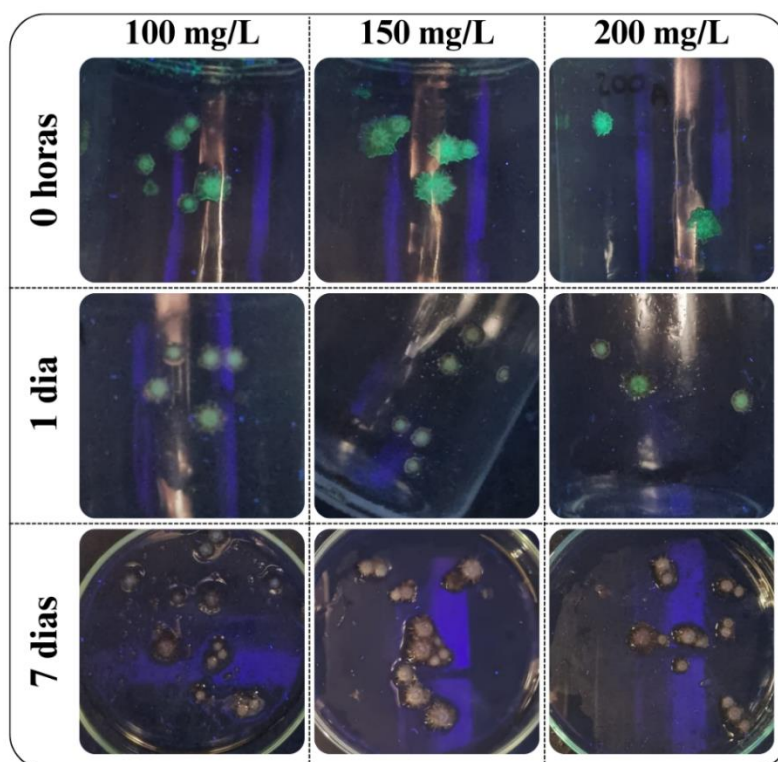


Figura 11: Intensidade da marcação de calceína em ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus*, ao longo do tempo das três concentrações testadas (100, 150 e 200 mg/L).

Através da ANOVA de dois fatores, avaliou-se ainda o efeito do tempo e da concentração da calceína no crescimento dos ouriços-do-mar. O fator tempo apresentou diferenças estatisticamente significativas ($F_{(1)} = 6,141$; $p = 0,014$), indicando variações de crescimento ao longo do ensaio, conforme apresentado na Tabela V. Por outro lado, o fator concentração de calceína não teve efeito significativo no crescimento dos indivíduos ($F_{(2)} = 0,255$; $p = 0,775$), tal como a interação entre o tempo e a concentração ($F_{(2)} = 190$; $p = 0,827$).

Tabela V: Dados biométricos e percentagem da taxa de sucesso de marcação com calcéina em ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus*, para as duas experiências. O símbolo * representa diferenças estatísticas no crescimento (m_f) em relação ao fator tempo.

Primeira Experiência			
Concentração de calcéina	10 mg/L	20 mg/L	50 mg/L
Tamanho médio (mm)	1,441 ± 0,528	0,945 ± 0,298	0,942 ± 0,229
Percentagem sucesso de marcação 0h AMC (%)	0%	0%	0%
Segunda Experiência			
Concentração de calcéina	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
Percentagem sucesso de marcação 0h AMC (%)	96%	98%	96%
Percentagem sucesso de marcação 1 dia AMC (%)	96%	93%	91%
Percentagem sucesso de marcação 7 dias AMC (%)	96%	93%	91%
Medição inicial (m_i) (mm)	3,940 ± 0,967	3,988 ± 1,209	3,775 ± 0,976
Medição final (m_f) (mm)	4,254 ± 1,009 *	4,241 ± 1,319 *	4,231 ± 1,195 *

4. Discussão:

4.1 Caracterização dos stocks de reprodutores:

A caracterização do stock de reprodutores utilizados em ensaios laboratoriais é fundamental para compreender a etapa do ciclo de vida em que os organismos se encontram. A análise dos parâmetros biométricos e histológicos, nomeadamente o IGS e as fases de maturação, permite avaliar o estado fisiológico dos indivíduos. Em espécies equinodermes, como *P.*

lividus, a maturação das gónadas apresenta variações sazonais bem documentadas (Byrne, 1990; Núñez-González *et al.*, 2025; Raposo *et al.*, 2023; Spirlet *et al.*, 1998).

No presente estudo, observaram-se diferenças significativas na fase de maturação sexual das fêmeas. No ensaio larvar I, as fêmeas recolhidas a 1 de abril, encontravam-se em fases de maturação prematura (fase III), com gónadas caracterizadas por apresentarem oócitos primários nos diferentes estágios de desenvolvimento (Byrne, 1990). Enquanto no ensaio larvar II, iniciado a 23 de junho, predominavam fêmeas em fases de maturação mais avançadas, nomeadamente em desova (estádio V), com as gónadas vagamente preenchidas com espaços deixados pelos oócitos (Byrne, 1990). Estas diferenças podem ser atribuídas ao período distinto em que os ensaios foram conduzidos e que, reflete a influência da sazonalidade sobre o ciclo reprodutivo. Em Peniche, área onde foram recolhidos os reprodutores usados para os ensaios larvares, Raposo *et al.*, (2023) analisaram o ciclo reprodutivo da espécie *P. lividus*. Neste estudo, foi observado que em abril/maio, a maioria dos indivíduos apresentavam IGS mais elevado ($12,87 \pm 6,43\%$) e encontravam-se na fase matura (estádio III). O ciclo de maturação das gónadas evoluiu para uma fase de desova (estádio V) em junho, altura em que o IGS atingiu o valor mínimo ($4,18 \pm 1,3\%$), seguido de julho numa fase VI, após desova. Contudo no ensaio larvar I (abril), os ouriços-do-mar usados na indução da desova apresentaram um IGS médio inferior ($9 \pm 4\%$) aos usados na indução da desova do ensaio larvar II [junho, ($10 \pm 3\%$)]. Estes valores indicam que, em ambos os períodos, os indivíduos encontravam-se em fases avançadas de maturação.

O sucesso dos ensaios de desenvolvimento larvar, que para este estudo se traduz na sobrevivência após a metamorfose dos juvenis de *P. lividus* também depende do estado de maturação dos reprodutores. Neste caso, a recolha tardia de reprodutores poderá ter comprometido a viabilidade do segundo ensaio realizado. É essencial integrar informações sobre o ciclo reprodutivo anual da espécie na planificação de ensaios de desenvolvimento larvar.

De acordo com Núñez-González *et al.*, (2025), o ciclo reprodutivo de *P. lividus* varia em função das estações e da localização geográfica. O estudo realizado na ilha Gran Canária (Espanha) revelou predominância da fase III no final do verão até ao início do outono, com valores máximos de IGS durante o verão. Outros trabalhos reportam diferentes períodos para o pico de maturação: no sul da Bretanha (França), ocorre do final da primavera ao início do verão (Spirlet *et al.*, 1998), padrão também registado no nordeste do Mediterrâneo (Lozano

et al., 1995); em Ballynahown, (Irlanda), estende-se do final da primavera ao final do verão (Byrne, 1990). No sul de Marrocos, o IGS diminui de março a agosto, refletindo amadurecimento e desova, e aumenta novamente no outono-inverno, atingindo valores máximos em janeiro/fevereiro (Ouchene *et al.*, 2021). Um padrão semelhante foi descrito para populações em Portugal (Machado, 2007; Machado *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2003).

O estudo de Loi *et al.*, (2017) realizado numa Área Marinha Protegida da Sardenha, reportou dois eventos de desova de *P. lividus* (em junho e março) num local sem pressão antropogénica. Em contraste, numa zona sujeita a maior pressão, os autores observaram apenas um evento reprodutivo. Nesta população, os organismos de tamanho comercial representavam 5% da população, enquanto a maioria correspondia a exemplares de menor dimensão, que necessitavam amadurecer mais rapidamente.

Starr *et al.*, (1993) e Lozano *et al.*, (1995) sugerem como hipótese que o início da floração do fitoplâncton funciona como fator desencadeante para a desova dos ouriços-do-mar. A fotossíntese promovida pela luz solar, em conjunto com a disponibilidade de nutrientes e temperaturas amenas da água, cria condições favoráveis ao desenvolvimento de picos de abundância de fitoplâncton. Ao mesmo tempo, estes fatores estimulam o desenvolvimento das gónadas dos ouriços-do-mar, levando a taxas de desova superiores durante o verão e menores durante o outono.

Estas observações reforçam a hipótese de que a desova é um evento imprevisível e altamente subordinado a fatores ambientais, necessitando de cuidados extremos, quando abordados em meios controlados. No ensaio II, a presença de fêmeas em estádios mais avançados de maturação levou a que, antes mesmo da estimulação artificial, os ouriços-do-mar *P. lividus* já tivessem iniciado a desova, possivelmente induzida pelo *stress* associado à manipulação. Além das diferenças intrínsecas ligadas ao estado de maturação, fatores extrínsecos relacionados com a qualidade da água também contribuíram para a ausência de resultados no ensaio II. A qualidade da água é um fator crítico para a manutenção de organismos em meios controlados. Durante o período experimental de junho, registaram-se temperaturas mais elevadas, que favorecem o crescimento e a reprodução do zooplâncton. A disponibilidade de nutrientes e o calor adicional estimulam ainda a floração de fitoplâncton (microalgas), que serve de alimento ao zooplâncton, potenciando o seu crescimento. Apesar da utilização de sistemas de filtração mecânica, física e química, os tanques onde presentes

as larvas dos ouriços-do-mar, apresentavam condições ótimas à proliferação destes organismos, tendo sido observados os mesmos nos tanques de cultivo (Figura 12 (a) (b)).

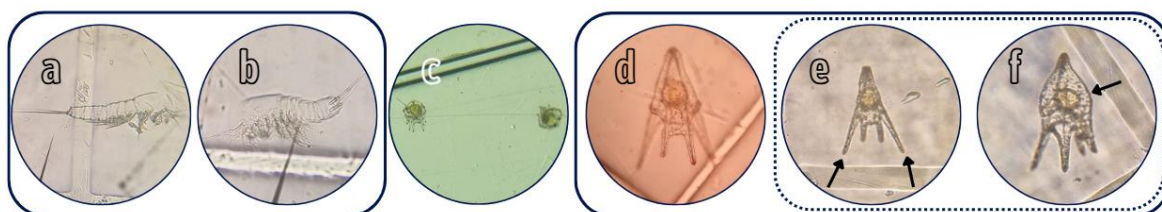


Figura 12: Representação ilustrativa: **a) e b)** Copepoda observado em amostras dos cultivos larvares do ensaio II; **c)** Larvas de menor dimensão observadas no ensaio II, quase em fase de competência; **d)** Larva *P. lividus* fase 4-braços sem anomalias; **e) e f)** Larva *P. lividus* com malformações identificadas pelas setas.

