



**Contributo para o estudo do potencial cultivo do pepino-do-mar,  
*Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823)**

**Daniela Sofia Vaz Pratas**

2018





**Contributo para o estudo do potencial cultivo do pepino-do-mar,  
*Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823)**

**Daniela Sofia Vaz Pratas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

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

2018



Título: Contributo para o estudo do potencial cultivo do pepino-do-mar, *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823)

Copyright © Daniela Sofia Vaz Pratas

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

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



## **Agradecimentos**

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

A conclusão desta etapa não teria sido possível sem a colaboração, dedicação e carinho por parte de várias pessoas. Por esta razão, não posso deixar de manifestar, aqui, os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Pombo, pela forma amiga e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, e pelo estímulo sentido após cada reunião, que considero fundamental para a realização da dissertação aqui apresentada;

Agradeço, de igual forma, à minha co-orientadora Professora Especialista Teresa Baptista, que tanto me ensinou, realçando o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho, contribuindo sempre com preciosas sugestões para o enriquecimento deste estudo;

Aos meus pais quero, de uma forma imensa, expressar o meu muito obrigada pela infinita disponibilidade, por nunca me terem deixado desistir, por toda a paciência e dedicação, por todo o amor.. por tudo!

À Filipa, minha companheira de todas as horas, agradeço a amizade e apoio incondicional. Sem ela não teria sido possível.

Por último, mas não menos importante, o meu mais sincero agradecimento aos meus tão queridos colegas de trabalho, pelo forte incentivo, por nunca terem permitido que o desalento se instalasse, acreditando sempre em mim e nas minhas capacidades.



## Resumo

Os pepinos-do-mar constituem um recurso marinho economicamente importante, utilizado em determinados países como alimento *gourmet*, e também extremamente valorizado pela indústria farmacêutica em virtude do seu elevado valor medicinal. Consequentemente, a exploração deste recurso marinho tem aumentado significativamente, resultando em perturbações ao nível da sua sustentabilidade, sendo a sua produção em aquacultura uma das alternativas para combater a sobre-exploração.

Um dos principais objetivos estabelecidos para este trabalho, teve por base a aplicação de técnicas de identificação do género em *Holothuria forskali*: técnica com agulha de biópsia; técnica com aspiração; técnica com pequena incisão na zona dorsal e técnica com corte na parte anterior. As técnicas foram complementadas com a análise macro e microscópica de gónadas femininas de indivíduos selvagens capturados em diferentes estádios de maturação. A técnica através da qual se conseguiram melhores resultados foi a técnica com agulha de biópsia, tendo-se obtido uma taxa de identificação de 100%, sem ocorrência de evisceração ou mortalidade. No que diz respeito à análise macro e microscópica de gónadas, a mesma permitiu associar diferentes graus de coloração das gónadas a estádios de maturação distintos, sendo tanto mais avançado o estádio de maturação, quanto maior é o diâmetro dos oócitos e quanto mais intensa é a sua cor. No entanto, verificou-se uma exceção num dos grupos de estudo, onde as gónadas mais esbranquiçadas apresentavam oócitos com diâmetros maiores, em comparação com as gónadas cuja coloração era mais intensa, o que poderá dever-se ao facto desta gónada se encontrar num estádio imediatamente pós-desova.

No decorrer do presente trabalho, foram também abordadas duas alternativas de regimes de acondicionamento para holotúrias, monocultivo e policultivo. Este ensaio teve como objetivo verificar se o acondicionamento de *H. forskali*, em regime de policultivo com *Sparus aurata*, é uma prática viável. Para tal, foram avaliadas as taxas de mortalidade e evisceração, a variação de peso e o índice gonadossomático (IG). A taxa de mortalidade no grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo foi nula, enquanto que no grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo foi de 8%. Relativamente à taxa de evisceração, no grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo foi de 25% e no grupo de estudo mantido sob o regime policultivo foi de 33%. Verificou-se que ocorreu uma diminuição do peso médio das holotúrias, tendo sido esta menos acentuada no grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo (28,25 g). O IG dos indivíduos mantidos

em regime de monocultivo foi mais elevado ( $10,27 \pm 6,01$ ), sugerindo que este grupo reunia condições mais favoráveis para o acondicionamento da *H. forskali*, comparando com o regime de policultivo ( $7,08 \pm 5,58$ ). Este ensaio experimental permitiu concluir que, apesar do acondicionamento de *H. forskali* em regime de policultivo com *S. aurata* ser uma prática viável, necessita de alguns ajustes, visando a sua otimização de forma a obter melhores resultados, principalmente ao nível da variação do peso médio e do IG.

A adaptação dos indivíduos às condições de acondicionamento, a sua capacidade de sobrevivência em cativeiro, bem como a sua adaptação a diferentes tipos de alimento fornecido, são algumas das características que tornam a *H. forskali* numa espécie com elevado potencial para a aquacultura, podendo, desta forma, constituir uma nova espécie para introdução nesta indústria, não só em Portugal, como na Europa.

Palavras-chave: holotúrias; identificação do género; gónadas; índice gonadossomático; cultivo de equinodermes; policultivo; aquacultura.



## Abstract

Sea cucumbers are marine resources which can be economically important, as it is used as a gourmet food in some countries, as well as a product of great and significant value for the pharmaceutical industry due to its high medicinal value. In consequence, this marine resource exploration has increased substantially, leading to some disturbance considering its sustainability. Thus, the sea cucumbers production in aquaculture farming is considered as one of the alternative means to fight against its over-exploitation.

Therefore, one of the major objectives, which has been defined to the present study, was based in the application of the gender identification techniques in what concerns *Holothuria forskali*: the biopsy needle method; the aspiration method; the method consisting in a slight incision in the dorsal area and the method consisting in an incision in the animal front part. These techniques were complemented with both macroscopic and microscopic analyses of female gonads extracted from wild individuals which were caught in distinct maturation stages. It was possible to observe that it was the method by using the biopsy needle the one through which were achieved the best results. In fact, it was observed that the identification rate was 100%, without any evisceration or mortality at all. In terms of the gonads macroscopic and microscopic analyses, it has enabled the association within their different colouring degrees as well as their distinct maturation stages. Indeed, it was noted that in the more advanced maturation stage, the diameter of the oocytes increases and the colour of the gonad is more intense. However, an exception in one of the groups used in this study was observed, whitish gonads with larger oocytes when compared to those gonads with a more intense colour. This observation can be explained by the fact that the latter gonad being in a stage immediately post-spawning.

In the course of the present work, two alternatives of conditioning systems for holothurians, monoculture and polyculture were also discussed. The objective of this assay was to verify if the conditioning of *H. forskali*, in a polyculture with *Sparus aurata*, is viable. In this regard, the mortality and evisceration rates, the weight variation and the gonadosomatic index (GI) were evaluated. The mortality rate in the study group maintained under the monoculture was null, whereas in the study group maintained under the polyculture was of 8%. Regarding evisceration rate, the monoculture group was of 25% and the polyculture group was of 33%.

It was found that there was a decreasing in the medium weight of the holothurian, which was less significant in the study group that had been kept under the monoculture method (28.25 g). The GI of the individuals kept under a monoculture system was higher ( $10.27 \pm 6.01$ ), suggesting that this group had more favourable conditions for the *H. forskali* conditioning, comparing to the polyculture ( $7.08 \pm 5.58$ ). This experimental essay allowed us to conclude that, despite the fact that *H. forskali* conditioning in polyculture with *S. aurata* is a viable practice, yet it needs some adjustments in order to obtain more effective results, especially in terms of weight variation average and the GI.

The adaptation of the individuals to the conditioning conditions, as well as their capacity to survive in a captivity system, and their adaptability to different types of food provided are some of the characteristics that make *H. forskali* species with high potential for aquaculture farming and, therefore, to represent a new species for introduction in such industry, not only in Portugal, but also across Europe.

Key words: holothurians; gender identification; gonads; gonadosomatic index; echinoculture; polyculture; aquaculture.



## **Índice de Abreviaturas**

AA - Ácido araquidónico

DHA - Ácido docosahexanóico

EPA - Ácido eicosapentaenóico

IG - Índice gonadosomático

IMTA - Aquacultura multitrófica integrada

MOC - Microscópio ótico composto

RAS - Sistema de Recirculação em Aquacultura

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Anatomia interna de um pepino-do-mar comum (Adaptado de Ruppert & Barnes, 1996).....  | 3  |
| <b>Figura 2</b> - <i>H. forskali</i> , no seu ambiente natural (Fonte: <a href="http://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Holothuria-forskali-img156746.html">http://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Holothuria-forskali-img156746.html</a> ). ....  | 7  |
| <b>Figura 3</b> - <i>S. aurata</i> (Fonte: FAO, 2017).....  | 9  |
| <b>Figura 4</b> - Realização da técnica com agulha de biópsia numa holotúria, <i>H. forskali</i> . ..   | 18 |
| <b>Figura 5</b> - <i>H. forskali</i> após a realização de uma pequena incisão na zona dorsal. . ....  | 19 |
| <b>Figura 6</b> - Representação gráfica da percentagem total de indivíduos machos, fêmeas e indeterminados, identificados em cada técnica testada. ....   | 30 |
| <b>Figura 7</b> - Morfologia de uma gónada feminina (a) e masculina (b), da <i>H. forskali</i> .....  | 30 |
| <b>Figura 8</b> - <i>H. forskali</i> sujeito a um corte na zona da boca (b), totalmente recuperado, 21 dias depois da aplicação da técnica com corte na parte anterior. O indivíduo encontra-se posicionado com a parte ventral (v) e a parte posterior direita (p) voltadas para cima. ...   | 31 |
| <b>Figura 9</b> - <i>H. forskali</i> recuperado, 21 dias após a realização da técnica com pequena incisão na zona dorsal, estando este totalmente cicatrizado.....  | 31 |
| <b>Figura 10</b> - <i>H. forskali</i> após a dissecação (a) para amostragem da respetiva gónada (b).<br>.....   | 32 |
| <b>Figura 11</b> - Diâmetros médios dos oócitos ( $\mu\text{m}$ ) em cada um dos grupos em estudo, <i>H. forskali</i> A (HFA), B (HFB), C (HFC), D (HFD) e E (HFE) (média $\pm$ desvio-padrão). As barras com letras diferentes, representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste HSD de Tukey para $\alpha=0,05$ ..... | 34 |
| <b>Figura 12</b> - Diferentes estádios de maturação sexual da <i>H. forskali</i> observados. Gónadas (1) e correspondentes túbulos (2) (100 $\mu\text{m}$ ) e oócitos (3) (100 $\mu\text{m}$ ), em todos os grupos de estudo, <i>H. forskali</i> A, B, C, D e E, do estágio mais maturo (A) para o menor estágio de maturação (E). ....       | 36 |

**Figura 13** - Representação gráfica da ocorrência de mortalidade e evisceração em cada tanque experimental, em ambos os grupos de estudo, policultivo e monocultivo. ....38

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela I</b> - Correspondência entre cada grupo de estudo, <i>H. forskali</i> A, B, C, D e E, e a cor das respectivas gónadas.....  | 21 |
| <b>Tabela II</b> - Parâmetros de qualidade da água ao longo de todo o ensaio (média $\pm$ desvio padrão).....  | 29 |
| <b>Tabela III</b> – Peso húmido total (g) dos pepinos-do-mar <i>H. forskali</i> , capturados para avaliação macro e microscópica dos estádios de maturação. ....   | 32 |
| <b>Tabela IV</b> - Média dos diâmetros dos oócitos ( $\mu\text{m}$ ) de cada grupo de estudo, <i>H. forskali</i> A, B, C, D e E.....   | 33 |
| <b>Tabela V</b> - Peso húmido total dos pepinos-do-mar <i>H. forskali</i> , utilizados nos ensaios de acondicionamento (média $\pm$ desvio padrão). (*) Representa um indivíduo morto durante o período experimental. .... | 37 |
| <b>Tabela VI</b> - IG calculado para os indivíduos mantidos em policultivo e em monocultivo (média $\pm$ desvio-padrão).....   | 39 |

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| Resumo .....   | viii      |
| Abstract .....   | xi        |
| Índice de Abreviaturas .....   | xiv       |
| Índice de Figuras .....  | xv        |
| Índice de Tabelas .....  | xvii      |
| Índice .....   | xviii     |
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Introdução Geral .....   | 2         |
| 1.2 Biologia das espécies em estudo .....  | 6         |
| 1.2.1 <i>Holothuria forskali</i> .....   | 6         |
| 1.2.2 <i>Sparus aurata</i> .....   | 8         |
| 1.3 Produção de holotúrias .....   | 10        |
| 1.4 Objetivos .....  | 12        |
| <b>2. Materiais e Métodos.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1 Determinação do género em <i>H. forskali</i> .....                           | 16        |
| 2.1.1 Captura, transporte e manutenção .....                                     | 16        |
| 2.1.2 Aplicação de técnicas de identificação do género .....                     | 17        |
| 2.1.2.1 Técnica 1 - Agulha de biópsia .....                                      | 18        |
| 2.1.2.2 Técnica 2 - Aspiração .....  | 18        |
| 2.1.2.3 Técnica 3 - Pequena incisão na zona dorsal .....                         | 19        |
| 2.1.2.4 Técnica 4 - Corte na parte anterior .....                                | 19        |
| 2.2 Avaliação do estado de maturação da <i>H. forskali</i> .....                 | 20        |
| 2.2.1 Captura e transporte .....   | 20        |
| 2.2.2 Amostragem das gónadas .....   | 20        |
| 2.2.3 Análise histológica .....  | 21        |
| 2.3 Acondicionamento da <i>H. forskali</i> em policultivo e em monocultivo ..... | 22        |
| 2.3.1 Captura e transporte .....   | 22        |
| 2.3.2 Desenho experimental .....   | 22        |
| 2.3.2.1 Ensaio de Policultivo (Grupo 1): .....                                   | 23        |
| 2.3.2.2 Ensaio de Monocultivo (Grupo 2): .....                                   | 24        |
| 2.3.3 Índice Gonadossomático (IG) .....  | 24        |
| 2.4 Análise estatística .....  | 24        |
| <b>3. Resultados.....</b>  | <b>28</b> |
| 3.1 Determinação do género da <i>H. forskali</i> .....                           | 29        |
| 3.1.1 Parâmetros de qualidade da água .....                                      | 29        |
| 3.1.2 Determinação do género .....   | 29        |
| 3.2 Avaliação do estado de maturação da <i>H. forskali</i> .....                 | 32        |
| 3.3 Acondicionamento de holotúrias .....   | 37        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>4.</b>  | <b>Discussão.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Avaliação do género de indivíduos <i>H. forskali</i> .....</b>                            | <b>43</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Avaliação do estado de maturação de indivíduos <i>H. forskali</i>.....</b>                | <b>46</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Acondicionamento de holotúrias em diferentes regimes: Policultivo e Monocultivo .....</b> | <b>49</b> |
| <b>5.</b>  | <b>Conclusão.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Perspetivas Futuras .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Referências Bibliográficas .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Anexos.....</b>   | <b>74</b> |
|            | <b>Anexo I .....</b>   | <b>75</b> |
|            | <b>Anexo II.....</b>   | <b>77</b> |
|            | <b>Anexo III .....</b>   | <b>78</b> |

## **1. Introdução**

## Introdução

### 1.1 Introdução Geral

As holotúrias ou pepinos-do-mar constituem um grupo de invertebrados marinhos da classe Holothuroidea, que pertence ao filo dos Equinodermes, onde também estão inseridos os ouriços-do-mar e as estrelas-do-mar. Os pepinos-do-mar podem ser encontrados em qualquer tipo de *habitat*, em fundos de substrato rochoso ou arenoso, movendo-se lentamente através de pés ambulacrários. Dependendo da espécie, estes organismos podem habitar águas profundas ou superficiais e a sua longevidade é variável, entre 5 a 10 anos (Pangkey *et al.*, 2012).