Em relação ao desenvolvimento larvar, este apresentou diferenças relevantes entre os dois ensaios realizados. No ensaio I as larvas atingiram a fase de competência aos 17 dias pós-fertilização, enquanto no ensaio II essa fase apenas foi alcançada aos 23 dias pós-fertilização de *P. lividus*. Além disso, a competência foi atingida de forma consistente nos quatro tanques do ensaio I, contrastando com o ensaio II, no qual apenas um tanque manteve larvas até à fase de rudimento. É importante salientar que as contagens larvares podem estar sujeitas a erros amostrais, refletindo a variabilidade associada à heterogeneidade das amostras. Apesar da realização de triplicados em cada cultivo, é possível que as larvas não estivessem distribuídas homogeneamente nos tanques, mesmo com circulação da água antes da recolha das amostras. Essa limitação metodológica deve ser considerada na interpretação dos resultados obtidos.

As larvas desenvolvem-se ao longo de um período designado pré-competente, durante o qual se alimentam e crescem até atingirem a competência para a metamorfose. Esta etapa é crucial, pois garante que as larvas estejam suficientemente desenvolvidas para sobreviver e prosperar no substrato bentónico após metamorfose (Hodin *et al.*, 2015). Caso contrário, ocorre elevada mortalidade, resultante da seletividade natural. Ainda segundo Hodin *et al.*, (2015), larvas provenientes do mesmo cultivo podem atingir a competência em momentos diferentes, mesmo sob condições e dietas semelhantes, o que sugere variação genética intrapopulacional como fator de influência no ritmo de desenvolvimento.

Comparando com estudo prévios, Gomes *et al.*, (2021), observaram que larvas alimentadas com dieta monoespecífica de *Rhodomonas*, atingiram a competência entre os 17 a 20 dias pós-fertilização, enquanto as larvas alimentadas com a diatomácea *Chaetoceros* alcançaram essa fase apenas aos 21 dias pós-fertilização. De forma semelhante, Castilla-Gavilán *et al.*,

(2018) relataram que dietas baseadas em *Rhodomonas* sp. conferem vantagens nutricionais, promovendo um desenvolvimento mais rápido, maior teor lipídico e menor investimento para a produção. Nesse estudo, as larvas atingiram a competência aos 15 dias pós-fertilização, associada ao cultivo em baixa densidade (1 larva/ml), o que reforça a influência deste fator no crescimento.

Diversos autores têm demonstrado que dietas mistas de microalgas tendem a proporcionar melhor desempenho larvar do que dietas unialgal (Castilla-Gavilán *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2016). No entanto, Ahmed *et al.*, (2016) observaram que embora *Chaetoceros calcitrans* apresente boas propriedades nutricionais, esta dieta pode afetar negativamente o desenvolvimento do rudimento em *P. lividus*, levando a malformações como alongamento do braço pós-oral. Este é um sinal típico de larvas submetidas a uma alimentação inadequada. Este estudo utilizou uma densidade larvar de 6 larvas/mL, o que pode também ter contribuído para ocorrência das anomalias.

Outro aspecto relevante observado no presente trabalho refere-se ao tamanho das larvas. Embora não tenham sido efetuadas medições morfométricas, a comparação visual permite indicar que as larvas do ensaio II apresentavam dimensões inferiores ao do ensaio I, nas mesmas fases equivalentes de desenvolvimento (Figura 12c). Além disso, verificaram-se malformações em várias larvas do ensaio II, reforçando a hipótese de condições subótimas de cultivo (Figura 12 (e) (f)). Segundo a classificação proposta por Gambardella *et al.*, (2021), as larvas observadas no ensaio II correspondem ao tipo 17, caracterizado por larvas com intestino e ânus edemados ou dilatados, apresentando aglomerados de células pigmentares no celoma. Esta anomalia compromete a capacidade de alimentação devido a movimentos ciliares lentos, assíncronos ou interrompido. A formação do esqueleto é essencial para a sobrevivência larvar e, conseqüentemente, para a continuidade das populações de ouriços-do-mar. Fatores de *stress* ambientais, como o aquecimento e a acidificação dos oceanos, podem promover o aparecimento de malformações larvares. No entanto, no ensaio II, as temperaturas foram mais controladas e amenas em comparação com o ensaio I, reduzindo a probabilidade desse efeito. Relativamente à acidificação, a conseqüente diminuição da saturação de carbonato de cálcio pode afetar o crescimento larvar e o desenvolvimento esquelético (Gambardella *et al.*, 2021). Contudo, no presente estudo, a água do mar utilizada apresentou valores de pH entre 8,1 e $8,5 \pm 0,01$, intervalo considerado adequado para a calcificação. De forma consistente, Comeau *et al.*, (2017), em observação de corais (*Acropora yongei*), e Hu *et al.*, (2025), com ouriços-do-mar (*Strongylocentrotus*

purpuratus), observaram que a calcificação é comprometida em valores de pH inferiores, sugerindo que pH 8 favorece o processo de calcificação. Ainda segundo Gambardella *et al.*, (2021), dos diversos fatores apontados para a ocorrência de anomalias espontâneas, apenas a qualidade reduzida dos gâmetas utilizados na fertilização, poderá justificar as anomalias observadas no presente ensaio, embora não se exclua outras possíveis explicações para o fenômeno.

Desta forma, a conjugação de fatores intrínsecos (maturação avançada e desenvolvimento larvar) e extrínsecos (qualidade da água) limitou a efetividade do ensaio larvar II.

4.2 Assentamento e diâmetro dos juvenis:

O assentamento constitui uma etapa determinante no ciclo de vida dos equinodermes, frequentemente associada a baixas taxas de sobrevivência em sistemas de aquacultura. Este processo é influenciado por múltiplos fatores que, em conjunto, podem criar condições ótimas para o sucesso reprodutivo (Plee & Suckling, 2024), como a presença de carbonato de cálcio, a proximidade de coespecíficos e o fornecimento de microalgas que funcionam como vetores químicos e biológicos do assentamento.

De forma geral, o número de indivíduos observados nas placas de assentamento diminuiu ao longo do decorrer do tempo, sendo menor nos aquários e superior nas placas revestidas com biofilme *outdoor*. Esta diminuição, comparativamente com o assentamento inicial contabilizado na segunda semana, pode ser explicado através de eventos de mortalidade, devido à associação da fase pré-metamórfica, pouco resistentes à contínua manipulação, e/ou através da deslocação, uma vez que eram visíveis juvenis nas paredes dos tanques/aquários e nas conchas de ostra. Na segunda semana, registou-se 5% indivíduos fixados nas placas, não incluindo os assentados nas paredes dos tanques e aquários. Com o decorrer do ensaio, esta taxa apresentou tendência decrescente.

O principal componente do exoesqueleto das ostras é o carbonato de cálcio (CaCO_3), o mesmo mineral que constitui as espículas do endoesqueleto larvar dos ouriços-do-mar. Uma das fases instáveis do processo de assentamento passa pela formação das espículas devido a uma fase amorfa deste composto que gradualmente transforma-se em calcite (Beniash *et al.*, 1997; Vidavsky *et al.*, 2014; Wilt, 2002). Nesta etapa, a principal fonte de iões de cálcio (Ca^{2+}) provém da água do mar através do processo de biomineralização. Assim, neste ensaio, as conchas de ostra juntamente com a carapaça triturada de ouriço-do-mar, colocadas no

fundo dos tanques e aquários, funcionaram como uma fonte lenta e contínua de carbonato de cálcio, libertando Ca^{2+} em contacto com água do mar e dióxido de carbono.

Além de fornecer cálcio, as conchas atuaram também como suporte biológico, uma vez que foram previamente mantidas com os reprodutores adultos, adquirindo um biofilme proveniente destes, composto por matéria orgânica, restos de alimentos e fezes. Deste modo, as conchas de ostra, a carapaça de ouriços-do-mar triturada e as placas de assentamento, que foram também previamente colocadas nos aquários onde estavam presentes os reprodutores adultos, poderão ter funcionado como sinal químico de coespecíficos. Dworjanyn & Pirozzi, (2008) demonstraram que *Tripneustes gratilla* reage à presença de organismos da mesma espécie, bem como à água previamente exposta aos mesmos. Em concordância, no estudo de Brundu *et al.*, (2016), verificaram o mesmo padrão em *Paracentrotus lividus*, independentemente do substrato utilizado. Assim, a presença de biofilmes formados a partir de coespecíficos pode atuar como um sinal de segurança ambiental, promovendo o assentamento (Plee & Suckling, 2024).

Para promover o assentamento larvar, no presente estudo foram ainda adicionado microalgas ao meio de cultura durante a fase de competência, atuando como indicadores biológicos. Esta abordagem baseia-se no estudo de Lago *et al.*, (2024), que destacou o papel fundamental das diatomáceas como promotoras do assentamento e do crescimento das larvas de ouriço-do-mar, devido à libertação de fatores químicos, nomeadamente compostos orgânicos solúveis, como açúcares e aminoácidos (Araújo *et al.*, 2020).

O sucesso do assentamento larvar depende essencialmente da identificação de um substrato adequado para a metamorfose (Privitera *et al.*, 2011). Um biofilme ideal, deve reunir três requisitos fundamentais: altas taxas de assentamento das larvas competentes; baixa mortalidade; e crescimento consistente dos juvenis pós-assentamento (Rial *et al.*, 2018). A ausência de diferenças estatisticamente significativas no número de indivíduos nas placas de assentamento entre tratamentos, ao longo das oito semanas de ensaio, pode refletir semelhança nas condições de alimentação e na qualidade geral dos biofilmes desenvolvidos. No entanto, de um ponto de vista subjetivo o acondicionamento das placas com um biofilme natural *outdoor* (Praia) foi o melhor desenvolvido neste ensaio, evidenciado pela presença de uma comunidade diversificada de microalgas e outras formas de vida bentónica, como descrito na secção 2.2. Essa maior complexidade biológica poderia contribuir para oferecer

um ambiente mais atrativo e nutritivo para o assentamento e desenvolvimento inicial dos juvenis.