Tipicamente, apresentam um corpo cilíndrico e alongado, muito semelhante a um pepino vegetal. Dependendo da espécie, alguns indivíduos podem atingir até 2 metros de comprimento e apresentar a mais variada combinação de cores (Purcell *et al.*, 2012). Os pepinos-do-mar são organismos filtradores e detritívoros, assumindo uma grande importância ao nível da cadeia alimentar, na medida em que participam ativamente na reciclagem dos nutrientes existentes nos fundos marinhos, através da filtração do alimento, removendo grande parte da matéria orgânica contida nos sedimentos (Sicuro & Levine, 2011; Ramofafia *et al.*, 2000). A sua principal fonte de alimento são os detritos orgânicos, podendo também alimentar-se de microrganismos zoo e fitoplanctónicos (Sicuro & Levine, 2011). Relativamente à sua fisionomia, a boca e o ânus estão localizados na parte anterior e posterior do corpo, respetivamente, sendo o aparelho bucal provido de pequenos tentáculos que circundam a cavidade oral. Os tentáculos podem variar em número, entre 10 a 30, e em forma, consoante a espécie; e captam o alimento, levando-o até à cavidade bucal (Pangkey *et al.*, 2012; Purcell *et al.*, 2012). O esqueleto é reduzido a pequenas espículas presentes no tegumento. A parede do corpo é composta por uma cutícula fina sobre a epiderme e uma derme espessa por baixo, sendo esta composta por tecido conjuntivo que envolve as espículas. No interior do corpo, encontram-se caracteristicamente 5 bandas musculares longitudinais, situadas em posição radial (Purcell *et al.*, 2012). Muitas espécies de holotúrias possuem ainda túbulos de *Cuvier*, que consistem num órgão de defesa, sendo libertados perante um predador ou outras situações de *stress* e posteriormente regenerados (Saldanha, 2003).

Todos os equinodermes têm uma grande capacidade de regeneração, inclusive no que diz respeito às gónadas e outros órgãos internos. Holotúrias das ordens Aspidochirotida e Dendrochirotida são conhecidas pelo fenómeno de evisceração como resposta a manipulação inadequada ou ataque por parte de predadores. Este fenómeno consiste na expulsão dos órgãos internos, através da parte anterior ou posterior do animal, dependendo da espécie. A ausência sazonal das vísceras também tem sido observada em algumas espécies, sugerindo a ocorrência da atrofia e subsequente absorção dos órgãos viscerais, bem como, em alguns casos, evisceração espontânea. A perda sazonal dos órgãos viscerais, seja pela sua expulsão ou absorção interna, é considerada um fenómeno normal em algumas espécies, provavelmente devido ao início de um período de inatividade em condições adversas, ou como via para eliminar resíduos armazenados em tecidos internos (Lambeth, 2000).

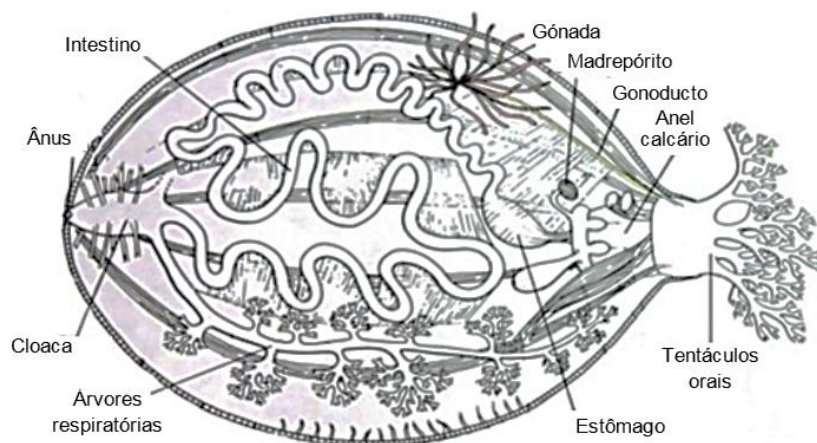


Figura 1 - Anatomia interna de um pepino-do-mar comum (Adaptado de Ruppert & Barnes, 1996).

As holotúrias são organismos dióicos, contudo não apresentam dimorfismo sexual, não sendo possível fazer a distinção entre macho e fêmea, a olho nu. A gónada está localizada dorsalmente, perto da boca e o poro genital é muito pequeno e encontra-se na parte anterior do corpo, na zona da cabeça. A maioria das espécies possui apenas um poro genital, contudo, algumas espécies apresentam 2 ou 3 poros com função de desova. Nos pepinos-do-mar, a fecundação é externa, isto é, ocorre na coluna de água, após a libertação dos gâmetas para o meio, através do poro genital (Pangkey *et al.*, 2012; Purcell *et al.*, 2012). Geralmente, e apesar de estar relacionada com

o peso corporal dos indivíduos, a fecundidade das fêmeas é muito elevada e podem produzir 1 a 2 milhões de oócitos, atingindo por vezes 10 milhões de ovos apenas numa desova. Quando as fêmeas se encontram no estágio de maturação mais avançado, existem cerca de 220 a 290 mil oócitos por grama de gónada feminina. Normalmente, as holotúrias exibem dois picos anuais de maturação das gónadas, resultando em dois eventos de desova por ano. O padrão da maturação difere entre espécies e até entre populações distintas da mesma espécie, consoante a região que habitam, devido a fatores como as diferenças na temperatura da água do mar e a disponibilidade de alimento (Pangkey *et al.*, 2012).

O ciclo de vida destes organismos é indireto, passando por várias fases larvares até atingir a fase juvenil. Assim, o seu ciclo de vida é iniciado logo após a fertilização dos oócitos, que eclodem cerca de 2 dias depois, dando origem a uma nova forma de vida designada gástrula, que evolui para o primeiro estágio larvar, auriculária. A larva auriculária, que consiste numa fase de vida móvel, permanece livre na coluna de água e, nesta fase, as larvas já se alimentam de microalgas (Chen, 2003; Pangkey *et al.*, 2012). Posteriormente, a auriculária evolui para doliolária e, mais tarde, para pentáctula. A larva pentáctula exhibe caracteristicamente 5 tentáculos orais e é neste estágio de desenvolvimento que surgem os primeiros pés ambulacrários, tonando-se numa forma de vida bentónica. É já no substrato que a pentáctula sofre a metamorfose para a fase juvenil. Inicialmente os juvenis são transparentes e vão adquirindo gradualmente características dos indivíduos adultos (Pangkey *et al.*, 2012; Purcell *et al.*, 2012). Após a fertilização, as larvas podem demorar entre 11 a 23 dias a atingir o estágio juvenil, no entanto, este período de tempo depende muito das condições ambientais (Renbo & Yuan, 2004; Pangkey *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, os pepinos-do-mar, são também conhecidos como "*trepang*" ou "*beche-de-mer*", e consumidos pelo povo chinês, especialmente nas zonas costeiras, onde são considerados uma iguaria e utilizados na medicina tradicional. Podem ser consumidos frescos ou cozinhados sob as mais variadas formas. Algumas espécies são capturadas para consumo de todo o animal, enquanto outras são capturadas apenas pelas suas gónadas ou intestinos. Do ponto de vista nutricional, são considerados um alimento bastante rico (Lambeth, 2000; Chen, 2003; Sicuro & Levine, 2011; Purcell *et al.*, 2012). Caraterizam-se, de um modo geral, por possuir um elevado teor de proteína, bem como baixo teor lipídico, sendo na sua grande maioria ácidos gordos polinsaturados e ácidos gordos essenciais (Chen, 2003; Pangkey *et al.*, 2012; Pratas *et al.*, 2014;

Chang-Lee *et al.*, 1989; Betchel *et al.*, 2012). A maioria dos produtos de pepinos-do-mar encontra-se no mercado na forma seca, embora exista nas mais variadas formas, seja fresco, salgado ou até fumado. Para além do setor alimentar, as holotúrias já são utilizadas com fins medicinais há mais de cem anos (Pangkey *et al.*, 2012). Atualmente são conhecidas inúmeras propriedades medicinais destes organismos, nomeadamente, capacidade cicatrizante, anticoagulante, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, antitumoral, anticancerígena, entre outras (Pangkey *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015). Evidências científicas mostram ainda que alguns dos compostos bioativos extraídos das holotúrias, como o sulfato de condroitina, auxiliam na redução da dor na artrite e até mesmo no processo de combate ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), juntamente com as saponinas, também presentes nos pepinos-do-mar (Chen, 2003; Sicuro & Levine, 2011; Pangkey *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015).

Desde a década de 1950, em resposta à crescente e intensa procura deste produto do mar, associada ao aumento do preço de mercado, a pesca global de holotúrias sofreu uma rápida expansão (Robinson & Lovatelli, 2015). O ritmo acelerado da pesca de pepinos-do-mar, associado à ineficiente gestão dos *stocks* de pesca, tem-se tornado insustentável, impossibilitando, em muitos casos, uma resposta de gestão eficaz, de tal modo que, atualmente, mais de metade dos *stocks* naturais são considerados empobrecidos ou sobre-explorados (Ramón *et al.*, 2010; Robinson & Lovatelli, 2015). Consequentemente, o esforço de pesca exercido sobre este recurso tem conduzido ao aumento do risco de extinção das espécies comerciais mais valiosas. Atualmente, 16 espécies estão classificadas como "vulneráveis" ou "em perigo" na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) (Robinson & Lovatelli, 2015). De facto, a gestão sustentável dos recursos naturais constitui uma ferramenta fundamental para fazer face à crescente população humana e ao consequente aumento do consumo de produtos do mar, sem comprometer a saúde dos ecossistemas. Assim, com o objetivo de gerir e conservar os *stocks* de populações naturais de pepinos-do-mar, é crucial que sejam desenvolvidos planos apropriados, tendo em conta a sua gestão e conservação (Samyn, 2000; Plagányi *et al.*, 2015). Os organismos bentónicos, cuja motilidade é limitada, são particularmente suscetíveis de captura excessiva, como acontece com os pepinos-do-mar (Plagányi *et al.*, 2015). Aspectos como o facto de atingirem a maturação sexual bastante tarde e o seu sucesso reprodutivo depender muito da densidade populacional, também as torna espécies suscetíveis de sobre-exploração (Asha & Muthiah, 2007).

O colapso dos *stocks* pesqueiros no Indo-Pacífico incentivou a exploração de novas regiões, bem como de novas espécies para satisfazer a crescente exigência do mercado. Atualmente, para o abastecimento contínuo dos mercados asiáticos, novas espécies não-alvo de pepinos-do-mar do hemisfério norte estão a ser pescadas e comercializadas, sendo já explorados em mais de 70 países (Sicuro & Levine, 2011; Robinson & Lovatelli, 2015; Santos *et al.*, 2015). Nas regiões temperadas, os pepinos-do-mar são, por vezes, capturados através de pesca de arrasto em águas profundas, mas a maioria é capturada à mão, em águas tropicais de baixa profundidade (Eriksson & Clarke, 2015). Em Portugal, as holotúrias são alvo de capturas ilegais, mas também acessórias, sendo acidentalmente capturadas através de armadilhas ou pesca de arrasto e rejeitadas pelas embarcações de pesca. Além disso, é cada vez mais frequente em alguns países asiáticos, como é o caso do Japão, capturarem holotúrias ao largo da costa portuguesa.

## **1.2 Biologia das espécies em estudo**

### **1.2.1 *Holothuria forskali***

*H. forskali* (Delle Chiaje, 1823) é um equinoderme que pertence à família Holothuriidae e à ordem Aspidochirotida. Esta espécie caracteriza-se por possuir túbulos de *Cuvier* bastante desenvolvidos, libertando-os como modo de defesa. De coloração negra ou amarelo-acastanhada, apresenta a extremidade das papilas dorsais branca e pode atingir 30 cm de comprimento (Saldanha, 2003). Relativamente ao aparelho bucal, é provido de tentáculos com terminações peltiformes, característicos da ordem Aspidochirotida. No que diz respeito à sua alimentação, é difícil apurar a preferência alimentar de holotúrias da ordem Aspidochirotida, uma vez que são detritívoras e mais propensas a depender das comunidades fúngicas e bacterianas, promovidas pela decomposição da flora e da fauna (Morgan, 2000; Purcell *et al.*, 2012).



Figura 2 – *H. forskali*, no seu ambiente natural (Fonte: <http://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Holothuria-forskali-img156746.html>).

Quanto ao habitat, a *H. forskali* surge mais frequentemente em substratos rochosos, situando-se geralmente na zona entre marés e a baixas profundidades, no infra e circalitoral, tolerando uma vasta gama de temperaturas e podendo mesmo sobreviver a longos períodos de emersão, durante a baixa-mar (Saldanha, 2003). A distribuição geográfica típica desta espécie verifica-se ao longo da costa Atlântica - Mediterrânica, podendo ser encontrada em toda a costa portuguesa. Esta espécie pode ser igualmente encontrada na Escandinávia e ilhas Britânicas estendendo-se até às ilhas Canárias e Marrocos (Tuwo & Conand, 1992).

Embora, até ao presente, os estudos debruçados sobre a biologia reprodutiva da *H. forskali* sejam escassos, os mesmos permitiram compreender alguns aspetos do seu ciclo reprodutivo, a partir dos quais se pode constatar que se reproduzem anualmente, mais especificamente no período entre abril e junho, e de forma sincronizada nos dois sexos. A reabsorção da gónada vazia estende-se até ao início da vitelogénese seguinte, sem período de repouso (Tuwo & Conand, 1992).

Tal como todos os equinodermes, as holotúrias não apresentam dimorfismo sexual. De acordo com Santos (2014b), a observação da cor dos túbulos das gónadas é a forma mais simples de avaliar o género. Quando as gónadas estão maduras, é possível verificar macroscopicamente os oócitos no interior dos túbulos, bem como o lúmen preenchido por espermatócitos maduros (Ramofafia *et al.*, 2000). As gónadas de fêmeas

maduras apresentam uma cor laranja forte e os machos, um rosa-salmão forte (Santos *et al.*, 2015).

A escala de maturação utilizada para descrever o desenvolvimento das gónadas está dividida em 5 estádios, com base na análise macroscópica da morfologia tubular. Estes estádios de maturação incluem: I – indeterminado, II – em crescimento, III – maturo, IV – parcialmente desovado e V – desovado (Shiell & Uthicke, 2006).

No que diz respeito à *H. forskali*, no estádio de desenvolvimento I (imaturo), os túbulos das gónadas são pequenos, não ramificados e nesta fase não é possível distinguir o género. O estádio de desenvolvimento II (em crescimento) é caracterizado por gónadas mais desenvolvidas relativamente ao tamanho. Os ovários e os testículos apresentam coloração cor de laranja e salmão claro, respetivamente. No estádio de maturação III (maturo), a gónada masculina apresenta grandes túbulos com ramificações adicionais e coloração salmão. Por outro lado, gónada feminina possui cor vermelho-alaranjada. O estádio IV (parcialmente desovado) é diferenciado pela presença de grandes túbulos preenchidos com gâmetas maturos, juntamente com longos túbulos vazios, na mesma gónada, para ambos os sexos. Finalmente, no estádio de desenvolvimento V (vazio), verifica-se uma redução no tamanho das gónadas, e podem ser observados túbulos vazios e encolhidos ou parcialmente absorvidos (Ramofafia *et al.*, 2003; Keshavarz *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014b).

### **1.2.2 *Sparus aurata***

A dourada, *S. aurata* (Linnaeus, 1758) é um esparídeo comercialmente importante com um elevado valor comercial associado, assumindo um papel importante em Portugal, quer na indústria da aquacultura quer na pesca tradicional. Os indivíduos desta espécie exibem caracteristicamente uma mancha negra acima do opérculo, assim como uma mancha amarelo-dourada entre os olhos, e apresentam cores acinzentada na zona dorsal e prateada na ventral (Saldanha, 2003). Esta espécie habita o andar infralitoral, na maioria das vezes, fundos rochosos e encontra-se geograficamente distribuída ao longo do Mar Mediterrâneo; na zona temperada do leste do Oceano Atlântico, podendo ser encontrada a partir das ilhas britânicas, até Cabo Verde, e em torno das Ilhas Canárias; e ocorre muito raramente no Mar Negro (Mihelakakis *et al.*, 2002, Saldanha, 2003; Colloca & Cerasi, 2005; FAO, 2017).



Figura 3 – *S. aurata* (Fonte: FAO, 2017).

Em Portugal, existe apenas em águas continentais, porém, pode surgir em diferentes tipos de *habitats* uma vez que se trata de uma espécie com capacidade eurihalina e euritérmica, ou seja, capaz de tolerar uma vasta gama de temperaturas, em ambientes marinhos ou de água salobra, como lagoas costeiras e zonas estuarinas, em particular durante as fases iniciais do seu ciclo de vida (Klaoudatos & Conides, 1996; Saldanha, 2003; Colloca & Cerasi, 2005). Contudo, é extremamente sensível a baixas temperaturas, sendo o seu limite mínimo de temperatura letal de 4 °C (Colloca & Cerasi, 2005). No que diz respeito à alimentação, a dourada é essencialmente uma espécie carnívora, alimentando-se à base de moluscos, crustáceos e peixes, no entanto, em determinadas circunstâncias pode alimentar-se de algas, constituindo, desta forma, uma espécie acessoriamente herbívora. Os indivíduos adultos apresentam um tamanho médio de cerca de 35 centímetros de comprimento, podendo atingir um tamanho máximo de 70 centímetros (FAO, 2017).

A dourada é uma das principais espécies produzidas em Aquacultura na região do Mediterrâneo. O desenvolvimento de tecnologias de cultivo desta espécie, desde a produção de alevins em maternidades até à obtenção do tamanho comercial, é um dos casos de maior sucesso na história da indústria da aquacultura. De facto, a dourada demonstrou muito rapidamente uma grande capacidade de adaptação às condições de cultivo, nos vários tipos de cultivo praticados até à atualidade (Mihelakakis *et al.*, 2002; Colloca & Cerasi, 2005; Valente *et al.*, 2011). Os indivíduos podem, então, ser cultivados sob vários regimes, métodos extensivos e semi-intensivos, em instalações terrestres ou em gaiolas em mar aberto, com sistemas de produção intensiva. Em aquacultura, os indivíduos atingem o tamanho comercial, cerca de 350 a 400 g, em apenas 16 meses, contudo, o rápido desenvolvimento da sua produção, levou ao declínio dos preços,

tornando-se numa indústria com elevados volumes de produção associados a reduzidas margens de lucro. O preço da dourada à saída da exploração diminuiu em cerca de 60% entre 1990 e 2000 e continua a diminuir, o que levou ao desenvolvimento de algumas estratégias para a produção de dourada com maior rentabilidade. Uma destas estratégias é o cultivo integrado com outras de espécies, podendo ser peixes, crustáceos, algas ou equinodermes, de modo a aumentar a rentabilidade das instalações (Colloca & Cerasi, 2005; Dimitriou *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012).

### **1.3 Produção de holotúrias**

O cultivo de holotúrias não está desenvolvido na Europa, embora os conhecimentos já adquiridos no âmbito da biologia destes organismos tenham permitido o desenvolvimento de técnicas de cultivo aquícola, sobretudo na Austrália e no continente asiático, onde são geralmente consumidos (Bell *et al.*, 2007).

A aquacultura é, assim, uma permanente solução para a sobre-exploração dos *stocks* naturais de pepinos-do-mar, permitindo combater o declínio das populações selvagens através do repovoamento e, simultaneamente, satisfazer as necessidades do mercado mundial, abrangendo múltiplos setores como as indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética (Giraspy & Walsalam, 2010; Sicuro & Levine, 2011). O elevado valor comercial dos pepinos-do-mar também tem incentivado o desenvolvimento da aquacultura destes organismos, principalmente no que diz respeito às espécies mais valiosas (Sicuro & Levine, 2011).

Os primeiros países a produzir pepinos-do-mar foram a China e o Japão. Atualmente, também a Índia, Austrália, Ilhas Maldivas, Ilhas Salomão e Indonésia contribuem para a produção global de pepinos-do-mar. Contudo, o mercado internacional de comércio de holotúrias é controlado essencialmente por Hong Kong, Singapura e Taiwan, sendo a China o maior produtor a nível mundial e onde a produção de pepinos-do-mar é uma importante indústria (Samyn, 2000; Sicuro & Levine, 2011; Pangkey *et al.*, 2012).

Em determinados países, especialmente na China, as zonas viáveis para a prática do cultivo de pepinos-do-mar são muito escassas, sendo este um fator limitativo para o desenvolvimento da aquacultura destes organismos. Para além disso, os estudos

detalhados com base no cultivo de holotúrias, especialmente no que diz respeito ao cultivo intensivo, são muito escassos. De um modo geral, o seu cultivo é realizado em duas fases que consistem, primeiramente, na produção de larvas e juvenis em maternidades, seguida da fase de engorda (Pangkey *et al.*, 2012).

As holotúrias são excelentes candidatas à integração em regimes de policultivo, bem como regimes de aquacultura multitrófica integrada (IMTA) (Robinson & Lovatelli, 2015). Uma vez que são organismos detritívoros, as holotúrias assumem grande relevância em termos ecológicos, sendo responsáveis pela reciclagem de cerca de 90% da biomassa dos fundos marinhos, contribuindo deste modo, para a oxigenação dos sedimentos (Bell *et al.*, 2007). Assim, tornam-se espécies muito atrativas para a aquacultura integrada com o cultivo de várias espécies de diferentes níveis tróficos, permitindo aumentar a sustentabilidade dos cultivos. IMTA consiste num sistema de produção de espécies aquícolas, associado a outros sistemas de produção, aquícolas ou não. Os subsistemas de cultivo, por exemplo peixes, produção agrícola, pecuária, espécies aquícolas detritívoras ou filtradoras, encontram-se interligados na medida em que os subprodutos e/ou resíduos de um subsistema resultam em importantes *inputs* de nutrientes noutro subsistema, existindo, desta forma, um maior aproveitamento da área e dos recursos hídricos de uma exploração. Consequentemente, estes sistemas resultam numa produção máxima, com custos mínimos de produção (Rahman *et al.*, 1992). IMTA pode envolver apenas o cultivo integrado de espécies de peixes, em simultâneo com espécies aquícolas, que se alimentam dos detritos resultantes deste cultivo (fezes e restos de alimento não utilizado pelos peixes). As espécies passíveis de integrar este tipo de cultivos são essencialmente espécies comercialmente viáveis de invertebrados marinhos ou algas, que se alimentam dos detritos resultantes do cultivo tradicional de peixes, utilizando-os como fonte de alimento (Nelson *et al.*, 2012; Hannah *et al.*, 2013).

A utilização destes resíduos constitui uma boa solução para a diminuição do impacto ambiental resultante dos sistemas de aquacultura abertos. Estas descargas, tanto de matéria orgânica como inorgânica, causam um impacto ambiental negativo, o qual pode resultar na sedimentação destes detritos nas proximidades de explorações agrícolas, na sobrecarga de nutrientes na coluna de água, que podem conduzir ao aumento da ocorrência de *blooms* algais nocivos e podem ainda resultar na origem de fundos anóxicos que, por sua vez, podem conduzir à eliminação da fauna nesse local. Além disso, se for comprovado que a produção aquícola conseguida através deste tipo de sistemas é menos prejudicial para o ambiente do que os cultivos tradicionais, os produtos resultantes podem

ser considerados “*ecofriendly*” (Nelson *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2015). Desta forma, os cultivos multitróficos integrados potenciam o aumento da sustentabilidade económica e ambiental, reduzindo a produção de resíduos e aumentando a diversidade de produtos (Hannah *et al.*, 2013).

Na China, os sistemas IMTA têm sido praticados desde há séculos e, atualmente, estão a ser praticados na América do Norte e do Sul (Canadá e Chile), África do Sul e Europa (Espanha, Portugal, França, Noruega, Reino Unido) embora, na maioria dos casos, seja numa escala piloto ou na sequência da realização de investigação (Alexander *et al.*, 2015). Uma vez que as holotúrias se alimentam essencialmente em substratos ricos em matéria orgânica, incluindo resíduos produzidos por outras espécies, a sua integração em regimes de policultivo ou em sistemas IMTA é uma alternativa muito viável para a produção destes organismos. Com vista à obtenção de maior rendimento económico, e de modo a satisfazer a emergência de novos mercados, têm sido implementadas novas metodologias que consistem em adicionar aos cultivos componentes, como as algas, que possuem valor comercial e pouco ou nenhum custo de produção adicional associado (Alexander *et al.*, 2015). Muitos estudos têm abordado sistemas de cultivo integrado de pepinos-do-mar com camarão, mexilhão ou ostras; e até aplicações relacionadas com a capacidade de biorremediação dos pepinos-do-mar. A sua capacidade de biorremediação está relacionada com o facto de serem organismos bentónicos e pelo facto de estudos precedentes terem demonstrado a presença de concentrações significativas de chumbo e mercúrio, para além dos limites aceitáveis para estes organismos, podendo estes, efetivamente, ser utilizados como bioindicadores para monitorizar a presença de metais pesados e outros tipos de contaminação presentes nos ecossistemas marinhos (Sicuro & Levine, 2011; Wang *et al.*, 2015a; Wang *et al.*, 2015b).

#### **1.4 Objetivos**

Atualmente, muito pouco se conhece sobre o pepino-do-mar *H. forskali*, pelo que o presente trabalho teve como principal objetivo a obtenção de novos conhecimentos sobre esta espécie, de forma a proporcionar informação determinante, essencialmente ao nível da sua biologia reprodutiva, e contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias de acondicionamento para reprodutores.

Assim como nas restantes espécies de holotúrias, não existe dimorfismo sexual, sendo a identificação do género dos indivíduos, uma ferramenta fundamental para o manejo de reprodutores em aquacultura. Um dos objetivos deste trabalho consistiu na aplicação de várias técnicas de identificação do género em *H. forskali*. Pretendeu-se ainda realizar a análise macro e microscópica de gónadas femininas desta espécie em vários estádios de desenvolvimento, de modo a avaliar o seu estádio de maturação.

O segundo objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do acondicionamento da *H. forskali* em monocultivo e policultivo. Procedeu-se à avaliação das taxas de mortalidade e evisceração, variação do peso médio e índice gonadossomático, sob estas duas diferentes condições de acondicionamento.



## **2. Materiais e Métodos**

## **Materiais e Métodos**

### **2.1 Determinação do género em *H. forskali***

#### **2.1.1 Captura, transporte e manutenção**

Os indivíduos *H. forskali* foram amostrados na zona intertidal, na praia do Quebrado, (39° 22.0263' N; 9° 22.43292' O), em Peniche (Portugal), durante a maré baixa. Um total de 80 indivíduos foram capturados manualmente e transportados para o laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Instituto Politécnico de Leiria), em arcas isotérmicas revestidas com sacos de plástico, para evitar a adesão à superfície.

Após a chegada ao laboratório, os indivíduos foram acondicionados e distribuídos aleatoriamente, em grupos de 10, em dois sistemas de recirculação de 4 tanques de 60 L cada. Todos os tanques continham substrato de areia com cerca de 2 cm de altura (Robinson *et al.*, 2013) e arejamento, para além de filtração biológica, um escumador (Bubble Magus C3.5, China) e sistema de refrigeração (FRIMAR 300, Portugal). Os parâmetros de qualidade da água: pH, amónia, nitritos, salinidade, oxigénio dissolvido e temperatura foram mantidos constantes e dentro dos limites adequados para a espécie (Takahashi & Sutherland, 2013). Deste modo, todos os parâmetros foram medidos e controlados diariamente, sendo o oxigénio dissolvido medido com um oxímetro (Oxímetro INNOVAQUA, Espanha) e a salinidade com um refratómetro (Refratómetro de Salinidade SHR – 10ATC, Soma Fish, Brasil). Os restantes parâmetros, tais como pH, amónia e nitritos foram medidos com testes rápidos (High Range pH Test Kit, Ammonia Test Kit e Nitrite Test Kit, respetivamente, API Test Kits, Mars Fishcare, América do Norte).