Figura 13: Observação do assentamento de *Paracentrotus lividus* em placas de cerâmica: a) Placas de assentamento do acondicionamento *outdoor*, como representação da colonização natural de comunidade marinha; b) Placa de cerâmica, evidenciando um juvenil assentado no orifícios; c) Juvenil assentado no orifício da placa, demonstrando a camuflagem na observação das placas; d) Juvenis a alimentarem-se com laminaria desidratada; e) Vista dorsal de um juvenil, ilustrando o desenvolvimento pós-metamórfico e estrutura de espículas visíveis.

Com vista à aplicação em programas de repovoamento, as placas de cerâmica utilizadas neste estudo funcionam como microhabitats artificiais, fornecendo abrigo e proteção aos juvenis, com potencial para aumentar a sobrevivência após a libertação no meio natural. Este tipo de estrutura proporciona um período de aclimação ao novo ambiente, reduzindo a vulnerabilidade inicial à predação.

Em consonância, após a recolha e observação das placas do ensaio II (*outdoor*), durante o tempo que permaneceram na praia, revelaram uma elevada capacidade de colonização por diversos organismos marinhos (Figura 13a), incluindo estrelas-do-mar, amêijoas e mexilhões. Pequenos gastrópodes tenderam a instalar-se nos orifícios das placas, beneficiando simultaneamente da proteção física e da disponibilidade de alimento aderente. Essa diversidade evidencia o potencial ecológico das placas em suportar múltiplos nichos ecológicos e oferecer refúgio a organismos em fases iniciais de vida. Embora o ensaio larvar II não tenha sido concluído devido a constrangimentos experimentais, os resultados obtidos no ensaio larvar I sugerem que este tipo de substrato natural poderá proporcionar as condições mais favoráveis ao assentamento. As larvas de *P. lividus* iniciam o processo de metamorfose e instalam-se em resposta a estímulos químicos provenientes do biofilme marinho (Dworjanyyn & Pirozzi, 2008). Assim, a elevada taxa de assentamento observada no tratamento *outdoor* (Marina) pode estar associada à presença de coospecíficos e à maior diversidade de micro-organismos no biofilme, que emitem compostos químicos indutores da metamorfose. Em contraste, o acondicionamento *indoor*, embora desenvolvido com água proveniente do meio natural, foi sujeito a uma filtração prévia que eliminou a componente

zooplânctonica. A composição de biofilmes naturais é altamente variável ao longo do tempo e entre locais, dependendo de fatores sazonais e ambientais. O período experimental (janeiro a julho), coincidiu com o aumento da proliferação de algas na costa de Peniche, associado à sazonalidade do ciclo de vida das macroalgas. Tal como referido por Rial *et al.*, (2018), o sucesso da metamorfose, crescimento e sobrevivência dos juvenis pós-assentamento depende fortemente da composição e maturidade do biofilme. Uma vez que o biofilme não é igual durante o ano inteiro, assim, recomenda-se que futuros ensaios laboratoriais considerem a utilização de biofilmes recolhidos em diferentes épocas do ano, refletindo a variabilidade natural dos ecossistemas marinhos.

Em relação ao acondicionamento de microalga, a taxa de assentamento foi inferior aos restantes, possivelmente devido ao biofilme desenvolvido não apresentar a mesma consistência estrutural dos restantes tratamentos. Segundo Lago *et al.*, (2024), a *Skeletonema costatum* proporciona uma dieta rica em nutrientes, potenciando o crescimento e a sobrevivência dos juvenis, enquanto o género *Nitzschia* promove um maior assentamento larvar, devido à libertação de adenosina como sinal químico indutor da metamorfose (Rahim *et al.*, 2004). De forma consistente Plee & Suckling, (2024) e Rial *et al.*, (2018) identificaram *Nitzschia sp.* como uma das diatomáceas mais eficazes na promoção do assentamento, com taxas de sucesso entre 60% e 90%. A eficácia deste género deve-se à sua capacidade de produzir substâncias poliméricas extracelulares, formando um biofilme robusto e estável (Plee & Suckling, 2024). No entanto, o desenvolvimento de biofilmes à base de diatomáceas e outros organismos colonizadores requer geralmente períodos mais longos, de cerca de 5 a 6 semanas, para atingirem a maturidade necessária (Plee & Suckling, 2024). No presente estudo, embora o tempo de desenvolvimento tenha sido suficiente para a formação do biofilme, é possível que a adição periódica de novas culturas tivesse promovido um crescimento mais contínuo e homogéneo.

Adicionalmente, antes da utilização das placas para o ensaio de assentamento, foi necessário proceder à sua lavagem química. Apesar de ser uma etapa essencial para garantir a eliminação de potenciais competidores dos juvenis de ouriços-do-mar, é provável que tenha também removido parte do biofilme previamente estabelecido, reduzindo assim a sua qualidade e potencial de colonização larvar. Este efeito foi particularmente evidente nas placas acondicionadas com microalgas e *indoor*, conforme ilustrado na Figura 3, sugerindo que esta etapa deva ser reconsiderada para favorecer a obtenção de um biofilme de maior qualidade.

É relevante destacar, pela observação da Figura 8, que existiu um ligeiro aumento do número de indivíduos observados nas placas entre a quarta semana para a sexta semana. Este aumento, pode ser explicado pelo facto de alguns juvenis inicialmente fixados nas paredes dos tanques, terem sido transferidos para os aquários, o que promoveu um novo assentamento nas placas. Esta transferência foi necessária, uma vez que os tanques apresentam volumes consideravelmente superiores aos aquários, oferecendo maior área e dispersão, o que levou as larvas a fixarem-se predominantemente nas superfícies laterais, em vez das placas destinadas ao ensaio. Embora as placas tivessem sido concebidas para atrair as larvas através do biofilme presente na sua superfície, a sua suspensão na zona superficial dos tanques limitou a área efetiva de contacto e, conseqüentemente, o assentamento. Assim, o ensaio larvar II foi projetado para confirmar que sistemas de menor volume permitiriam uma monitorização mais eficaz do processo de assentamento e proporcionariam condições mais favoráveis, nomeadamente pela utilização de biofilmes já estabelecidos, como o proveniente da reprodução assexuada de *Ulva sp.*, que apresentam potencial para promover taxas de sucesso superiores.

Cumprе salientar que poderão ter ocorrido alguns erros de amostragem, predominantemente durante o processo de contagem dos juvenis assentados. As placas de cerâmica apresentavam uma coloração alaranjada, e, associada ao biofilme, originava uma tonalidade escura que dificultava a observação dos indivíduos. Considerando que os juvenis apresentavam dimensões reduzidas ($0,5 \pm 0,1$ mm) e coloração igualmente escura, a identificação visual tornava-se ainda mais complexa, sobretudo quando se encontravam ocultos nos orifícios das placas (Figura 13c). Por esta mesma razão, foi desenvolvido o ensaio com calceína, não só para fins de repovoamento, mas também como ferramenta auxiliar na contabilização da taxa de assentamento em estudos futuros.

Paralelamente, o acompanhamento do crescimento dos juvenis permitiu avaliar a viabilidade dos diferentes acondicionamentos. Observou-se um aumento gradual ao longo do tempo, com tamanhos médios que passaram de $0,57 \pm 0,01$ mm na segunda semana para $2,25 \pm 0,09$ mm na oitava semana (Figura 13e). Em termos de local, os indivíduos mantidos nos aquários apresentaram um diâmetro médio 7% superior aos mantidos nos tanques, podendo sugerir que menores volumes de água e maior controlo das condições ambientais podem favorecer o desenvolvimento inicial dos juvenis. Não foram encontrados estudos que comparem especificamente o crescimento de *P. lividus* em aquários (12 L) comparativamente com os tanques cilíndricos (48 L). Contudo, estudos de densidade podem suportar a principal

hipótese retirada destes dados. Segundo Suckling *et al.*, (2018) uma densidade larvar mais elevada, cria um menor espaço relativo por indivíduo e, subsequentemente, a aglomeração, a competição por espaço, alimento e outros recursos serão mais pronunciadas. Assim sendo, no presente estudo, ao compararmos o volume do tanque com a quantidade de alimento disponível, verificamos que, embora o número de placas seja igual em ambos os locais (n=4), a competição pelo alimento nos tanques é superior. Tal deve-se ao facto de estes apresentarem um maior volume total (48 L) e, consequentemente, um número total mais elevado de larvas de *P. lividus* (4 larvas/mL). Resumindo, a diferença observada entre aquários e tanques pode ser explicada pela diferença de quantidade alimentar consoante o volume total de cada cultivo. Seriam necessários ensaios controlados, dos diferentes fatores, de modo a isolar o efeito do volume de cultivo ou até mesmo o formato do meio de cultivo.

Relativamente ao efeito do tipo de acondicionamento nas placas, o tratamento *indoor* promoveu inicialmente um diâmetro dos juvenis superior, seguido do acondicionamento *outdoor* e, por último, o acondicionamento de microalgas até à quarta semana. Contudo, posteriormente o tratamento microalgas apresentou um tamanho médio superior, seguido do *indoor* e *outdoor*, sendo que apenas os ouriços-do-mar no tratamento microalgas eram significativamente maiores que os ouriços mantidos nas placas *outdoor*. Esta diferença estatística deve-se, em grande parte, ao menor número de indivíduos medidos nesse tratamento, resultando num grupo menos representativo. Por outro lado, o acondicionamento *outdoor* com maior número de indivíduos assentados, apresentou diâmetros médios menores devido à heterogeneidade no crescimento intra-coorte. O crescimento pós-metamórfico dos juvenis tende a ser assíncrono, devido ao efeito de dominância, em que indivíduos maiores limitam o desenvolvimento dos menores, criando um crescimento desigual intra-coorte (Thompson *et al.*, 2021). Após a metamorfose, os juvenis apresentam diâmetros de 200–400 µm (Thompson *et al.*, 2021). De acordo com Boudouresque & Verlaque, (2013) e Lawrence, (2007), *P. lividus* atinge aproximadamente 2 cm ao fim de dois anos, embora Mendes *et al.*, (2019), tenham registado que 35% dos indivíduos ultrapassaram 2 cm em apenas sete meses, evidenciando que fatores ambientais e nutricionais podem acelerar significativamente o crescimento.