Ao longo do ensaio, as holotúrias foram alimentadas diariamente, com uma mistura de quatro microalgas: *Tetraselmis suecica*, *Clorella* sp, *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* (Ivy & Giraspy 2006), na mesma proporção, numa concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^5$  célmL<sup>-1</sup> (Battaglione *et al.*, 2002).

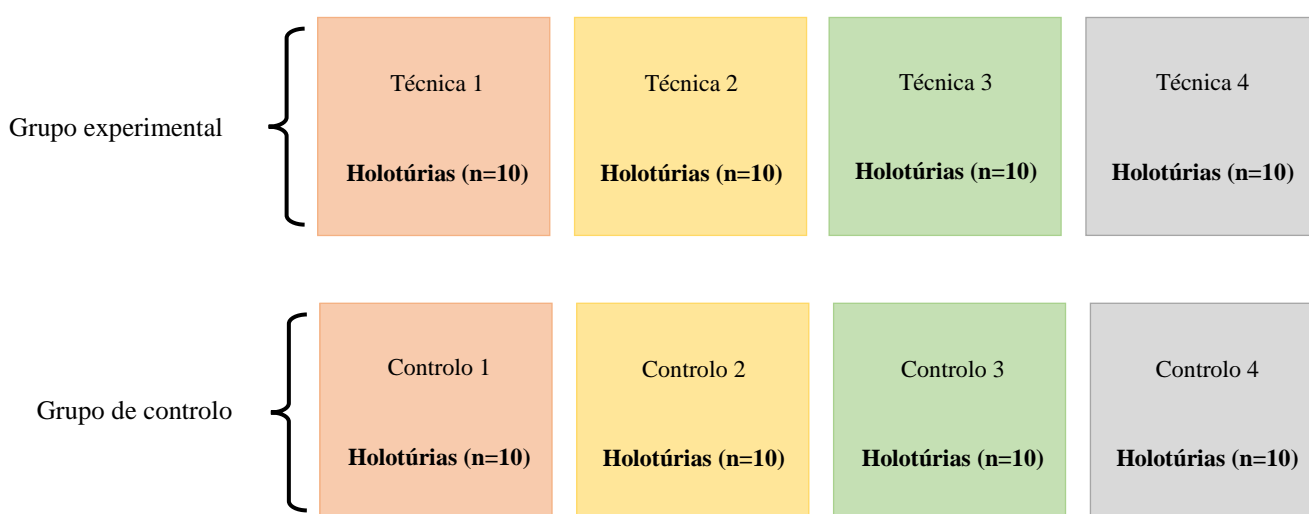
## 2.1.2 Aplicação de técnicas de identificação do género

No presente ensaio foram testadas quatro técnicas diferentes, sendo utilizados 10 indivíduos por técnica, e um grupo controlo, no qual os organismos não foram sujeitos a qualquer tipo de manipulação.

A aplicação das técnicas de identificação do género foi realizada após um período de sete dias de aclimação dos indivíduos. Uma vez sujeitos à aplicação das técnicas de identificação do género, todos os indivíduos foram devolvidos ao respetivo tanque experimental e mantidos em recuperação durante 21 dias, sem qualquer tipo de manipulação. Durante este período, o fornecimento de alimento foi efetuado normalmente e a mortalidade e a evisceração foram monitorizadas diariamente. Nos casos em que se verificou a ocorrência do fenómeno de evisceração, as gónadas foram amostradas para determinação do seu estágio de maturação (Ramofafia *et al.*, 2003; Keshavarz *et al.*, 2012).

O período experimental decorreu entre junho e julho e os indivíduos foram observados 21 dias após a aplicação das técnicas de identificação do género para avaliar a sua recuperação e cicatrização.

O desenho experimental das técnicas de identificação do género está esquematizado em baixo, as técnicas serão explicadas detalhadamente nos subcapítulos seguintes.



### 2.1.2.1 Técnica 1 - Agulha de biópsia

A primeira técnica teve por base estudos realizados por dois autores, Battaglione (1999) e Morgan (2000), com a utilização de uma agulha de biópsia. Como é possível observar na figura 4, para a aplicação desta técnica, 10 indivíduos do primeiro grupo experimental foram colocados numa superfície plana e a agulha foi inserida com um ângulo de 45 ° para a esquerda da linha média dorsal, a aproximadamente um terço do comprimento do corpo, a partir da parte anterior do animal, de modo a encontrar a gónada. Depois de detetada a gónada, recolheu-se uma pequena porção de gâmetas, colocou-se numa lâmina e, de seguida, determinou-se o género dos indivíduos por observação ao MOC (Leica DM 2000 LED, Alemanha).



Figura 4 – Realização da técnica com agulha de biópsia numa holotúria, *H. forskali*.

### 2.1.2.2 Técnica 2 - Aspiração

A técnica com aspiração foi baseada em estudos precedentes, realizados por Battaglione (1999) e Al-Rashdi *et al.*, (2007). Cada um dos indivíduos do segundo grupo experimental foi comprimido com as mãos, na zona ventral, de modo a deslocar todos os órgãos para a parte anterior do corpo. De seguida, foi inserida uma pipeta de *Pasteur* na cavidade oral, de modo a tentar captar uma parte da gónada, determinando-se o género através de observação macroscópica. Relativamente aos indivíduos que suscitaram dúvidas na identificação do género, foi realizada uma preparação a fresco com a porção

de gónada recolhida e foi observada ao microscópio ótico composto (Leica DM 2000 LED, Alemanha).

### 2.1.2.3 Técnica 3 - Pequena incisão na zona dorsal

A terceira técnica foi baseada nas técnicas descritas por Menton & Eisen (1973) e Yanagisawa (1998), tendo por base a realização de uma pequena incisão na zona dorsal do corpo dos indivíduos. Cada um dos 10 indivíduos do terceiro grupo experimental foi colocado sobre uma superfície plana e sujeito a um pequeno corte no tegumento com um bisturi, tal como se pode observar na figura 5. Uma vez realizada a incisão, foi introduzida uma pipeta de *Pasteur* na abertura, para obtenção de uma porção da gónada, sendo identificado o género macroscopicamente. No que diz respeito aos indivíduos nos quais não foi encontrada a gónada, foi realizada uma preparação a fresco com o conteúdo recolhido com a pipeta de *Pasteur* e foi examinada ao MOC (Leica DM 2000 LED, Alemanha).



Figura 5 – *H. forskali* após a realização de uma pequena incisão na zona dorsal.

### 2.1.2.4 Técnica 4 - Corte na parte anterior

Esta última técnica foi baseada em estudos precedentes (Menton & Eisen, 1973; Yanagisawa, 1998; Battaglione, 1999), consistindo na realização de um pequeno corte na extremidade anterior do corpo, na zona da boca dos indivíduos, com o auxílio de uma tesoura. Esta técnica proporciona uma maior área de abertura para a recolha de uma porção da gónada. Após o corte, foi inserida uma pipeta de *Pasteur* na área exposta, de modo a conseguir aspirar parte da gónada e recolher uma amostra, com recurso a uma

pinça. Assim como na técnica anterior, os túbulos de gónada recolhidos permitiram, de imediato, identificar o género e nos indivíduos em que não foi encontrada a gónada foi feito um exame microscópico (Leica DM 2000 LED, Alemanha) dos fluídos recolhidos com a pipeta de *Pasteur*.

## **2.2 Avaliação do estado de maturação da *H. forskali***

Foi observado o estado de desenvolvimento das gónadas de 45 fêmeas *H. forskali* através de observações macro e microscópicas. Esta abordagem permitiu observar e associar diferentes graus de coloração das gónadas a diferentes estádios de maturação (Shiell & Uthicke, 2006), tendo sido complementada com a análise e observações microscópicas dos gâmetas, através de preparações histológicas das gónadas.

### **2.2.1 Captura e transporte**

O período experimental decorreu durante 9 meses, tendo sido realizadas capturas mensais na zona intertidal (39° 22.0263' N; 9° 22.43292' O).

Os indivíduos foram transportados para o laboratório em arcas isotérmicas, tendo em atenção a manutenção da temperatura e da salinidade, bem como uma manipulação cuidadosa (Battaglione, 1999), de forma a induzir o mínimo *stress* possível e evitar a consequente evisceração dos indivíduos.






### **2.2.2 Amostragem das gónadas**

À chegada ao laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Instituto Politécnico de Leiria), todos os organismos foram pesados (g), individualmente, numa balança analítica (ADAM PGL Precision Balance NDPGL4001, EUA) e, posteriormente, sacrificados com um corte longitudinal ao longo de todo o corpo, com o objetivo de remover a gónada.

Mensalmente, foram analisadas um total de 5 fêmeas e respetivas gónadas, sendo as gónadas imediatamente identificadas e colocadas em placas de *Petri* com formol tamponado a 10%, e fotografadas a fresco com uma máquina fotográfica (Canon PowerShot G5, Japão).

As gónadas foram agrupadas em 5 grupos de acordo com a sua tonalidade, de modo a obter a divisão das amostras segundo uma gradação de cor (Shiell & Uthicke, 2006). Os grupos foram denominados de *H. forskali* A, B, C, D e E, sendo que o grupo *H. forskali* A correspondia ao tom laranja mais vivo e intenso, e o grupo *H. forskali* E às gónadas mais esbranquiçadas, com menor intensidade de cor, tal como se encontra representado na tabela I.

Tabela I – Correspondência entre cada grupo de estudo, *H. forskali* A, B, C, D e E, e a cor das respetivas gónadas.

|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>H. forskali</i> A |  |
| <i>H. forskali</i> B |  |
| <i>H. forskali</i> C |  |
| <i>H. forskali</i> D |  |
| <i>H. forskali</i> E |  |

De cada um dos 5 grupos descritos anteriormente, foram examinadas 5 gónadas, tendo sido analisadas um total de 25 gónadas que foram observadas à lupa binocular (Leica M125, Alemanha) e fotografadas com uma máquina digital (Leica MC170 HD, Alemanha) adjacente à lupa, de modo a realizar observações dos túbulos das gónadas.

### 2.2.3 Análise histológica

As amostras colocadas em formol tamponado a 10% foram sujeitas a um programa de desidratação e inclusão em parafina, num processador de tecidos (Leica TP1020, Alemanha) (Anexo I). No final deste processo, realizaram-se blocos de parafina, a partir dos quais se efetuaram cortes histológicos. Foram realizados 5 cortes histológicos para cada gónada, num micrótomo (Sakura Accu – cut SRM 200, Japão), com uma espessura entre 5 e 8 µm.

As preparações obtidas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (Anexo II) e, posteriormente, observadas ao MOC (Leica DM 2000 LED, Alemanha) e fotografadas com uma máquina digital (Leica MC170 HD, Alemanha), para medição do diâmetro dos oócitos (*Software* LAS V4.4, Alemanha), utilizando uma ampliação de 100x. Por cada

preparação histológica foram registadas 5 medições, tendo sido medido o diâmetro de um total de 25 oócitos por indivíduo.

As observações dos túbulos das gónadas e o registo das medições do diâmetro dos oócitos foram realizadas com o objetivo de distinguir diferentes estádios de maturação.

## **2.3 Acondicionamento da *H. forskali* em policultivo e em monocultivo**

### **2.3.1 Captura e transporte**

Para a realização do trabalho experimental, foi realizada uma amostragem de um total de 24 indivíduos *H. forskali*, capturados na costa de Peniche (39° 21.2235' N; 9° 23.31534' O). Também, neste caso, os indivíduos foram cuidadosamente manipulados e transportados em arcas isotérmicas até ao laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Instituto Politécnico de Leiria), com manutenção da temperatura e da salinidade constantes, de forma a evitar o fenómeno de evisceração (Battaglione, 1999).

Após a chegada ao laboratório, foi realizada a pesagem individual de todos os indivíduos amostrados (Peso médio = 127,10±27,03 g), numa balança analítica (ADAM PGL Precision Balance NDPGL4001, EUA).

### **2.3.2 Desenho experimental**

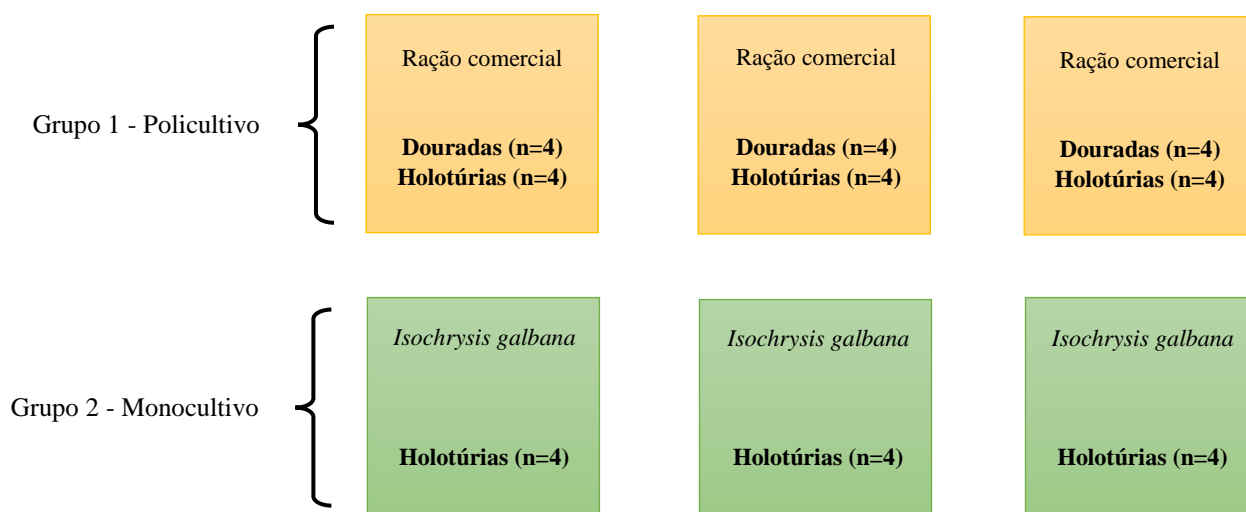
Para a realização do ensaio, e de forma a conseguir uma distribuição dos indivíduos pelos tanques experimentais, com a garantia de obter um rácio macho:fêmea de 1:1, em cada tanque, foi utilizada a técnica com agulha de biópsia descrita no ponto 2.1.2.1, para identificação do género de todos os indivíduos (Battaglione, 1999; Morgan, 2000). Seguidamente, os 24 indivíduos selvagens foram distribuídos em grupos de 4, por 6 tanques de 60 L, onde cada tanque continha 2 machos e 2 fêmeas (rácio 1:1).

Todos os tanques experimentais continham substrato de areia com cerca de 2 cm de altura (Robinson *et al.*, 2013) e fonte de arejamento, para além de um mecanismo de filtração biológica, um escumador (Bubble Magus C3.5, China) e sistema de refrigeração (FRIMAR 300, Portugal), constituindo um sistema de recirculação (RAS). Relativamente aos parâmetros de qualidade da água, foram diariamente monitorizados e mantidos

constantes, dentro dos limites adequados para ambas as espécies de estudo (Takahashi & Sutherland, 2013). A salinidade foi medida com um refratômetro (Refratômetro de Salinidade SHR – 10ATC, Soma Fish, Brasil) e o oxigênio dissolvido com um oxímetro (Oxímetro INNOVAQUA, Espanha). Os restantes parâmetros, pH, amónia e nitritos, foram medidos com testes rápidos (High Range pH Test Kit, Ammonia Test Kit e Nitrite Test Kit, respetivamente, API Test Kits, Mars Fishcare, América do Norte).

O ensaio realizou-se em triplicado, tal como descrito no desenho experimental em baixo, e ao longo de todo o ensaio foram monitorizados e registados todos os eventos de mortalidade e evisceração, para além do registo do peso médio de holotúrias, no início e no final do referido ensaio.

Os indivíduos permaneceram acondicionados durante um período de 3 meses. No final dos ensaios foram calculadas as taxas de sobrevivência e evisceração, bem como o índice gonadossomático (IG) e a variação do peso médio dos indivíduos.



### 2.3.2.1 Ensaio de Policultivo (Grupo 1):

Cada tanque experimental continha 4 holotúrias *H. forskali*, e 4 douradas *S. aurata*. Foi utilizada uma densidade de aproximadamente 3 Kg/m<sup>3</sup> relativamente às douradas, e de 8,5 Kg/m<sup>3</sup> no que diz respeito às holotúrias (Canario *et al.*, 1998).

Assim como as holotúrias, também todas as douradas foram pesadas numa balança analítica (ADAM PGL Precision Balance NDPGL4001, EUA) e medidas antes de serem inseridas nos tanques experimentais. O alimento fornecido foi ração comercial para

dourada (Sparos Lda., Olhão, Portugal), e a taxa de alimentação diária aplicada foi de 3% do peso corporal (Mihelakakis *et al.*, 2002), fornecida repartidamente, duas vezes ao dia. As holotúrias alimentaram-se essencialmente dos detritos existentes no sistema, resultantes de restos de alimento ou da excreção dos peixes.

### 2.3.2.2 Ensaio de Monocultivo (Grupo 2):

Para a execução deste ensaio, 4 indivíduos *H. forskali* foram colocados em tanques de 60 L. O alimento, constituído pela microalga *Isochrysis galbana* (Brown *et al.*, 1997; Brown, 2002; Asha & Muthiah, 2006), foi fornecido duas vezes ao dia, numa concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^5$  célmL<sup>-1</sup> (Battaglione, 2002).

### 2.3.3 Índice Gonadossomático (IG)

Uma vez terminado o ensaio, todos os indivíduos e respetivas gónadas foram pesados numa balança analítica (ADAM PGL Precision Balance NDPGL4001, EUA). Posteriormente, foram calculados os IG individuais, com base na seguinte equação matemática (Benítez-Villalobos *et al.*, 2013):

$$IG = \frac{Pgónada}{Ptotal - Pgónada} \times 100$$

onde,

Pgónada = Peso da gónada (g);

Ptotal = Peso total do indivíduo (g), incluindo as vísceras e a gónada.

## 2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos no presente trabalho foram analisados, de modo a avaliar as diferenças entre os diferentes grupos de estudo. Todos os cálculos foram realizados através *software* IBM Statistics 22, sendo que os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância de 0,05 (isto é, sempre que  $p\text{-value} < 0,05$ ). Sempre que aplicável, os resultados são apresentados na forma média  $\pm$  desvio-padrão (SD) (Zar, 2010; Marôco, 2014).

De modo a testar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros médios dos oócitos dos grupos em estudo, que correspondem a diferentes estágios de maturação, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que não se verificou o pressuposto da normalidade de dados num dos grupos de estudo de modo a ser possível utilizar uma Análise de Variância, um fator (*One-Way ANOVA*) (Zar, 2010). Posteriormente utilizou-se o teste de Tukey HSD com o objetivo de verificar quais os grupos de estudo que diferem significativamente entre si (Marôco, 2014).

De forma a avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre o peso inicial e o peso final do grupo de estudo mantido em policultivo, realizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon, uma vez que não se verificou o pressuposto da normalidade num dos grupos em estudo.

Relativamente ao grupo de estudo mantido em monocultivo, para avaliar diferenças estatisticamente significativas entre os pesos inicial e final realizou-se o teste *t-student*, uma vez verificados os pressupostos (Marôco, 2014).

No que diz respeito às diferenças estatisticamente significativas entre os pesos médios iniciais de ambos os grupos de estudo, policultivo e monocultivo, recorreu-se ao teste paramétrico *t-student* com correção de Welch para verificar a existência de diferenças, uma vez que não se verificou o pressuposto da homogeneidade de variâncias ( $F_{(21)}=4,94$ ;  $p=0,037$ ) (Marôco, 2014).

De modo a verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os pesos médios finais de ambos os grupos de estudo, policultivo e o monocultivo, realizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney, uma vez que não se verificou o pressuposto da normalidade num dos grupos em estudo.

A fim de verificar se existem diferenças estatisticamente significativas ao nível do índice gonadosomático (IG) entre os grupos de estudo, monocultivo e policultivo, realizou-se o teste *t-student* para amostras independentes. Para tal, todos os pressupostos inerentes à realização deste teste (normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias associadas) foram devidamente validados (Zar, 2010).

Seguidamente, com o objetivo de testar se existem diferenças estatisticamente significativas entre o IG de machos e fêmeas mantidos sob o regime de policultivo, recorreu-se ao teste paramétrico *t-student* com correção de Welch, uma vez que não se verificou o pressuposto da homogeneidade de variâncias ( $F_{(5)}=12,20$ ;  $p=0,017$ ).

De modo a verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre o IG de machos e fêmeas pertencentes ao grupo de estudo mantido sob o regime de

monocultivo, realizou-se o teste *t-student* para amostras independentes. Para tal, todos os pressupostos inerentes à realização deste teste foram validados (Marôco, 2014).

Com a finalidade de verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre o IG das fêmeas de ambos os grupos de estudo e entre os machos de ambos os grupos de estudo, policultivo e monocultivo, realizou-se o teste *t-student* para amostras independentes, depois de devidamente validados todos os pressupostos inerentes à realização deste teste (Zar, 2010; Marôco, 2014).



### **3. Resultados**

## Resultados

### 3.1 Determinação do género da *H. forskali*

#### 3.1.1 Parâmetros de qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorizados ao longo do ensaio e encontram-se resumidos na tabela II. A temperatura foi mantida a  $19\pm 1$  °C, a salinidade a  $33\pm 1$  e o oxigénio dissolvido manteve-se a  $6,5\pm 0,7$  mgL<sup>-1</sup>, em todos os tanques experimentais.

Tabela II - Parâmetros de qualidade da água ao longo de todo o ensaio (média  $\pm$  desvio padrão).

| Parâmetro                 | Valores                        |
|---------------------------|--------------------------------|
| pH                        | $8\pm 1$                       |
| Amónia                    | $0\geq 0,25$ mgL <sup>-1</sup> |
| Nitritos                  | $0\geq 0,25$ mgL <sup>-1</sup> |
| Salinidade                | $33\pm 1$                      |
| O <sub>2</sub> dissolvido | $6,5\pm 0,7$ mgL <sup>-1</sup> |
| Temperatura               | $19\pm 1$ °C                   |

#### 3.1.2 Determinação do género

Os resultados obtidos para as diferentes técnicas testadas, no que diz respeito à determinação do género, estão representados graficamente na figura 6.

Na técnica com agulha de biópsia, foram identificadas seis fêmeas e quatro machos. Na técnica com aspiração, foram distinguidos três machos e uma fêmea, sendo que nos seis indivíduos restantes não foi possível determinar o género. Na técnica com pequena incisão na zona dorsal, foram identificados um macho e três fêmeas e, à semelhança do verificado na segunda técnica, em seis indivíduos não foi possível determinar o género. Por fim, na técnica com corte na parte anterior, sete holotúrias foram identificadas como machos e nas três restantes, não foi possível determinar o género.

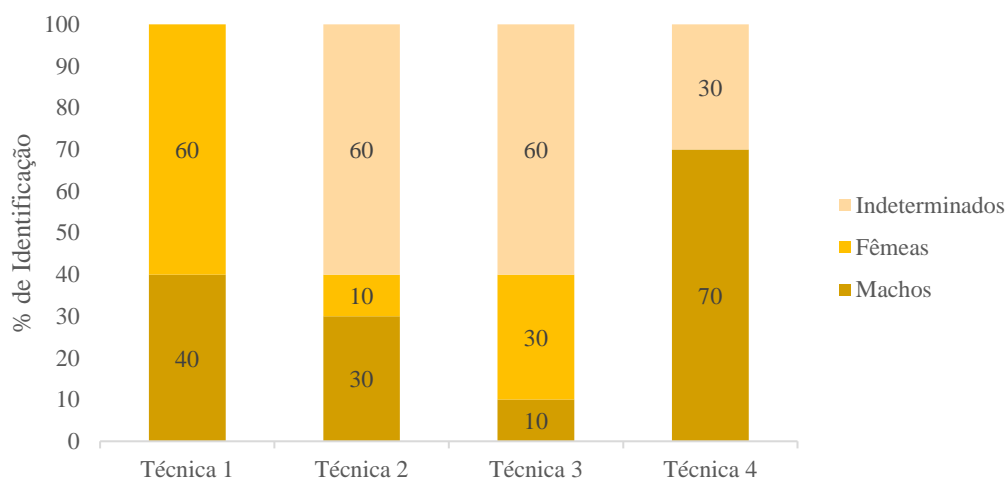


Figura 6 – Representação gráfica da percentagem total de indivíduos machos, fêmeas e indeterminados, identificados em cada técnica testada.

Não foi registada mortalidade nem evisceração nas técnicas com agulha de biópsia, com pequena incisão na zona dorsal e com corte na parte anterior. Já na técnica com aspiração, verificou-se a ocorrência de ambas, evisceração (30%) e mortalidade (20%).

As gónadas evisceradas foram alvo de análise, tendo sido possível determinar através da análise macroscópica, que duas destas gónadas, apresentadas na figura 7, uma pertencente a uma fêmea e outra a um macho, se encontravam no estágio de maturação III – maturo.

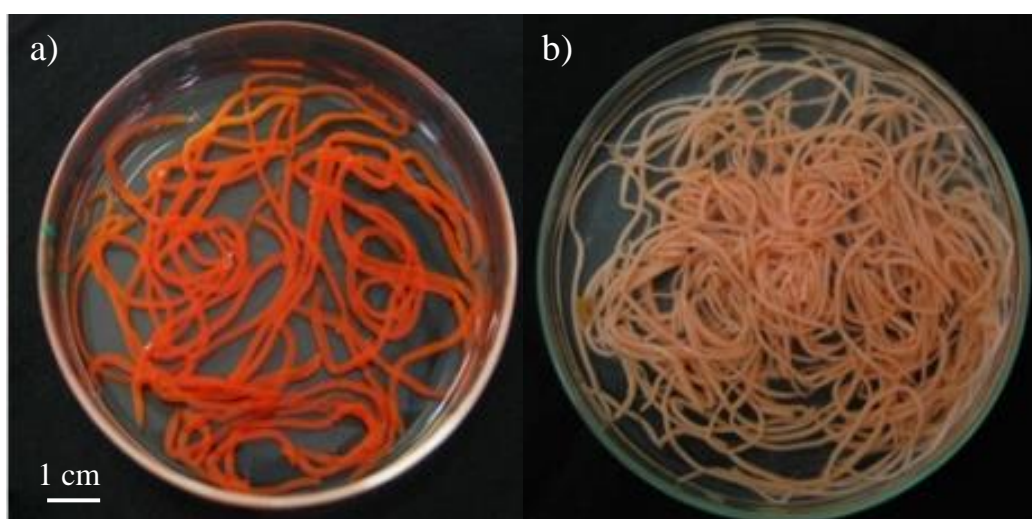


Figura 7 – Morfologia de uma gónada feminina (a) e masculina (b), da *H. forskali*.

Devido ao facto de serem as técnicas menos invasivas, a aplicação das técnicas com agulha de biópsia e aspiração não resultou em quaisquer alterações no corpo dos indivíduos, pelo que estes permaneceram sem qualquer sinal da sua aplicação.



Figura 8 – *H. forskali* sujeito a um corte na zona da boca (b), totalmente recuperado, 21 dias depois da aplicação da técnica com corte na parte anterior. O indivíduo encontra-se posicionado com a parte ventral (v) e a parte posterior direita (p) voltadas para cima.

Relativamente às técnicas com pequena incisão na zona dorsal e com corte na parte anterior, todos os indivíduos recuperaram e evidenciaram uma cicatrização total do corte feito, 21 dias após a sua aplicação, não sendo possível observar quaisquer sinais da incisão realizada, tal como se pode verificar através das figuras 8 e 9.



Figura 9 – *H. forskali* recuperado, 21 dias após a realização da técnica com pequena incisão na zona dorsal, estando este totalmente cicatrizado.

### 3.2 Avaliação do estado de maturação da *H. forskali*

Após a amostragem das gónadas, como se pode observar na figura 10, estas foram organizadas em 5 grupos de acordo com o seu grau de coloração, sendo *H. forskali* A o grupo de estudo correspondente ao estágio de maturação mais avançado e *H. forskali* E, o grupo que se encontrava no estágio de maturação menos avançado.

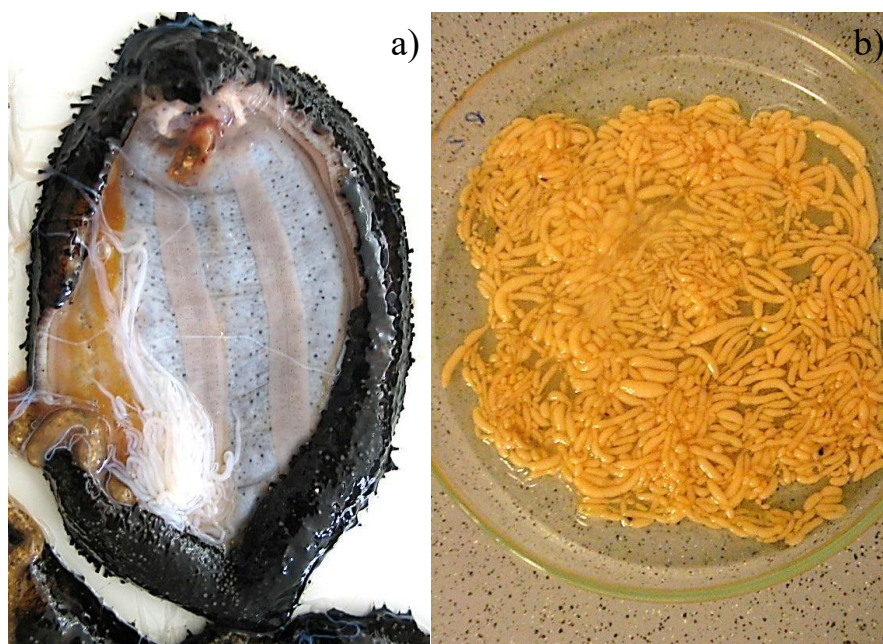


Figura 10 – *H. forskali* após a dissecação (a) para amostragem da respetiva gónada (b).