É importante reconhecer que o ensaio I apresentou algumas limitações metodológicas, nomeadamente a ausência de um controlo negativo. Este ensaio teve como objetivo principal servir de teste preliminar para identificar a metodologia mais adequada e, posteriormente, otimizar as condições de assentamento nos diferentes biofilmes. Contudo, tratando-se de

organismos vivos, nem sempre a resposta às condições experimentais é previsível, o que contribuiu para falhas no ensaio seguinte.

4.3 Marcação de juvenis do calceína:

As experiências de marcação com calceína teve como objetivo otimizar a detecção de juvenis nas placas de assentamento e, futuramente, após repovoamento, possibilitar a sua monitorização. Esta abordagem representa um avanço relevante para a aplicação em placas de cerâmica, tal como relatado neste estudo, ao constituir uma ferramenta acessível e eficaz para identificar organismos em ensaios de campo. A marcação química é amplamente aplicada em estudos de crescimento, uma vez que o corante se liga aos iões de cálcio, incorporando-o no exoesqueleto calcificado durante a biomineralização (Carboni, 2013), permitindo monitorizar a dinâmica populacional. No contexto da aquacultura aplicada ao reforço de *stocks* naturais, o desenvolvimento de metodologias de marcação-recaptura fiáveis é essencial (Ray *et al.*, 2025; Thompson *et al.*, 2021), tornando necessária a avaliação dos possíveis efeitos destes métodos antes da sua aplicação em ambiente natural.

Os resultados obtidos evidenciaram insucesso na primeira experiência, realizada com organismos de menor classe de tamanho, enquanto a segunda experiência demonstrou resultados positivos em classes superiores. Abordando a segunda experiência, a fluorescência observada, independentemente da concentração, foi intensa e heterogénea, tal como Rodríguez *et al.*, (2016).

A comparação entre as duas experiências sugere que tanto o tamanho dos juvenis como as concentrações do corante podem influenciar a eficácia da marcação em *P. lividus*, sobretudo em indivíduos muito jovens, possivelmente devido a efeitos tóxicos. Na segunda experiência, a taxa de sucesso foi notória, com visibilidade da fluorescência, embora sem diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações testadas. Deve salientar-se que a avaliação da intensidade da fluorescência foi de natureza qualitativa (Figura 11), e que a marcação mostrou uma tendência para desaparecer ao longo do tempo.

Os resultados sugerem que a calceína é viável como marcador em ouriços-do-mar, embora fator intrínseco ao organismo como o tamanho, bem como variáveis associadas ao protocolo experimental, como a concentração do marcador de calceína e tempos de exposição, possam condicionar a sua eficácia. Porém, fatores extrínsecos também desempenham um papel relevante, como relatado em Purcell *et al.*, (2006). Neste estudo chegaram à conclusão de

que a superfície dorsal dos pepinos-do-mar marcados com calceína, após períodos de exposição solar, apresentava tonalidade mais ténues, em comparação com a superfície ventral. Levantaram a hipótese de que a exposição ao sol atenua a intensidade da marcação. No caso dos ouriços-do-mar, a calceína é absorvida pelas estruturas calcificadas, assegurando taxas de retenção elevada, dado que esta estrutura não está diretamente exposta ao sol. Contudo, as espículas, que também apresentam fluorescência, encontram-se sujeitas a este fator, podendo assim sofrer atenuação. No geral, a retenção de marcadores em organismos repovoados pode depender ainda da profundidade e da turbidez da água (Purcell *et al.*, 2006).

Outro resultado relevante foi a elevada mortalidade registada na primeira experiência, com juvenis de menor tamanho. Estes juvenis, para além de não apresentarem evidências de marcação, foram frequentemente registados exemplares em que apenas a carapaça permanecia intacta, indicando a degradação total dos tecidos internos. Este resultado aponta para uma possível toxicidade associada à calceína em indivíduos muito jovens. A escassez de estudos com ouriços-do-mar desta classe de tamanho dificulta comparações diretas, contudo Moran, (2000), num estudo com gastrópodes juvenis (*Nucella ostrina*) de 0.9 a 2.0 mm, expostos a 100 mg/L de calceína, observou baixa mortalidade e ausência de efeitos sobre o crescimento, sugerindo que a resposta pode ser intra-espécie.

Durante a segunda experiência, a mortalidade registada foi de apenas 2%, valor que indica um impacto reduzido do procedimento. Estas taxas enquadram-se na faixa relatada por Correia *et al.*, (2023), para *P. lividus* (1-4%), validando o impacto mínimo da metodologia. De forma semelhante, Santos *et al.*, (2022) reportaram ausência de mortalidade, enquanto Rodríguez *et al.*, (2016) observaram uma taxa de sobrevivência inferior (88%). Importa salientar que a mortalidade observada pode não ser exclusivamente atribuída aos banhos químicos, uma vez que os organismos em ambientes controlados são altamente manipulados, criando *stress* nos mesmos (Correia *et al.*, 2023). Consoante o protocolo seguido no presente ensaio, a rotina de trocas diárias do meio, embora essencial para a manutenção de parâmetros ambientais ótimos, pode contribuir na mortalidade.

A marcação com calceína foi aprovada pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (US-FDA) como um pedido de investigação de um novo medicamento veterinário, permitindo a manipulação e posterior venda para consumo, nos EUA (Purcell *et al.*, 2006). Em Portugal, contudo, segundo a informação de segurança

voluntárias disponibilizada no âmbito do regulamento (CE) n.º 1907/2006 (REACH), a utilização da calceína é desaconselhada para fins alimentares. Não obstante, a calceína apresenta um período de exposição relativamente curto, uma vez que a fluorescência fica fixa nas zonas calcificadas, por um período dependente da concentração e do organismo marcado, mas a substância ativa livre desaparece devido às lavagens consecutivas iniciais, descritas no protocolo elaborado.

Em estudos futuros, seria importante avaliar diferentes tempos de exposição à calceína. Como exemplo, Wilson *et al.*, (1987), reportaram elevada taxa de sucesso em peixes estuarinos juvenis, submetidos a uma concentração de 125 mg/L durante duas horas de imersão, o que sugere que a otimização da duração da exposição poderá aumentar a eficácia da marcação sem comprometer a viabilidade dos organismos.

Os resultados do presente estudo indicam ainda que a calceína não afetou o crescimento dos indivíduos ao longo do período experimental. Em contrapartida, observou-se um aumento do tamanho médio após sete dias da experiência, demonstrando que os juvenis retomaram a ingestão alimentar após o período de marcação, e que a calceína não comprometeu significativamente o metabolismo. Esta observação está em concordância com estudos prévios (Correia *et al.*, 2023), que não registaram efeitos negativos sobre o crescimento. Contudo, Santos *et al.*, (2022) no seu ensaio com *P. lividus* de dimensões superiores (20 a 45 mm) expostos a concentrações de 100 mg/L durante 24 h, relatam efeitos adversos no crescimento.

Durante a amostragem, foi visualizado em alguns casos a sobreposição de indivíduos de maior calibre (grupo de 150 mg/L) sobre indivíduos menores, o que pode ter limitado a exposição à calceína. Esta circunstância ajuda a explicar a ligeira diferença nas taxas de sucesso registadas entre o grupo de 100 mg/L (96%) para o de 150 mg/L (93%). Englobando os resultados, a concentração de 150 mg/L revelou-se mais adequada, apresentando melhores índices gerais em comparação com concentrações superiores e maior visibilidade da fluorescência ao longo do tempo, comparativamente à concentração inferior nesta gama de tamanhos ($3,99 \pm 1,22$ mm).

Importante realçar que após sete dias de amostragem, verificou-se uma diminuição generalizada da intensidade da cor amarelada nos indivíduos em todos os tratamentos, através de uma avaliação qualitativa. Este fenómeno poderá refletir um tempo de marcação insuficiente ou utilização de concentrações baixas, embora a toxicidade deva ser

considerada, principalmente em organismos de menor desenvolvimento. Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos: Leips *et al.*, (2001) com vivíparos-anão (*Heterandria formosa*), observaram necessidade de remarcar alguns indivíduos após 2 a 3 semanas; Ray *et al.*, (2025), relataram degradação rápida da fluorescência em bodiões (*Lachnolaimus maximus*). Porém, no caso de Correia *et al.*, (2023), obtiveram marcas visíveis durante três meses em *P. lividus* de tamanhos superiores (10-25mm) expostos por 48 horas a 150 mg/L.

De forma integral, os resultados indicam que a marcação com calceína em *P. lividus* é condicionada a determinados parâmetros. A combinação de 24 horas a uma concentração de 150 mg/L, aplicada a juvenis de 2 a 7 mm mostrou-se adequada ao conciliar eficiência de marcação, baixa mortalidade e ausência de efeitos negativos no crescimento. Esta evidência reforça o potencial da técnica em estudos de monitorização, embora a curta duração da fluorescência constitua uma limitação a ser considerada. O banho químico de calceína apresenta vantagens significativas: é económico, permite a marcação rápida de um grande número de indivíduos e evita o sacrifício dos animais para análise microscópica. Porém, para estudos prolongados de marcação-recaptura, a perda gradual de fluorescência limita a sua aplicação. Futuramente, seria pertinente testar os mesmos intervalos de concentração em organismos do tamanho usado na segunda experiência, mas com períodos de exposição superiores, de forma a averiguar a viabilidade da metodologia aplicada em ações de repovoamento e monitorização em meio natural.

5. Conclusão:

O presente estudo visou compreender e otimizar etapas-chave do ciclo de vida de *P. lividus* em contexto de aquacultura, com vista à aplicação em programas de repovoamento. Dada a sensibilidade da fase de metamorfose, foi explorada o desenvolvimento de biofilme adequado para otimizar o processo de assentamento larvar em placas de cerâmica produzidas através da tecnologia de impressão 3D. A caracterização dos reprodutores permitiu compreender as falhas registadas no ensaio larvar II, evidenciando a influência da sazonalidade e das fases de maturação das gónadas sobre o sucesso reprodutivo. Estes resultados, em conjunto com fatores extrínsecos, permitiram definir a janela temporal mais adequada para a recolha dos reprodutores (abril e junho) e subsequente indução e cultivo larvar.

Relativamente ao assentamento e crescimento, os resultados demonstraram que os três tipos de acondicionamento testados foram adequadamente aceites pelas larvas de *P. lividus*. Destaca-se o acondicionamento *outdoor*, pela superior taxa de assentamento, devido aos sinais promoventes à metamorfose. Considerando o crescimento dos juvenis de *P. lividus*, o acondicionamento *indoor* favoreceu este fator, porém a falta de diferenças significativas demonstra que a progressão temporal possivelmente é o principal determinante do crescimento.