O peso húmido inicial de todos os indivíduos foi devidamente registado e encontra-se descrito na tabela III.

Tabela III – Peso húmido total (g) dos pepinos-do-mar *H. forskali*, capturados para avaliação macro e microscópica dos estádios de maturação.

|                       | <i>H. forskali</i> A | <i>H. forskali</i> B | <i>H. forskali</i> C | <i>H. forskali</i> D | <i>H. forskali</i> E |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                       | 316,29               | 108,57               | 216,04               | 278,67               | 303,23               |
|                       | 207,08               | 118,83               | 244,54               | 275,71               | 206,02               |
|                       | 166,66               | 171,70               | 258,66               | 226,30               | 235,90               |
|                       | 158,38               | 109,61               | 159,93               | 197,28               | 197,30               |
|                       | 133,33               | 257,22               | 286,26               | 289,14               | 147,27               |
| Média ± desvio padrão | 196,35±72,10         | 153,19±63,71         | 233,09±48,10         | 253,42±39,68         | 217,94±57,36         |

Como se pode observar através da tabela IV, as médias dos diâmetros dos oócitos dos 5 grupos em estudo, *H. forskali* A, B, C, D e E, variam entre  $88,63 \pm 14,83$  e  $131,49 \pm 14,56$   $\mu\text{m}$ , sendo o grupo A o que apresenta a média significativamente mais elevada e o grupo D o que corresponde à média mais baixa. É de ressaltar que a segunda média significativamente mais elevada é a do grupo E, com  $117,74 \pm 16,38$   $\mu\text{m}$ .

Tabela IV – Média dos diâmetros dos oócitos ( $\mu\text{m}$ ) de cada grupo de estudo, *H. forskali* A, B, C, D e E.

| Grupo                | N  | Média $\pm$ desvio-padrão |
|----------------------|----|---------------------------|
| <i>H. forskali</i> A | 25 | $131,49 \pm 14,56$        |
| <i>H. forskali</i> B | 25 | $106,53 \pm 14,83$        |
| <i>H. forskali</i> C | 25 | $97,22 \pm 13,10$         |
| <i>H. forskali</i> D | 25 | $88,63 \pm 14,83$         |
| <i>H. forskali</i> E | 25 | $117,74 \pm 16,38$        |

Conforme se pode observar através da figura 11, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo ( $H_{(4)}=64,476$ ;  $p < 0,001 < \alpha = 0,05$ ).

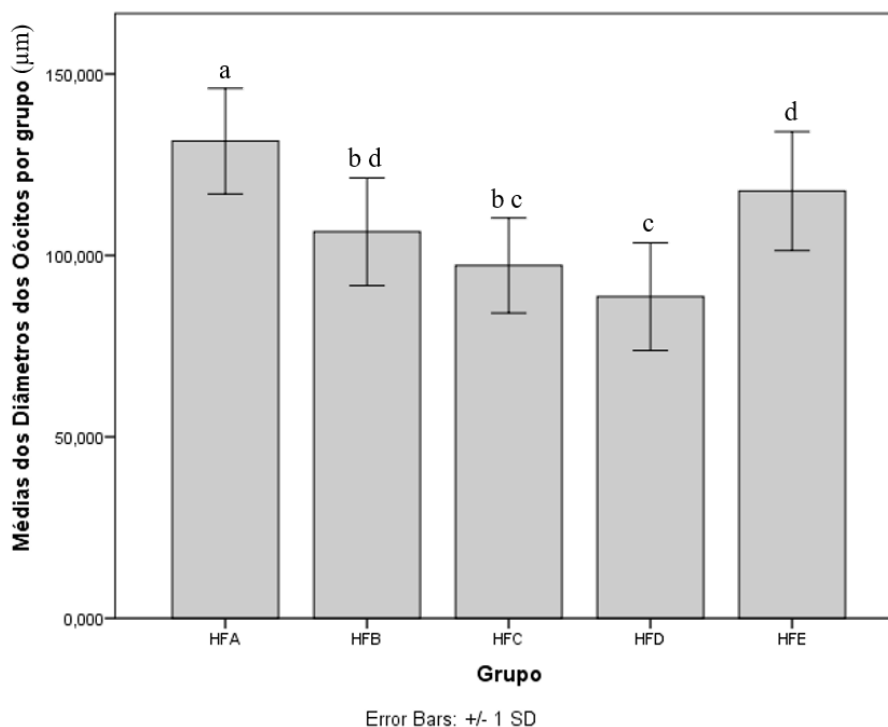


Figura 11 – Diâmetros médios dos oócitos ( $\mu\text{m}$ ) em cada um dos grupos em estudo, *H. forskali* A (HFA), B (HFB), C (HFC), D (HFD) e E (HFE) (média  $\pm$  desvio-padrão). As barras com letras diferentes, representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste HSD de Tukey para  $\alpha=0,05$ .

Através da realização do teste Tukey HSD verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo *H. forskali* A e todos os outros grupos em estudo, tendo este uma média de diâmetro dos oócitos significativamente superior a todos os outros grupos. Relativamente aos restantes grupos de estudo, *H. forskali* B difere significativamente do grupo *H. forskali* D, apresentando valores significativamente mais elevados. O grupo *H. forskali* C difere significativamente do *H. forskali* E, revelando valores médios do diâmetro dos oócitos significativamente mais baixos. Por fim, *H. forskali* D difere significativamente do grupo *H. forskali* E, apresentando também valores significativamente mais baixos. Os resultados acima descritos podem ser verificados através da figura 11.

De um modo geral, pode afirmar-se que, quanto mais intensa é a coloração de uma determinada gónada, mais avançado é o seu estágio de maturação. Da mesma forma que, quanto maior é o diâmetro dos oócitos constituintes de uma determinada gónada, mais avançado é o seu estágio de maturação, uma vez que se verificou que a coloração mais intensa corresponde ao maior diâmetro médio de oócitos.

Contudo, de acordo com o que se pode observar na figura 12, especificamente as imagens correspondentes aos grupos de estudo *H. forskali* D e E, verificou-se uma exceção. Neste caso em particular, apesar da coloração das gónadas representativas do grupo *H. forskali* E ser menos intensa e mais esbranquiçada do que o grupo *H. forskali* D, os túbulos e os oócitos apresentam diâmetros superiores no grupo *H. forskali* E, em comparação com as gónadas que representam o grupo *H. forskali* D. Deste modo, o grupo *H. forskali* E constitui uma exceção em relação a todas as restantes amostras analisadas, onde os diâmetros dos túbulos das gónadas e respetivos oócitos, e logo, o estágio de maturação, aumentam gradualmente do grupo *H. forskali* A para D.

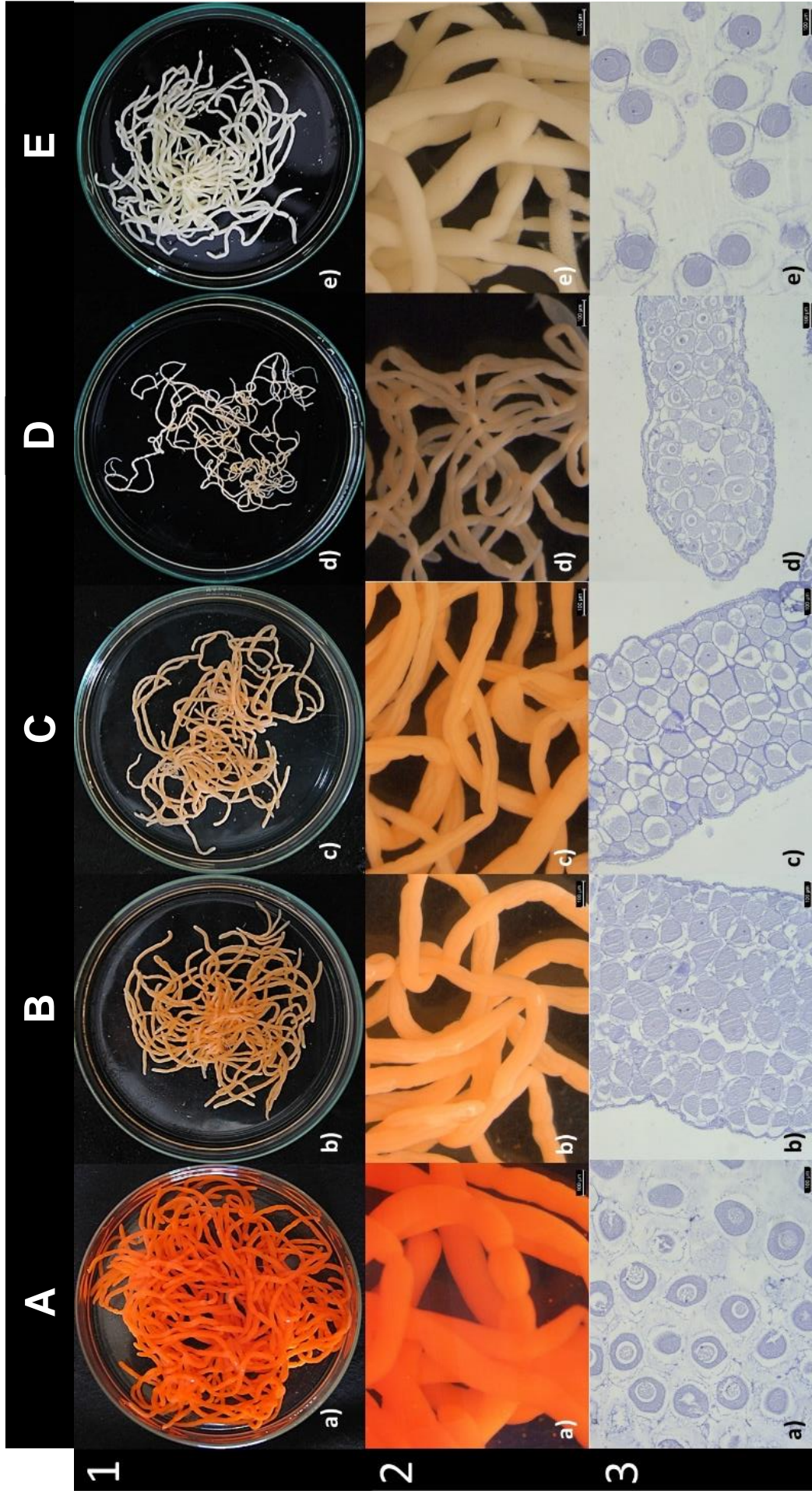


Figura 12 - Diferentes estádios de maturação sexual da *H. forskali* observados. Gónadas (1) e correspondentes túbulos (2) (100 µm) e oócitos (3) (100 µm), em todos os grupos de estudo, *H. forskali* A, B, C, D e E, do estágio mais maturo (A) para o menor estágio de maturação (E).

### 3.3 Acondicionamento de holotúrias

A variação do peso húmido total de holotúrias, em cada regime de acondicionamento, apresentada na tabela V, foi um fator analisado com a finalidade de avaliar em qual dos regimes testados se obtiveram melhores resultados.

Tabela V – Peso húmido total dos pepinos-do-mar *H. forskali*, utilizados nos ensaios de acondicionamento (média  $\pm$  desvio padrão). (\*) Representa um indivíduo morto durante o período experimental.

|                        | Ensaio de Policultivo |                    |                    | Ensaio de Monocultivo |                    |                    |
|------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
|                        | Tanque 1              | Tanque 2           | Tanque 3           | Tanque 1              | Tanque 2           | Tanque 3           |
| Peso inicial (g)       | 131,08 $\pm$ 41,33    | 132,59 $\pm$ 43,06 | 135,10 $\pm$ 17,96 | 116,37 $\pm$ 13,63    | 113,35 $\pm$ 17,87 | 134,09 $\pm$ 13,78 |
| Peso médio inicial (g) | 132,92 $\pm$ 32,59    |                    |                    | 121,27 $\pm$ 16,76    |                    |                    |
| Peso final (g)         | 118,63 $\pm$ 34,71    | 80,89 $\pm$ 1,22*  | 92,97 $\pm$ 11,93  | 101,48 $\pm$ 11,37    | 91,38 $\pm$ 15,44  | 86,22 $\pm$ 13,70  |
| Peso médio final (g)   | 99,01 $\pm$ 25,91     |                    |                    | 93,02 $\pm$ 13,97     |                    |                    |

Em ambos os ensaios, os parâmetros de qualidade da água - oxigénio dissolvido, pH, amónia, nitritos, salinidade e temperatura foram mantidos constantes ao longo de todo o período experimental, em todos os tanques (Tabela II, 3.1.1).

Tal como se pode verificar na figura 13, não ocorreu mortalidade no ensaio de monocultivo, no entanto, observou-se mortalidade de um indivíduo no ensaio de policultivo, tendo sido a taxa de mortalidade, 8%. Relativamente ao fenómeno de evisceração, verificou-se uma taxa de evisceração de 33% no ensaio de policultivo e de 25% no ensaio de monocultivo.

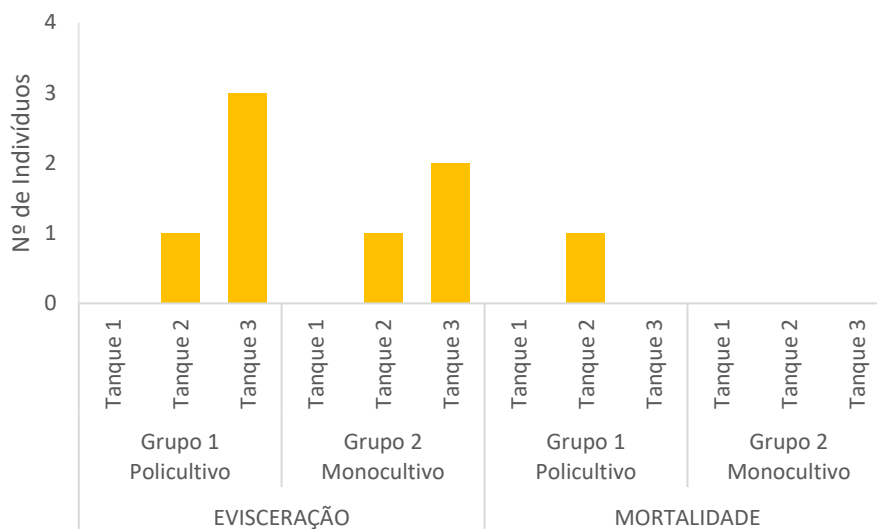


Figura 13 – Representação gráfica da ocorrência de mortalidade e evisceração em cada tanque experimental, em ambos os grupos de estudo, policultivo e monocultivo.

No final do ensaio, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre pesos médios iniciais dos grupos policultivo e monocultivo ( $t_{(15)}=0,78$ ;  $p=0,445$ ).

Esta análise permitiu ainda verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre o peso inicial e o peso final do grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo ( $Z=-2,40$ ;  $p=0,016$ ), sendo a média do peso inicial significativamente superior à do peso final.

Foi também possível apurar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os pesos inicial e final do grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo ( $t_{(11)}=3,58$ ;  $p=0,004$ ), sendo a média do peso inicial significativamente superior à do peso final.

Relativamente aos pesos médios finais de ambos os grupos de estudo, a análise estatística permitiu verificar que o peso médio final do grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo não difere significativamente do peso médio final do grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo ( $Z=-0,49$ ;  $p=0,651$ ).

Em ambos os ensaios de acondicionamento, ocorreu uma diminuição do peso médio inicial de holotúrias ao longo do ensaio. No grupo 1, policultivo, o peso médio inicial de  $132,92 \pm 32,59$  g, passou a  $99,01 \pm 25,91$  g no final do ensaio. No grupo 2, monocultivo, o peso médio inicial registado foi  $121,27 \pm 16,76$  g e, no final do ensaio  $93,02 \pm 13,97$  g. Porém, comparando o decréscimo do peso médio de holotúrias em ambos

os grupos de estudo, através da comparação entre as diferenças das médias dos pesos final e inicial, verifica-se que, no grupo 2, monocultivo, esta alteração é menos acentuada (a diferença das médias é de 28,25 g) do que no grupo onde os indivíduos foram mantidos em regime de policultivo (a diferença das médias é de 33,91 g).

O IG foi calculado com o objetivo de avaliar o estado reprodutivo dos indivíduos no final do ensaio e está representado na tabela VI. Foram analisadas as possíveis diferenças entre o IG dos dois grupos de estudo e entre géneros, tanto dentro do mesmo grupo como entre os dois grupos de estudo.

Tabela VI – IG calculado para os indivíduos mantidos em policultivo e em monocultivo (média  $\pm$  desvio-padrão).

| IG (%)      |                  |             |                  |
|-------------|------------------|-------------|------------------|
| Grupo 1     |                  | Grupo 2     |                  |
| Policultivo | 7,08 $\pm$ 5,58  | Monocultivo | 10,27 $\pm$ 6,01 |
| Machos      | 1,68 $\pm$ 1,09  | Machos      | 5,60 $\pm$ 1,82  |
| Fêmeas      | 11,14 $\pm$ 3,21 | Fêmeas      | 16,11 $\pm$ 3,14 |

Analisando o IG calculado para ambos os regimes de cultivo, foi possível inferir que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $t_{(14)}=-1,085$ ;  $p=0,296$ ) entre o IG médio calculado para ambos os grupos de estudo.

Relativamente ao IG calculado separadamente para machos e fêmeas mantidos sob o regime de acondicionamento de policultivo, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre estes ( $t_{(5)}=4,799$ ;  $p=0,005$ ), sendo a média do IG calculado para as fêmeas, significativamente superior ao IG médio dos machos.

No que diz respeito ao IG calculado para machos e fêmeas, pertencentes ao grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo, foi possível confirmar que existem diferenças estatisticamente significativas entre o IG de ambos os géneros ( $t_{(7)}=6,335$ ;  $p<0,001$ ), sendo a média correspondente ao IG do género feminino, superior à do IG calculado para o género masculino.

Considerando o IG calculado para as fêmeas pertencentes a ambos os grupos de estudo, policultivo e monocultivo, foi possível apurar que não existem diferenças

estatisticamente significativas ( $t_{(6)}=-2,214$ ;  $p=0,069$ ) entre o IG calculado para as fêmeas de ambos os grupos de estudo.

Finalmente, analisando o IG calculado para os machos pertencentes a cada grupo de estudo, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre o IG calculado para os machos de cada grupo ( $t_{(6)}=-3,329$ ;  $p=0,016$ ), sendo a média do IG dos machos do grupo mantido sob o regime de monocultivo, superior à do grupo mantido sob o regime de policultivo.



## **4. Discussão**

## Discussão

### 4.1 Avaliação do gênero de indivíduos *H. forskali*

Nos últimos anos, os pepinos-do-mar tornaram-se um recurso marinho economicamente muito importante, utilizado não só como alimento de luxo em determinados países, mas também para fins medicinais (Chen, 2004). Por esta razão, a exploração das populações naturais de pepinos-do-mar tem sido excessiva, resultando em perturbações ao nível da sua sustentabilidade (Anderson *et al.*, 2011). Contudo, a escassez de conhecimentos sobre a biologia, ecologia e reprodução de novas espécies tem dificultado avanços nesta área. Relativamente à espécie em estudo, apesar da sua ampla distribuição geográfica, a produção aquícola da *H. forskali* ainda não foi estabelecida. Porém, existem estudos preliminares sobre esta espécie e, nos últimos anos, têm sido realizados esforços no sentido de conseguir progressos ao nível da aquisição de conhecimentos determinantes sobre a sua biologia reprodutiva, os quais poderão traduzir-se na implementação de um sistema de produção rentável e eficaz (Chen, 2004; Santos *et al.*, 2015).

De acordo com Morgan (2000), a amostragem das gónadas é a via mais eficiente para a determinação do género nos pepinos-do-mar. A utilização de técnicas menos invasivas para identificar o género de holotúrias é essencial, uma vez que o fenómeno de evisceração ocorre muitas vezes como consequência da indução de *stress* nestes organismos marinhos (Shiell & Uthicke, 2006). Um dos objetivos do presente ensaio foi determinar o género da *H. forskali*, sem causar evisceração ou morte, como consequência da manipulação durante o ensaio, e perceber qual das técnicas é a mais eficaz e com o menor *stress* associado, de modo a constituir uma técnica viável para utilização em indivíduos reprodutores. A fim de introduzir novas espécies na indústria da aquacultura, é essencial ter conhecimento sobre a sua biologia reprodutiva e ciclo de vida. Para além disso, também a determinação do género dos indivíduos tem um papel fulcral neste processo, na medida em que, manter um rácio sexual adequado durante o acondicionamento de organismos reprodutores é essencial para o seu sucesso reprodutivo (Tuwo & Conand, 1992). Foram testadas, em diferentes grupos experimentais, quatro técnicas para identificação do género em *H. forskali*, técnica com agulha de biópsia, técnica com aspiração, técnica com pequena incisão na zona dorsal e técnica com corte na parte anterior. A técnica que revelou os melhores resultados foi a técnica com agulha

de biópsia, uma vez que não ocorreu evisceração, como consequência da punção das vísceras com a agulha de biópsia, não resultou em qualquer registo de mortalidade e permitiu a identificação do género de 100% dos indivíduos. A identificação do género com recurso à agulha de biópsia é uma técnica eficaz em holotúrias, utilizada há muitos anos em indivíduos reprodutores (Battaglione, 1999).

A técnica com aspiração foi adaptada de uma técnica anteriormente descrita por Al-Rashdi *et al.*, (2007), muito eficaz na determinação do género da *Holothuria scabra*, em que a expulsão das gónadas é desencadeada pela compressão da zona ventral, de modo a deslocar os órgãos para a parte anterior do corpo até à expulsão da gónada, procedendo-se à identificação do género com base na aparência das gónadas. A adaptação desta técnica prendeu-se com o facto de, no presente estudo, um dos objetivos consistir na identificação do género sem causar evisceração, como consequência da manipulação durante o ensaio, recorrendo-se para tal, a uma pipeta de *Pasteur* para captar uma parte da gónada e evitar a sua expulsão. Nesta técnica, em detrimento da técnica com agulha de biópsia, verificou-se, tanto a ocorrência de mortalidade (20%), como de evisceração (30%), ambas associadas aos procedimentos e manuseamento inerentes à técnica, mais precisamente, ao facto de os animais terem sido pressionados na zona ventral, com o objetivo de empurrar todos os órgãos para a extremidade anterior. No entanto, esta técnica teve a mesma taxa de sucesso relativamente à percentagem de identificação do género, comparativamente à técnica com pequena incisão na zona dorsal, onde não se registaram nem mortalidade, nem evisceração.

Na técnica com pequena incisão na zona dorsal, apesar da exposição dos órgãos, conseguida através do corte efetuado, nem sempre foi possível a observação das gónadas, podendo isto dever-se à sua inexistência, ou simplesmente ao facto de não terem sido encontradas. Esta técnica baseou-se num estudo precedente realizado por Menton & Eisen (1973), onde a cicatrização de feridas incisionais no tegumento da holotúria *Thyone briareus* foi descrita, tendo ocorrido a cicatrização total das feridas durante 14 dias após a realização da incisão.

Em relação à técnica com corte na parte anterior, esta técnica foi baseada em estudos precedentes realizados por Menton & Eisen (1973) e Battaglione (1999), envolvendo um corte na zona da boca, que provocou o relaxamento dos músculos nesta zona, tornando possível a introdução de uma pinça que auxiliou na recolha das amostras de gónada. Inicialmente, não foi possível a observação de gónadas, no entanto, através da compressão do corpo dos indivíduos, conseguiu-se localizar e extrair uma amostra dos

túbulos das gónadas. Deste modo, foi possível remover um túbulo de cada gónada encontrada, permitindo a identificação do género em 70% dos indivíduos. Esta técnica apenas difere da técnica com aspiração, na medida em que é realizado um corte, viabilizando, assim, a introdução de uma pinça em vez da pipeta de *Pasteur*. Deste modo, a gónada torna-se mais acessível, sendo mais fácil a recolha da amostra. Este facto pode explicar a facilidade na obtenção de um túbulo da gónada por inteiro, tal como ocorre na técnica com pequena incisão na zona dorsal, cuja metodologia também envolve a realização de um corte; enquanto que nas técnicas com agulha de biópsia e aspiração, apenas uma porção de gâmetas pode ser recolhida.

Em todas as técnicas aplicadas, o conteúdo amostrado apresentava oócitos perceptíveis, no caso das fêmeas, e o lúmen preenchido com espermátócitos maduros, nos machos. Assim, todas as gónadas analisadas durante a realização destas técnicas encontravam-se num avançado estágio de maturação, permitindo concluir que o período experimental (entre junho e julho) foi coincidente com a época reprodutiva ou período pré-desova, quando os gâmetas se encontram num estágio de maturação avançado (Santos *et al.*, 2014a; Santos *et al.*, 2015).

Apesar de ainda poucos estudos existirem, com base na capacidade de cicatrização do tegumento das holotúrias, este é um aspeto de elevada importância acerca destes organismos. A sua grande capacidade de regeneração dos cortes e feridas e mecanismos associados têm, nos últimos anos, despertado o interesse por parte da comunidade científica, para a sua aplicação na área da medicina (Yanagisawa, 1998; Miguel-Ruiz & García-Arrarás, 2007; Aydin *et al.*, 2011). Outra das características mais notáveis dos pepinos-do-mar é sua capacidade de regenerar os seus órgãos danificados ou eviscerados e até mesmo partes do corpo (Vandenspiegel *et al.*, 2000).

De facto, alguns estudos têm-se concentrado nesta capacidade de regeneração de tecidos e de cicatrização de feridas por parte das holotúrias. Esta característica está relacionada com os elevados níveis de ácidos gordos, incluindo o AA, o EPA e o DHA, que integram a composição corporal das holotúrias e desempenham um papel crucial neste mecanismo (Bordbar *et al.*, 2011; Yahyavi *et al.*, 2012). Os sedimentos constituintes dos fundos marinhos, a partir dos quais os pepinos-do-mar se alimentam, podem conter elevados níveis de ácidos gordos de cadeia ramificada, conferindo-lhes um papel determinante na capacidade de cicatrização de feridas e, neste caso, o perfil de ácidos gordos da *H. forskali* será de grande interesse para a comunidade científica (Fredalina *et al.*, 1999).

No presente trabalho, apesar das referidas técnicas invasivas, onde foi realizado um corte, verificou-se que todos os indivíduos *H. forskali* mostraram uma elevada capacidade de recuperação do corte a que foram submetidos. O tempo descrito para a regeneração completa de uma incisão é de três a quatro semanas, sendo que os pepinos-do-mar conseguem regenerar a totalidade dos órgãos internos ou até mesmo partes do corpo (Cowden 1968; Menton & Eisen 1973; Sun *et al.*, 2011). No presente estudo, foi possível verificar que os organismos alvo de estudo não apresentavam, no final do tempo de recuperação - 21 dias, cicatrizes ou outros vestígios que evidenciassem o corte.

#### **4.2 Avaliação do estado de maturação de indivíduos *H. forskali***

A descrição do ciclo reprodutivo de novas espécies, como a *H. forskali*, constitui um incentivo à introdução de novas espécies na indústria da aquacultura, sendo, deste modo, fundamental obter o máximo conhecimento sobre a sua biologia reprodutiva e ciclo de vida. Para além disso, a exploração sustentável dos *stocks* de populações selvagens de pepinos-do-mar requer, necessariamente, o conhecimento do seu comportamento sexual. De facto, este é essencial para desvendar os ciclos de reprodução das diferentes espécies com potencial para serem exploradas, de forma a implementar um período de captura e um período de repouso, durante a época de desova (Keshavarz *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2012; Pangkey *et al.*, 2012).

Com o objetivo de compreender alguns aspetos da biologia reprodutiva da *H. forskali*, foram analisadas gónadas em diferentes estádios de maturação. A referida análise foi realizada através da observação macroscópica dos túbulos e da cor das gónadas, bem como da observação microscópica de preparações histológicas, realizadas a partir das mesmas, permitindo distinguir cinco grupos de estudo distintos, *H. forskali* A, B, C, D e E. Os resultados obtidos através da observação microscópica das gónadas amostradas permitiram perceber que, de um modo geral, existe uma relação evidente entre o diâmetro dos oócitos constituintes das gónadas e o estádio de maturação das mesmas, sendo tanto maior o diâmetro dos oócitos, quanto mais avançado é o estádio de maturação da gónada. Para além do diâmetro dos oócitos, também a coloração das gónadas foi analisada juntamente com a observação dos túbulos, tendo sido possível associar os diferentes graus de coloração verificados a diferentes estádios de maturação, sendo que a coloração mais

intensa foi observada nas gónadas com túbulos de diâmetro maior. Estes resultados estão em concordância com estudos precedentes, onde se verificou, de igual modo, que a coloração das gónadas, bem como o diâmetro dos túbulos constituintes, se modifica ao longo do ano, evoluindo de acordo com o estágio de maturação em que se encontram (Ghobadyan *et al.*, 2012; Keshavarz *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2012).