A marcação com calceína confirmou a viabilidade da metodologia em indivíduos de maior tamanho, embora se tenham observado limitações em organismos mais pequenos e uma curta duração da fluorescência. Assim, o banho químico com calceína mostra-se uma ferramenta promissora para programas de monitorização e repovoamento, carecendo, no entanto de calibração adicional para evitar potenciais efeitos tóxicos e perda precoce de marcação.

Apesar das limitações encontradas, nomeadamente a variabilidade sazonal dos reprodutores e problemas associados à qualidade da água, os resultados obtidos são consistentes e fornecem uma base sólida para otimização futura da metodologia.

Considera-se relevante ampliar a investigação sobre diferentes tipos de acondicionamento das placas de cerâmica, incluindo o crescimento de *germlings* de macroalgas (estádios iniciais de desenvolvimento das macroalgas após a germinação dos esporos) aumentando a diversidade e a estabilidade do biofilme. Além disso, a avaliação da eficácia do biofilme em condições *outdoor*, como em praias, pode fornecer informações mais realistas sobre o desempenho das placas no ambiente, considerando também a proximidade do habitat natural

dos juvenis de *P. lividus*. Paralelamente, estudos utilizando calceína com tempos de exposição mais longos são necessário e complementares, permitindo compreender melhor a dinâmica da colonização e monitorização de ensaios de repovoamento.

Em síntese, este trabalho contribuiu para o avanço de práticas de aquacultura sustentáveis em Portugal, fornecendo informações essenciais para a melhoria das técnicas de cultivo de *Paracentrotus lividus*, com potencial impacto na conservação e recuperação dos ecossistemas costeiros.

6. Referências bibliográficas:

- Agatsuma, Y. (2011). Ecological studies on the population dynamics of sea urchins associated with the communities of marine algae. *Nippon suisan gakkaiishi*, 77(3), 352–355. <https://doi.org/10.2331/suisan.77.352>
- Ak, O., Ceylan, B., Aydin, İ., Polat, H., Küçük, E., Eroğlu, O., & Kapiris, K. (2016). Stock enhancement by hatchery-released turbot, *Psetta maxima*, in the southeastern Black Sea: capture, migration, growth and diet analyses. *Scientia Marina*, 80(2), 163–174. <https://doi.org/10.3989/scimar.04324.25A>
- Araújo, J., Candeias-Mendes, A., Monteiro, I., Teixeira, D., Soares, F., & Pousão-Ferreira, P. (2020). The use of diatom *Skeletonema costatum* on aquaculture-produced purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larvae and post-larvae diet. *Aquaculture Research*, 51(6), 2545–2554. <https://doi.org/10.1111/are.14597>
- Azad, A. K., Pearce, C. M., & McKinley, R. S. (2011). Influence of microalgal species and dietary rations on larval development and survival of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857). *Aquaculture*, 322–323, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.029>
- Becker, P. T., Egea, E., & Eeckhaut, I. (2008). Characterization of the bacterial communities associated with the bald sea urchin disease of the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.12.002>
- Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., & Weiner, S. (1997). Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1380), 461–465. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0066>
- Berman, O., Weizman, M., Oren, A., Neri, R., Parnas, H., Shashar, N., & Tarazi, E. (2023). Design and application of a novel 3D printing method for bio-inspired artificial reefs. *Ecological Engineering*, 188, 106892. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2023.106892>
- Bertocci, I., Blanco, A., Franco, J. N., Fernández-Boo, S., & Arenas, F. (2018). Short-term variation of abundance of the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), subject to harvesting in northern Portugal. *Marine Environmental Research*, 141, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.09.017>
- Bertocci, I., Dominguez, R., Machado, I., Freitas, C., Godino, J. D., Sousa-Pinto, I., Gonçalves, M., & Gaspar, M. B. (2014). Multiple effects of harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. *Fisheries Research*, 150, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.10.010>
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 32, 177–216. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(01\)80013-2](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(01)80013-2)
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2013). *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 38, 297–327. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00021-6>
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2020). *Paracentrotus lividus*. *Sea Urchins: Biology and Ecology*, 43, 447–485. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00026-3>
- Bridges, C. R., Nousdili, D., Kranz-Finger, S., Borutta, F., Schulz, S., Na'amnieh, S., Vassallo-Agius, R., Psaila, M., & Ellul, S. (2020). Tuna ocean restocking (tor) pilot study-sea-based hatching and release

of Atlantic bluefin tuna larvae – theory and practice. *Collective Volume of Scientific Papers, ICCAT*, 76(2), 408–420.

- Brundu, G., Cannavacciuolo, A., Nannini, M., Somma, E., Munari, M., Zupo, V., & Farina, S. (2023). Development of an efficient, noninvasive method for identifying gender year-round in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 564, 739082. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739082>
- Brundu, G., Vallainc, D., Baroli, M., Figus, A. M., Pinna, A., & Carboni, S. (2017). Effects of on-demand feeding on sea urchin larvae (*Paracentrotus lividus*; Lamarck, 1816), development, survival and microalgae utilization. *Aquaculture Research*, 48(4), 1550–1560. <https://doi.org/10.1111/are.12990>
- Brundu, G., Monleón, L. V., Vallainc, D., & Carboni, S. (2016). Effects of larval diet and metamorphosis cue on survival and growth of sea urchin post-larvae (*Paracentrotus lividus*; Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 465, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.014>
- Burke, R. D. (1980). Podial sensory receptors and the induction of metamorphosis in echinoids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 47(3), 223–234. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(80\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(80)90040-4)
- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104(2), 275–289. <https://doi.org/10.1007/BF01313269>
- Carballo-Bolaños, R., Wei, Y., & Denis, V. (2024). Coral transplantation in urban environments: Insights from colony survival and growth on artificial frames versus the seabed. *Marine Environmental Research*, 194, 106319. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106319>
- Carboni, S. (2013). *Research and development of hatchery techniques to optimise juvenile production of the edible Sea Urchin, Paracentrotus lividus* (Thesis). University of Stirling, Scotland.
- Carboni S., Addis P., Cau A., & Atack T. (2012). Aquaculture could enhance Mediterranean sea urchin fishery, expand supply. *Global Aquaculture Advocate*, 15, 44–45.
- Carboni, S., Hughes, A. D., Atack, T., Tocher, D. R., & Migaud, H. (2015). Influence of broodstock diet on somatic growth, fecundity, gonad carotenoids and larval survival of sea urchin. *Aquaculture Research*, 46(4), 969–976. <https://doi.org/10.1111/are.12256>
- Carella, F., Correggia, M., Cordone, A., Iacovino, O., Maresca, F., Villari, G., Roque, A., & Vico, G. D. (2025). Bald disease in a natural population of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* of the Mediterranean Sea: From spines to tissues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 213, 108415. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2025.108415>
- Carvalho, R. J., Brilha, J. B., & Pereira, D. I. (2016). Designation of Natural Monuments by the Local Administration: the Example of Viana Do Castelo Municipality and its Engagement with Geoconservation (NW Portugal). *Geoheritage*, 8(3), 279–290. <https://doi.org/10.1007/s12371-016-0183-2>
- Castilla-Gavilán, M., Buzin, F., Cognie, B., Dumay, J., Turpin, V., & Decottignies, P. (2018). Optimising microalgae diets in sea urchin *Paracentrotus lividus* larviculture to promote aquaculture diversification. *Aquaculture*, 490, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.003>
- Charbonnel, E., Carnus, F., Ruitton, S., Direac'h, L. Le, Harmelin, J. -G., & Beurois, J. (2010). Artificial Reefs in Marseille: From Complex Natural Habitats to Concepts of Efficient Artificial Reef Design.

Global Change: Mankind-Marine Environment Interactions, 81–82. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8630-3_14

- Cirino, P., Ciaravolo, M., Paglialonga, A., & Toscano, A. (2017). Long-term maintenance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in culture. *Aquaculture Reports*, 7, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.04.003>
- Comeau, S., Cornwall, C. E. & McCulloch, M. T. (2017). Decoupling between the response of coral calcifying fluid pH and calcification to ocean acidification. *Scientific Reports*, 7(1), 7573. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08003-z>
- Correia, M. J., Lopes, P. M., Santos, P. M., Jacinto, D., Mateus, D., Maresca, F., Quintella, B. R., Cruz, T., Lourenço, S., Pombo, A., & Costa, J. L. (2023). Pilot studies for stock enhancement of purple sea urchins (*Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816): usefulness of refuges and calcein marking for the monitoring of juveniles released into the natural environment. *Aquatic Living Resources*, 36, 12. <https://doi.org/10.1051/alr/2023009>
- Couvray, S., Miard, T., Bunet, R., Martin, Y., Grillasca, J. -P., Bonnefont, J. -L., & Coupé, S. (2015). Experimental Release of Juvenile Sea Urchins (*Paracentrotus lividus*) in Exploited Sites along the French Mediterranean Coast. *Journal of Shellfish Research*, 34(2), 555-563. <https://doi.org/10.2983/035.034.0200>
- Crapp, G. B., & Willis, M. E. (1975). Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck), with notes on the reproductive cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20(2), 157–178. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90021-0)
- Dan, S., Hamasaki, K., Yamashita, T., Oka, M., & Kitada, S. (2008). Evaluation of the stocking efficiency of giant cuttlefish *Sepia latimanus* hatchlings through marking experiments. *Nippon suisan gakkaiishi*, 74(4), 615–624. <https://doi.org/10.2331/suisan.74.615>
- Domínguez, R., Godino, J. D., Freitas, C., Machado, I., & Bertocci, I. (2015). Habitat traits and patterns of abundance of the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), at multiple scales along the north Portuguese coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 155, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.12.048>
- Dunn, K., Haeusler, H., Zavoleas, Y., Bishop, M., Dafforn, K., Sedano, F., Yu, D., & Schaefer, N. (2019). Recycled Sustainable 3D Printing Materials for Marine Environments. 583–592. <https://doi.org/10.52842/conf.ecaade.2019.2.583>
- Dworjany, S. A., & Pirozzi, I. (2008). Induction of settlement in the sea urchin *Tripneustes gratilla* by macroalgae, biofilms and conspecifics: A role for bacteria? *Aquaculture*, 274(2–4), 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.030>
- Echinos Procida. (2021). *Innovazione e Tradizione*. Consultado em 17 set. 2025. Disponível em <https://Www.Echinos.It/2021/02/11/Innovazione-e-Tradizione/>.
- Environment and Resources Authority. (2023). Press release by the Ministry for the Environment, Energy and Enterprise and the Parliamentary Secretariat for Fisheries, Aquaculture and Animal Rights: Aquaculture project to increase the population of sea urchins in Maltese waters. Consultado em 24 set. 2025. Disponível em <https://era.org.mt/press-releases/press-release-by-the-ministry-for-the-environment-energy-and-enterprise-and-the-parliamentary-secretariat-for-fisheries-aquaculture-and-animal-rights-aquaculture-project-to-increase-the-population-o/>

- Fabbrocini, A., Maurizio, D., & D'Adamo, R. (2016). Sperm motility patterns as a tool for evaluating differences in sperm quality across gonad development stages in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816). *Aquaculture*, 452, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.033>
- Fadl, A. E. A., Mahfouz, M. E., El-Gamal, M. M. T., & Heyland, A. (2019). Onset of feeding in juvenile sea urchins and its relation to nutrient signalling. *Invertebrate Reproduction & Development*, 63(1), 11–22. <https://doi.org/10.1080/07924259.2018.1513873>
- FAO. (2023a). *Guidelines on aquaculture restocking and stock enhancement*. General Fisheries Commission for the Mediterranean. <https://doi.org/10.4060/cc3840en>
- FAO. (2023b, 25 de outubro). *In seas and stomachs: bolstering the long-term viability of sea urchins*. Consultado em 21 set. 2025. Disponível em <https://www.fao.org/newsroom/story/In-seas-and-stomachs-bolstering-the-long-term-viability-of-sea-urchins/en>
- Fernández-Boán, M., Fernández, L., & Freire, J. (2012). History and management strategies of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fishery in Galicia (NW Spain). *Ocean & Coastal Management*, 69, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2012.07.032>
- Flammang, P., & Santos, R. (2024). The Temporary Adhesion of Echinoderm Tube Feet. *Frontiers in Invertebrate Physiology: A Collection of Reviews*, 303–343.
- Formery, L., Wakefield, A., Gesson, M., Toisoul, L., Lhomond, G., Gilletta, L., Lasbleiz, R., Schubert, M., & Croce, J. C. (2022). Developmental atlas of the indirect-developing sea urchin *Paracentrotus lividus*: From fertilization to juvenile stages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.966408>
- Gago, J. (2009). *Sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck 1816) eggs and endotrophic larvae: Potential of their use as marine larval fish first-feeding*. (Tese de Doutoramento). Disponível em <http://hdl.handle.net/10451/1829.000580251>
- Gambardella, C., Marcellini, F., Falugi, C., Varrella, S., & Corinaldesi, C. (2021). Early-stage anomalies in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Overview and future perspectives. *Environmental Pollution*, 287, 117608. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117608>
- Giacalone, V. M., Pipitone, C., Abecasis, D., Badalamenti, F., & D'Anna, G. (2022). Movement ecology of the white seabream *Diplodus sargus* across its life cycle: a review. *Environmental Biology of Fishes*, 105(12), 1809–1823. <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01258-0>
- Gibbs, V. K., Watts, S. A., & Lawrence, A. L. (2007). Effect of Temperature on Gamete Production and Biochemical Composition of Gonads in the Sea Urchin *Lytechinus variegatus*. *Gulf of Mexico Science*, 25(2). <https://doi.org/10.18785/goms.2502.03>
- Gillanders, B. M., Elsdon, T. S., & Munro, A. R. (2006). *Impacts of Native Fish Stocking on Fish in the Murray-Darling Basin* (Murray-Darling Basin Commission Contract No MD239). University of Adelaide, Adelaide.
- Gomes, A., Lourenço, S., Santos, P. M., Raposo, A., Mendes, S., Gonçalves, S. C., Ferreira, S. M. F., & Pombo, A. (2021). Effects of single and mixed-diatom diets on growth, condition, and survival of larvae of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture International*, 29(3), 1069–1090. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00676-8>

- Gosselin, P., & Jangoux, M. (1998). From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology*, *118*(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/s004350050054>
- Haag, N., Russell, M. P., Hernandez, J. C., & Dollahon, N. (2013). Assessing fluorochrome-staining efficacy in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776). *Cahiers de Biologie Marine*, *54*, 625–631.
- Hamel, J. F., & Mercier, A. (2013). *Apostichopus japonicus*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180424A1629389.en>
- Hammond, L. M., & Hofmann, G. E. (2010). Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Marine Biology*, *157*(12), 2677–2687. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1528-z>
- Hennebert, E., Santos, R., & Flammang, P. (2012). Echinoderms don't suck: Evidence against the involvement of suction in tube foot attachment. *Zoosymposia*, *7*(1), 25–32. <https://doi.org/10.11646/zoosymposia.7.1.3>
- Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., & Sala, E. (2004). Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Marine Biology*, *144*(5), 1011–1018. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1266-6>
- Hillebrand, H., Dürselen, C., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, *35*(2), 403–424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hodin, J., Ferner, M. C., Ng, G., Lowe, C. J., & Gaylord, B. (2015). Rethinking competence in marine life cycles: ontogenetic changes in the settlement response of sand dollar larvae exposed to turbulence. *Royal Society Open Science*, *2*(6), 150114. <https://doi.org/10.1098/rsos.150114>
- Hodin, J., Lutek, K., & Heyland, A. (2016). A newly identified left–right asymmetry in larval sea urchins. *Royal Society Open Science*, *3*(8), 160139. <https://doi.org/10.1098/rsos.160139>
- Hu, M. Y., Bassarab, T. M., Chang, W. W. J., Tetzlaff, S.L., Strohbach, F., Dupont, S., & Stumpp, M. (2025). Calcification in sea urchin larvae is associated with low metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, *228*(1), <https://doi.org/10.1242/jeb.248145>
- Jacinto, D., Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., & Cruz, T. (2013). Patterns of abundance, population size, structure and microhabitat usage of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in SW Portugal and NW Italy. *Marine Biology*, *160*(5), 1135–1146. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2166-z>
- Jacinto, D., & Cruz, T. (2012). *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) attachment force and burrowing behavior in rocky shores of SW Portugal. *Zoosymposia*, *7*(1), 231–240. <https://doi.org/10.11646/zoosymposia.7.1.21>
- Jangoux, M., & Lawrence, J. M. (1982). *Echinoderm Nutrition*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003078920>
- Johnson, A. S., Salyers, J. M., Alcorn, N. J., Ellers, O., & Allen, J.D. (2013). Externally visible fluorochrome marks and allometries of growing sea urchins. *Invertebrate Biology*, *132*(3), 251–269. <https://doi.org/10.1111/ivb.12024>

- Johnson, P. T. (1971). *Studies on diseased urchins from Point Loma* (Annual Report Kelp Habitat Improvement Project Annual Report Kelp Habitat Improvement Project, pp. 82–90). California Institute of Technology, Pasadena.
- Juinio-Meñez, M. A., Bangi, H. G., Malay, M. C., & Pastor, D. (2008). Enhancing the Recovery of Depleted *Tripneustes gratilla* Stocks Through Grow-Out Culture and Restocking. *Reviews in Fisheries Science*, *16*(1–3), 35–43. <https://doi.org/10.1080/10641260701678116>
- Kelly, M. S., Hunter, A. J., Scholfield, C. L., & McKenzie, J. D. (2000). Morphology and survivorship of larval *Psammechinus miliaris* (Gmelin) (Echinodermata: Echinoidea) in response to varying food quantity and quality. *Aquaculture*, *183*(3-4), 223–240. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00296-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00296-3)
- Kshatri, A. S., Lavkush, L., Kumar, S., Kumari, A., & Patel, P. K. (2025). Tagging and Marking Techniques in Fisheries Management. *The Fish World a Monthly Magazine*, *2*(1), 120–128. <https://doi.org/10.5281/ScienceWorld.14802856>
- La Mesa, G., Longobardi, A., Sacco, F., & Marino, G. (2008). First release of hatchery juveniles of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Teleostei) at artificial reefs in the Mediterranean: results from a pilot study. *Scientia Marina*, *72*(4), 743–756. <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72n4743>
- Lago, A., Basuyaux, Y., Leira, M., Costas, D., & Paredes, E. (2024). Influence of physico-chemical parameters on the settlement of competent larvae of cultured sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, *589*, 740982. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740982>
- Lawrence, J. M. (2007). *Edible sea urchins: Biology and ecology*. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 37, pp. 1–529). Elsevier.
- Leips, J., Baril, C. T., Rodd, F. H., Reznick, D. N., Bashey, F., Visser, G. J., & Travis, J. (2001). The Suitability of Calcein to Mark Poeciliid Fish and a New Method of Detection. *Transactions of the American Fisheries Society*, *130*(3), 501–507. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2001\)130<0501:TSOCTM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2001)130<0501:TSOCTM>2.0.CO;2)
- Leung, J. Y. S., Zhang, S., & Connell, S. D. (2022). Is Ocean Acidification Really a Threat to Marine Calcifiers? A Systematic Review and Meta-Analysis of 980+ Studies Spanning Two Decades. *Small*, *18*(35). <https://doi.org/10.1002/sml.202107407>
- Levy, N., Berman, O., Yuval, M., Loya, Y., Treibitz, T., Tarazi, E., & Levy, O. (2022). Emerging 3D technologies for future reformation of coral reefs: Enhancing biodiversity using biomimetic structures based on designs by nature. *Science of The Total Environment*, *830*, 154749. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154749>
- Liu, H., & Chang, Y. (2015). Sea Urchin Aquaculture in China. *Echinoderm Aquaculture*, 127–146. <https://doi.org/10.1002/9781119005810.ch6>
- Liu, W., Pearce, C. M., Alabi, A. O., & Gurney-Smith, H. (2009). Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, *293*(3–4), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.032>
- Loi, B., Guala, I., Silva, R. P., Brundu, G., Baroli, M., & Farina, S. (2017). Hard time to be parents? Sea urchin fishery shifts potential reproductive contribution of population onto the shoulders of the young adults. *5*, e3067. <https://doi.org/10.7717/peerj.3067>

- Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., & Palacín, C. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 179–191. <https://doi.org/10.3354/meps122179>
- Machado, I. (2007). *Estrutura populacional, biologia reprodutiva e exploração do ouriço do mar Paracentrotus lividus, no litoral rochoso do Norte de Portugal* [Tese]. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar-Universidade do Porto.
- Machado, I., Moura, P., Pereira, F., Vasconcelos, P., & Gaspar, M. B. (2019). Reproductive cycle of the commercially harvested sea urchin (*Paracentrotus lividus*) along the western coast of Portugal. *Invertebrate Biology*, 138(1), 40–54. <https://doi.org/10.1111/ivb.12238>
- Medeiros, I. P. M., & Souza, M. M. (2023). Acid times in physiology: A systematic review of the effects of ocean acidification on calcifying invertebrates. *Environmental Research*, 231, 116019. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116019>
- McCann, M. T., Ozolek, J. A., Castro, C. A., Parvin, B., & Kovacevic, J. (2015). Automated Histology Analysis: Opportunities for signal processing. *IEEE Signal Processing Magazine*, 32(1), 78–87. <https://doi.org/10.1109/MSP.2014.2346443>
- McCauley, D. J., Pinsky, M. L., Palumbi, S. R., Estes, J. A., Joyce, F. H., & Warner, R. R. (2015). Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. *Science*, 347(6219). <https://doi.org/10.1126/science.1255641>
- Mendes, A., Araújo, J., Soares, F., Bandarra, N., & Pousão-Ferreira, P. (2019). Production of purple Sea Urchin *Paracentrotus lividus* in Portugal. *World Aquaculture*, 50(1), 46–50.
- Migotto, A. E., & Marques, A. C. (2003). *Invertebrados marinhos* (Versão preliminar). Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Diretoria de Conservação da Biodiversidade. Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica (BRA 97 G 31). Disponível em https://antigo.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/invmar1.pdf.
- Mironov, A. N. (1978). The most deep-sea species of sea urchins (Echinoidea, Pourtalesiidae). *Zoologicheskii Zhurnal*, 57(5), 721–726.
- Mita, M., Hino, A., & Yasumasu, I. (1984). Effect of Temperature on Interaction between Eggs and Spermatozoa of Sea Urchin. *The Biological Bulletin*, 166(1), 68–77. <https://doi.org/10.2307/1541431>
- Moran, A. L. (2000). Calcein as a marker in experimental studies newly-hatched gastropods. *Marine Biology*, 137(5–6), 893–898. <https://doi.org/10.1007/s002270000390>
- Murano, C., Gallo, A., Nocerino, A., Macina, A., Gualandi, S. C., & Boni, R. (2023). Short-Term Thermal Stress Affects Immune Cell Features in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *Animals*, 13(12), 1954. <https://doi.org/10.3390/ani13121954>
- Nabhitabhata, J. (2014). *Sepia pharaonis*. *Cephalopod Culture*, 205–224. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_12
- Nabhitabhata, J., & Ikeda, Y. (2014). *Sepioteuthis lessoniana*. *Cephalopod Culture*, 315–347. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_17
- Nabhitabhata, J., & Segawa, S. (2014). Aquaculture to Restocking. *Cephalopod Culture*, 113–130. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_7

- NPAFC. (2025). *NPAFC Statistics: Pacific Salmonid Catch and Hatchery Release Data*. Consultado em 9 set. 2025. <https://Www.Npafc.Org/Statistics/>.
- Núñez-González, R., Sarmiento-Lezcano, A. N., Caballero, M. J., Tilic, E., & Castro-Hernández, J. J. (2025). Locality matters: Variation in the reproductive cycle and population structure of subtropical sea urchins. *PLOS One*, *20*(8), e0328273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328273>
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A., & Takeuchi, T. (2005). Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*, *244*(1–4), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.044>
- Oliveira, J., Alcance, P., & Luis, O. (2003). Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. *Echinoderm Research*, *10*, 269–275.
- Ahmed, H. O., Elmasry, E., El-Sayed, A. -F. M., & Raze, F. A. A. (2016). Larval Growth and Metamorphosis of South Eastern Mediterranean Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) Fed Different Microalgal Diets. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, *11*(4), 287–295. <https://doi.org/10.3923/jfas.2016.287.295>
- Ouchene, H., Boutgayout, H., Hermas, J., Benbani, A., Abou Oualid, J., & Elouizgani, H. (2021). Reproductive Cycle of Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) from the South Coast of Morocco: Histology, Gonads Index, and Size at First Sexual Maturity. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *46*(6), 5393–5405. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-05271-2>
- Plee, T., & Suckling, C. C. (2024). Improving green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) hatchery production by determining effective settlement cues and post-settlement conditions. *Aquaculture*, *581*, 740386. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740386>
- Prabhakaran, N., Gupta, G. V. M., & Kumar, B. S. K. (2025). A critical review on ocean acidification driven by disinfection by-products discharge from ships' ballast water management systems: Impacts on carbon chemistry. *Marine Pollution Bulletin*, *217*, 118029. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.118029>
- Privitera, D., Noli, M., Falugi, C., & Chiantore, M. (2011). Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *407*(1), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.030>
- Purcell, S. W., & Blockmans, B. F. (2009). Effective fluorochrome marking of juvenile sea cucumbers for sea ranching and restocking. *Aquaculture*, *296*(3–4), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.027>
- Purcell, S. W., Blockmans, B. F., & Nash, W. J. (2006). Efficacy of chemical markers and physical tags for large-scale release of an exploited holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *334*(2), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.02.007>
- Rahim, S. A. K. A., Li, J. -Y., Satuito, C. G., & Kitamura, H. (2004). The role of diatom-based film as an inducer of metamorphosis in larvae of two species of sea urchin, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardaris crassispina*. *Sessile Organisms*, *21*(1), 7–12. <https://doi.org/10.4282/sosj.21.7>
- Rahman, M. A., Yusoff, F. Md., Arshad, A., Shamsudin, M. N., & Amin, S. M. N. (2012). Embryonic, Larval, and Early Juvenile Development of the Tropical Sea Urchin, *Salmacis sphaeroides*

(Echinodermata: Echinoidea). *The Scientific World Journal*, 2012, 1–9.
<https://doi.org/10.1100/2012/938482>

- Raposo, A., Ferreira, S. M. F., Ramos, R., Anjos, C., Gonçalves, S. C., Santos, P. M., Baptista, T., Costa, J. L., & Pombo, A. (2023). Reproductive Cycle of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) on the Central West Coast of Portugal: New Perspective on the Gametogenic Cycle. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(12), 2366. <https://doi.org/10.3390/jmse11122366>
- Rassoulzadegan, F., Fenaux, L., & Strathmann, R. R. (1984). Effect of flavor and size on selection of food by suspension-feeding plutei1. *Limnology and Oceanography*, 29(2), 357–360. <https://doi.org/10.4319/lo.1984.29.2.0357>
- Ray, B. C., Murray, C. A., Markham, O. I., Patmagrian, C. N., Ohs, C. L., Patterson, J. T., Collins, A. B., & DiMaggio, M. A. (2025). Evaluation of calcein marking protocols for Hogfish. *North American Journal of Fisheries Management*, 45(4), 684–693. <https://doi.org/10.1093/najfnt/vqaf053>
- Renato Bispo. (2022, 1 setembro). *Living surfaces: Design of physical structures for sea urchins regeneration in Portuguese coast*. LIDA. <https://Lida.Pt/Pt-Pt/Research/Living-Surfaces/>.
- Rial, D., Rial, P., Casal, A., Costoya, N., & Costas, D. (2018). Induction of settlement, growth and survival of juveniles of *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 483, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.005>
- Riedl, R. (1986). *Fauna y Flora del Mar Mediterraneo*. Omega. <https://isbnsearch.org/isbn/9788428207676>
- Rodríguez, A., Hernández, J. C., & Clemente, S. (2016). Efficiency of calcein tagging on juveniles of the sea urchins *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*. *Marine Ecology*, 37(2), 463–469. <https://doi.org/10.1111/maec.12287>
- Sala, E., & Zabala, M. (1996). Fish predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 140, 71–81. <https://doi.org/10.3354/meps140071>
- Santos, P. M., Quintella, B. R., Jacinto, D., Gomes, A., Saldanha, C., Lourenço, S., Lopes, P. M., Correia, M. J., Mateus, D., Cruz, T., Pombo, A., & Costa, J. L. (2022). Physical and chemical tagging methods for the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Scientia Marina*, 86(3), e038. <https://doi.org/10.3989/scimar.05259.038>
- Sartori, D., & Gaion, A. (2016). Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility evaluation. *Aquaculture Nutrition*, 22(6), 1214–1221. <https://doi.org/10.1111/anu.12326>
- Shaw, C. G., Pavloundi, C., Hudgell, M. A. B., Crow, R. S., Saw, J. H., Pyron, R. A., & Smith, L. C. (2023). Bald sea urchin disease shifts the surface microbiome on purple sea urchins in an aquarium. *Pathogens and Disease*, 81. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftad025>
- Spirlet, C., Grosjean, P., & Jangoux, M. (1998). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. *Invertebrate Reproduction & Development*, 34(1), 69–81. <https://doi.org/10.1080/07924259.1998.9652355>

- Starr, M., Himmelman, J. H., & Therriault, J. C. (1993). Environmental Control of Green Sea Urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, Spawning in the St. Lawrence Estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(5), 894–901. <https://doi.org/10.1139/f93-103>
- Suckling, C. C., Terrey, D. & Davies, A. J. (2018). Optimising stocking density for the commercial cultivation of sea urchin larvae. *Aquaculture*, 488, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.022>
- Ternengo, S., Marengo, M., El Idrissi, O., Yepka, J., Pasqualini, V., & Gobert, S. (2018). Spatial variations in trace element concentrations of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, a first reference study in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 129(1), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.049>
- Thompson, J. R., Paganos, P., Benvenuto, G., Arnone, M. I., & Oliveri, P. (2021). Post-metamorphic skeletal growth in the sea urchin *Paracentrotus lividus* and implications for body plan evolution. *EvoDevo*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13227-021-00174-1>
- Toso, A., Necci, F., Martines, A., Lacorte, R., Toso, Y., Gianguzza, P., Deidun, A., Ungaro, N., Costantino, G., Caforio, M., Giannuzzi, C. G., D’Onghia, F. M., Strippoli, G., Barbone, E., Milisenda, G., & Piraino, S. (2025). Overfishing and sea warming drive the collapse of *Paracentrotus lividus*. *Scientific Reports*, 15(1), 18733. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-02642-3>
- Unuma, T., Sakai, Y., Agatsuma, Y., & Kayaba, T. (2015). Sea Urchin Aquaculture in Japan. *Echinoderm Aquaculture*, 75–126. <https://doi.org/10.1002/9781119005810.ch5>
- Uz, S., Carrasco, J. F., Rodríguez, C. C., & Anadon, N. (2013). Metamorphosis, growth and survival of early juveniles of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): Effects of larval diet and settlement inducers. *Cahiers de Biologie Marine*, 54(4), 691–695.
- Vidavsky, N., Addadi, S., Mahamid, J., Shimoni, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., Weiner, S., & Addadi, L. (2014). Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 39–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312833110>
- Warren-Myers, F., Dempster, T., & Swearer, S. E. (2018). Otolith mass marking techniques for aquaculture and restocking: benefits and limitations. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 28(3), 485–501. <https://doi.org/10.1007/s11160-018-9515-4>
- Watts, S. A., Hofer, S. C., Desmond, R. A., Lawrence, A. L., & Lawrence, J. M. (2011). The effect of temperature on feeding and growth characteristics of the sea urchin *Lytechinus variegatus* fed a formulated feed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397(2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.10.007>
- Wickström, H., & Sjöberg, N. B. (2014). Traceability of stocked eels – the Swedish approach. *Ecology of Freshwater Fish*, 23(1), 33–39. <https://doi.org/10.1111/eff.12053>
- Wilson, C. A., Beckman, D. W., & Dean, J. M. (1987). Calcein as a Fluorescent Marker of Otoliths of Larval and Juvenile Fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116(4), 668–670. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1987\)116<668:CAAFMO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1987)116<668:CAAFMO>2.0.CO;2)
- Wilt, F. H. (2002). Biomineralization of the Spicules of Sea Urchin Embryos. *Zoological Science*, 19(3), 253–261. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.253>

- Yoris-Nobile, A. I., Slebi-Acevedo, C. J., Lizasoain-Arteaga, E., Indacoechea-Vega, I., Blanco-Fernandez, E., Castro-Fresno, D., Alonso-Estebanez, A., Alonso-Cañon, S., Real-Gutierrez, C., Boukhelf, F., Boutouil, M., Sebaibi, N., Hall, A., Greenhill, S., Herbert, R., Stafford, R., Reis, B., van der Linden, P., Gómez, O. B., Meyer, H. S., Franco, J. N., Almada, E., Borges, M. T., Sousa-Pinto, I., Tuaty-Guerra, M., & Lobo-Arteaga, J. (2023). Artificial reefs built by 3D printing: Systematisation in the design, material selection and fabrication. *Construction and Building Materials*, 362, 129766. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.129766>
- Yeruham, E., Rilov, G., Shigel, M., & Abelson, A. (2015). Collapse of the echinoid *Paracentrotus lividus* populations in the Eastern Mediterranean-result of climate change? *Scientific Reports*, 5(1), 13479. <https://doi.org/10.1038/srep13479>
- Zhan, Y., Li, J., Sun, J., Zhang, W., Li, Y., Cui, D., Hu, W., & Chang, Y. (2019). The Impact of Chronic Heat Stress on the Growth, Survival, Feeding, and Differential Gene Expression in the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00301>
- Zhang, L., Song, X., Hamel, J. -F., & Mercier, A. (2015). *Aquaculture, Stock Enhancement, and Restocking*, 39, 289–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799953-1.00016-7>

7. Anexos:

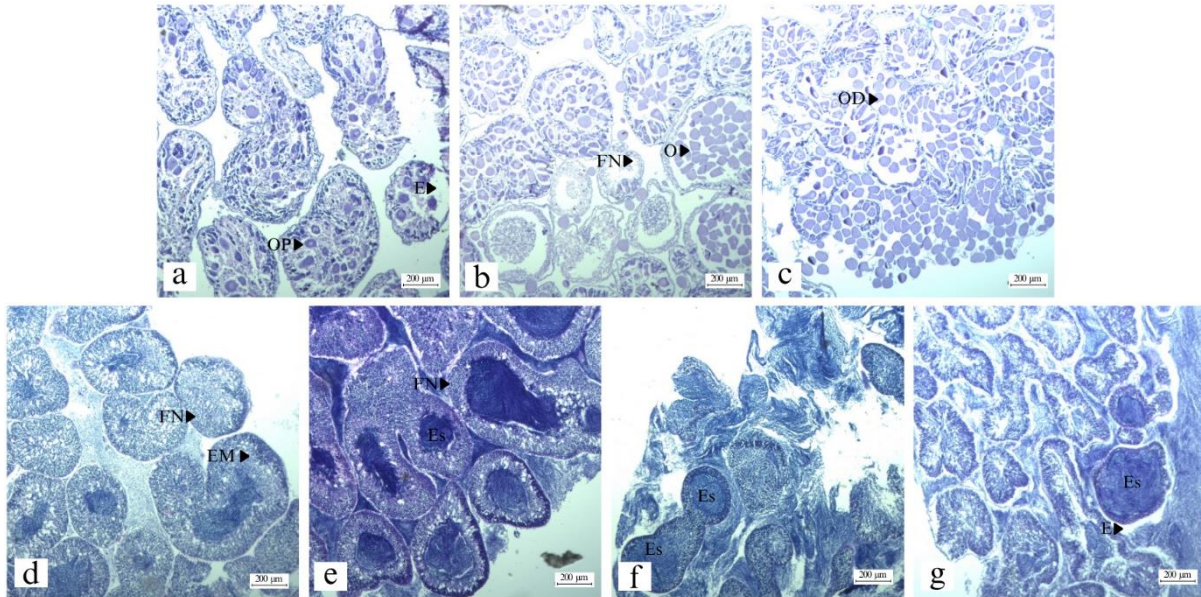


Figura 14: Secções histológicas representativas das gónadas femininas (a-c) e masculinas (d-g) de *Paracentrotus lividus* nos três e quatro estágios de maturidade, respetivamente, obtidos neste ensaio laboratorial, definidos por Byrne, (1990). **Gónadas femininas:** (a) Fase III – Prematuro: presença de Oócitos Primários (OP) com núcleo visível e espaços vazios (E) resultantes de uma desova parcial; (b) Fase IV – Maduro: Ovário rico em oócitos (O) no lúmen e uma fina camada de fagócitos nutritivos (FN) ao longo da parede; (c) Fase V – Parcialmente desovado: Ovário com espaços vazios (E) entre oócitos desagregados (OD) no centro; **Gónadas masculinas:** (d) Fase II – Crescimento: Testículo com colunas de espermatócitos em desenvolvimento a migrar (EM) e fagócitos nutritivos (FN); (e) Fase III – Prematuro: Testículo prematuro com espermatozoides (Es) e fagócitos nutritivos (FN) ao redor da periferia; (f) Fase IV – Maduro: Testículo repleto de espermatozoides (Es); (g) Fase V - Parcialmente desovado: Testículo parcialmente fecundado com espaços vazios (E) deixados pelos espermatozoides fecundados (Es).

Tabela VI: Resultados da análise de regressão binomial de Poisson ao efeito da combinação entre os tipos de acondicionamento das placas, local e tempo decorrido no assentamento dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio de assentamento é inferior à referência (4ª semana*Tanque**Outdoor*), enquanto a azul é superior à referência. Os valores de *p-value* a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).

Semana	Local	Tipo de acondicionamento	Exp(B)	<i>p-value</i>
2ª	A	I	0,43	0,258
2ª	A	M	0,16	0,017
2ª	A	O	4,16	0,047
2ª	T	I	4,57	0,035
2ª	T	M	7,01	0,007
2ª	T	O	6,99	0,007
3ª	A	I	0,58	0,455
3ª	A	M	1,34	0,684
3ª	A	O	2,88	0,141
3ª	T	I	1,68	0,47
3ª	T	M	4,10	0,049
3ª	T	O	2,51	0,201
4ª	A	I	0,24	0,056
4ª	A	M	0,37	0,178
4ª	A	O	0,70	0,621
4ª	T	I	0,67	0,585
4ª	T	M	0,43	0,258
4ª	T	O	Referência	

Tabela VII: Resultados da análise do modelo de regressão binomial negativa com função de ligação log ao fator tipos de acondicionamento decorrido no assentamento dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio de assentamento é inferior à referência (*Outdoor*), enquanto a azul é superior à referência. Os valores de *p-value* a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).

Tipo de acondicionamento	Exp(B)	<i>p-value</i>
I	1,05	0,925
M	0,29	0,026
O	Referência	

Tabela VIII: Resultados da análise do modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log ao efeito da combinação entre o tempo e tipos de acondicionamento em relação ao crescimento dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio do crescimento é inferior à referência, enquanto a azul é superior à referência. Os valores de *p-value* a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).

Semana	Tipo de acondicionamento	Exp(B)	<i>p-value</i>
2ª	I	0,64	0,001
2ª	M	1,06	0,485
2ª	O	Referência Tipo de acondicionamento	
3ª	I	0,04	0,001
3ª	M	1,07	0,421
3ª	O	Referência Tipo de acondicionamento	
4ª	I	Referência Semana	
4ª	M		
4ª	O		

Tabela IX: Resultados da análise do modelo linear generalizado com distribuição Gamma e função de ligação log ao efeito da combinação entre o tempo e tipos de condicionamento das placas em relação ao crescimento dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os valores de Exp(B) a cinzento representam as vezes que o número médio do crescimento é inferior à referência, enquanto a azul é superior à referência. Os valores de *p-value* a verde, significa que não apresenta diferenças estatísticas com a referência ($p>0,05$).

Semana	Tipo de condicionamento	Exp(B)	<i>p-value</i>
2 ^a	I	0,84	0,175
2 ^a	M	0,83	0,165
2 ^a	O	Referência Tipo de condicionamento	
3 ^a	I	0,94	0,616
3 ^a	M	0,83	0,155
3 ^a	O	Referência Tipo de condicionamento	
4 ^a	I	1,30	0,046
4 ^a	M	0,78	0,06
4 ^a	O	Referência Tipo de condicionamento	
6 ^a	I	0,90	0,432
6 ^a	M	0,82	0,138
6 ^a	O	Referência Tipo de condicionamento	
7 ^a	I	1,05	0,698
7 ^a	M	0,99	0,946
7 ^a	O	Referência Tipo de condicionamento	
8 ^a	I	Referência Semana	
8 ^a	M		
8 ^a	O		