Foi possível verificar uma tendência para a diminuição do grau de maturação do grupo de estudo *H. forskali* A para o grupo *H. forskali* E. Porém, através da observação da figura 12, mais precisamente as imagens 1, 2 e 3 E), verifica-se que, neste caso específico, os oócitos apresentam diâmetros maiores, em comparação com as gónadas representadas nas imagens 1, 2 e 3 B), C) e D), constituindo uma exceção em relação a todas as restantes amostras analisadas. A origem desta exceção, deve-se, muito provavelmente, ao facto desta gónada se encontrar num estágio imediatamente pós-desova, uma vez que, apesar da média dos diâmetros dos oócitos deste grupo ser a segunda maior (sendo o grupo com a maior média de diâmetro dos oócitos, o grupo *H. forskali* A), a sua coloração é muito clara relativamente ao grupo *H. forskali* A. Através da figura 12 – 3 E), é possível verificar que os túbulos se encontravam consideravelmente mais vazios do que nas figuras 12 -3 A), B), C) e D), sugerindo que esta gónada estaria prestes a iniciar o período de absorção – estágio de desenvolvimento V. De acordo com Navarro (2012), no estágio de maturação V – vazio, os túbulos encontram-se vazios, excetuando alguns oócitos residuais com tamanhos máximos (neste caso 117,74 µm de diâmetro médio), para além de ocorrer uma redução no tamanho das gónadas, tal como se verificou também no grupo *H. forskali* E (Figura 12) (Ramofafia *et al.*, 2003; Keshavarz *et al.*, 2012).

A análise dos resultados relativos às medições do diâmetro dos oócitos permitiu ainda verificar que, mesmo dentro de cada grupo de estudo, ocorreu uma grande variabilidade dos dados que dizem respeito às medidas registadas. Isto seria de esperar nas medidas relativas às gónadas que se encontravam na fase de crescimento (estádio II). Tipicamente, no estágio de desenvolvimento II, alguns oócitos desenvolvem-se mais rapidamente do que outros, originando uma distribuição de tamanho dos oócitos bimodal, o que resulta na presença, não só de oócitos relativamente pequenos, como também de oócitos médios (Navarro *et al.*, 2012).

Através da observação macroscópica, o grupo de estudo *H. forskali* D poderia ser incluído no estágio de maturação I – indeterminado, uma vez que o tamanho da gónada é muito reduzido e esta é composta por túbulos não ramificados e esbranquiçados. No entanto, quando as gónadas se encontram no estágio de maturação I, não é possível

determinar o seu género, mesmo através da análise microscópica de preparações histológicas. Tal não se verificou no grupo de estudo *H. forskali* D, onde o género pôde ser distinguido, através de análise microscópica. Deste modo, embora a coloração e a morfologia da gónada não estivessem de acordo com as características deste estágio de desenvolvimento, o grupo de estudo *H. forskali* D foi incluído no estágio de maturação II, em crescimento (Ramofafia *et al.*, 2003; Keshavarz *et al.*, 2012).

Através dos resultados obtidos, foi ainda possível perceber que os grupos *H. forskali* B e C se podem incluir no mesmo estágio de maturação - II, em crescimento. Para além de não se terem verificado diferenças significativas entre a média dos diâmetros dos oócitos medidos em cada grupo, as gónadas respetivas a estes dois grupos apresentavam uma tonalidade alaranjada, bem como um aumento de tamanho, em comprimento, e a presença de um número considerável de ramificações, relativamente ao grupo de estudo *H. forskali* D que, aparentemente, através de análise macroscópica, poderia ser incluído no estágio de maturação I. A análise microscópica permitiu ainda comprovar que os grupos de estudo *H. forskali* B e C se incluem no estágio de desenvolvimento II, uma vez que foram observados gâmetas em desenvolvimento em ambos os grupos, com um diâmetro médio de  $106,53 \pm 14,83 \mu\text{m}$  e  $97,22 \pm 13,10 \mu\text{m}$ , respetivamente.

Aparentemente, tendo em consideração a cor das gónadas e o facto do grupo de estudo *H. forskali* A apresentar diferenças estatisticamente significativas em relação a todos os outros grupos de estudo, sendo a sua média do diâmetro dos oócitos significativamente mais elevada, poderia incluir-se este grupo no estágio maturo (III). De acordo com Santos *et al.*, (2015) e Tuwo & Conand (1992), o diâmetro dos oócitos desta espécie, quando esta se encontra no estágio maturo, oscila entre 112 a  $129,4 \mu\text{m}$  e 90 a  $120 \mu\text{m}$ , respetivamente, pelo que, considerando o diâmetro médio dos oócitos do grupo *H. forskali* A ( $131,49 \pm 14,56 \mu\text{m}$ ), este grupo poderia ser incluído no estágio III. No entanto, a partir deste estágio de maturação, seria de esperar que as medidas do diâmetro dos oócitos fossem mais uniformes. Porém, verificou-se uma grande variabilidade nas medições do diâmetro dos oócitos, tal como em todos os outros grupos de estudo. Deste modo, é possível inferir que o grupo *H. forskali* A, muito provavelmente, ainda não se encontrava no estágio maturo, uma vez que, apesar da média dos diâmetros dos oócitos ser a maior, comparativamente aos restantes grupos de estudo e da sua coloração ser típica de uma gónada madura, foram observados oócitos com alguma discrepância relativamente ao seu diâmetro. O menor diâmetro medido neste grupo foi  $101,00 \mu\text{m}$  e o maior

162,44  $\mu\text{m}$ , contrariamente ao que, de modo geral, se verifica em gónadas maduras de espécies de holotúrias de regiões temperadas. Para além disso, os diâmetros dos oócitos registados neste grupo não estão dentro das medidas típicas de oócitos maduros de espécies da ordem Aspidochirotida, 150 a 210  $\mu\text{m}$  (Navarro *et al.*, 2012), exibindo um diâmetro médio inferior, sugerindo que as gónadas ainda não tinham atingido o estágio de maturação III.

Apesar de ter sido possível incluir cada um dos grupos de estudo num estágio de maturação, o número de amostras por grupo foi muito reduzido, já que apenas 5 gónadas foram recolhidas em cada momento de amostragem, para além do curto período de estudo, apenas 9 meses, comparando com outros estudos de grande relevância, com base na biologia reprodutiva de holotúrias (Keshavarz *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015)

#### **4.3 Acondicionamento de holotúrias em diferentes regimes: Policultivo e Monocultivo**

Na indústria da aquacultura, a competição é cada vez maior devido às exigências do mercado. Neste sentido, o desenvolvimento de novos métodos de produção, bem como novas estratégias de negócios e *marketing* representam boas alternativas para garantir o sucesso de uma aquacultura. Diferenciar os produtos provenientes de sistemas de aquacultura sustentável, como os cultivos integrados, de produtos resultantes de outros sistemas de produção não sustentáveis, com base nas diferenças ao nível das suas características nutricionais e sensoriais, parece ser também uma estratégia viável para corresponder às exigências do mercado. Contudo, serão necessários grandes esforços ao nível da investigação de modo a encontrar novas espécies cuja produção através de sistemas de aquacultura sustentável seja viável, bem como investir no desenvolvimento de técnicas para a otimização destes sistemas de produção.

Outro objetivo do presente trabalho teve por base a avaliação das diferenças observadas entre as taxas de mortalidade e evisceração, variação do peso médio das holotúrias durante o tempo de estudo, bem como o IG calculado no fim do ensaio, em indivíduos mantidos sob dois regimes diferentes de acondicionamento, de forma a compreender se a *H. forskali* tem potencial para o cultivo em cativeiro e quais das condições de acondicionamento testadas se mostraram mais vantajosas para esta prática.

Foi realizado um ensaio no qual foram testados dois tipos diferentes de acondicionamento, monocultivo e policultivo, tendo sido a dourada, *S. aurata*, a espécie selecionada, uma vez que já anteriormente se mostrou uma espécie adequada para incluir tanto em policultivos como em sistemas de IMTA (Valente *et al.*, 2011).

No referido ensaio de acondicionamento em policultivo, não se pode considerar que se trata de um sistema de cultivo integrado, uma vez que estes sistemas envolvem interações entre subsistemas, em que os subprodutos ou resíduos de cultivos terrestres ou aquáticos podem ser utilizados como alimento por outras espécies. Assim, diferentes subsistemas encontram-se interligados num sistema integrado, com uma relação benéfica entre eles, numa área limitada, minimizando os custos de produção e resultando, simultaneamente, numa produção diversificada (Rahman *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 2012). No presente trabalho, apesar de existirem organismos de espécies diferentes, com hábitos alimentares distintos e ocupando níveis tróficos e estratos diferentes da coluna de água, os organismos foram cultivados no mesmo espaço físico, em que as holotúrias e as douradas foram mantidas, ou seja, no mesmo sistema e não em subsistemas interligados.

O conceito de policultura tem por base a utilização total dos diferentes níveis tróficos e espaciais de um tanque de cultivo, com a finalidade de obter uma produção máxima de indivíduos por unidade de área. Deste modo, diferentes espécies pertencentes a níveis tróficos e espaciais distintos, são cultivadas no mesmo espaço, de forma a utilizar todos os tipos de alimento disponíveis, pelo que a seleção de espécies a incluir num policultivo é muito importante, devendo estas ser compatíveis e com hábitos alimentares diferenciados (Rahman *et al.*, 1992).

Relativamente às taxas de evisceração e mortalidade, os resultados mais favoráveis foram obtidos no grupo mantido sob o regime de monocultivo, onde não ocorreu mortalidade e a taxa de evisceração foi inferior à obtida no regime de policultivo. O facto de o regime de policultivo ter resultado em taxas mais elevadas de evisceração e mortalidade pode dever-se às condições de acondicionamento, uma vez que este foi praticado, tal como no regime de monocultivo, em tanques de 60 L. Apesar das douradas permanecerem a maior parte do tempo na coluna de água, ao contrário das holotúrias que habitam os fundos e as paredes dos tanques, a presença das douradas provavelmente induziu *stress* sobre as holotúrias, devido à sua grande proximidade no tanque de acondicionamento. Slater & Carton (2007) concluíram que a *Australostichopus mollis* é boa candidata para incluir em sistemas de policultivo, no entanto, este estudo foi realizado

com mexilhão, organismos sésseis cujo comportamento não tem qualquer impacto sobre as holotúrias, contrariamente ao que acontece com as douradas. Porém, no grupo de estudo em que as holotúrias foram mantidas sob o regime de monocultivo, foi registada uma taxa de 25% de evisceração, o que sugere que neste regime de acondicionamento também não estavam reunidas as condições ótimas para o cultivo da *H. forskali*. Segundo Pangkey *et al.*, (2012) e Shiell & Uthicke (2006), o sucesso do cultivo de pepinos-do-mar muito dependerá da disponibilidade de alimento, desde as fases larvares até à fase adulta. Muitos autores consideram que o alimento mais adequado para holotúrias na fase adulta, até mesmo para reprodutores, deve ser constituído por um *mix* de microalgas, de forma a satisfazer todas as necessidades nutricionais dos indivíduos (Chen, 2003; Ivy & Giraspy 2006). Considerando o facto de o grupo 2, mantido sob o regime de monocultivo, ter sido alimentado apenas à base de uma microalga, *I. galbana*, é possível que o alimento fornecido não tenha sido suficiente nem o mais adequado para suprir as necessidades nutricionais da *H. forskali*, apesar da microalga fornecida possuir um perfil nutricional bastante completo para utilização como alimento em aquacultura (Brown *et al.*, 1997; Brown, 2002; Asha & Muthiah, 2006).

No que diz respeito à variação do peso médio, confirmou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre o peso médio final e inicial de holotúrias, em ambos os grupos de estudo, policultivo e monocultivo. Verificou-se ainda que em ambos os grupos ocorreu uma diminuição do peso das holotúrias, sendo este decréscimo mais acentuado no grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo.

A obtenção de dados precisos de medições corporais e peso de holotúrias é uma tarefa desafiante. A elasticidade da parede do corpo, a variação do conteúdo do sistema digestivo bem como do fluido celómico resultam num desvio considerável destas medidas. Segundo Poot-Salazar *et al.*, (2014), esta análise pode ser realizada com mais rigor recorrendo a um maior número de medições como o peso imerso, peso seco, peso da holotúria eviscerada, bem como os comprimentos, quer com o corpo contraído, quer descontraído, calculando o seu peso e medidas com base nestes dados. No presente estudo, o único peso registado foi o peso húmido dos indivíduos e foi apenas com base nesta medição que os resultados foram determinados, podendo desta forma existir um erro associado a estes valores.

Tendo em conta a evisceração, os resultados referentes aos pesos médios foram influenciados pelo facto de no grupo 1 (policultivo) se ter verificado uma taxa de evisceração mais elevada, 33% (4 indivíduos), comparativamente ao que ocorreu no

grupo 2 (monocultivo), onde a taxa de evisceração foi de 25% (3 indivíduos). O facto de os indivíduos se eviscerarem, resulta na diminuição do seu peso médio. Além das taxas de evisceração terem influenciado negativamente estes resultados, também a já referida alimentação pode ter contribuído para a diminuição do peso médio de holotúrias, sugerindo que, tal como no grupo mantido sob o regime de monocultivo, a alimentação das holotúrias (essencialmente restos de alimento não utilizado pelas douradas e os seus produtos de excreção) no regime de policultivo, pode não ter sido suficiente para obter resultados desejáveis para a manutenção ou crescimento das holotúrias. Num estudo anteriormente realizado por Laxminarayana (2005), o substrato foi substituído a cada quinze dias, ao longo de todo o ensaio experimental, de forma a manter continuamente a matéria orgânica presente no substrato utilizado, para além de ter sido fornecida uma dieta suplementar constituída por microalgas de diferentes espécies. Deste modo, a renovação periódica do substrato para introduzir nova matéria orgânica nos dois grupos de estudo, bem como a utilização de uma dieta constituída por uma mistura equilibrada de microalgas no grupo 2 (monocultivo), e o aumento da taxa de alimentação das douradas no grupo 1 (policultivo), poderiam originar resultados mais favoráveis. Relativamente ao policultivo, a taxa de alimentação foi calculada de acordo com a densidade de douradas presente em cada tanque experimental, e uma parte considerável da matéria orgânica resultante da alimentação fornecida era inevitavelmente removida no processo de limpeza manual dos tanques e pelo próprio funcionamento do sistema em RAS, de forma a manter uma boa qualidade da água. Assim, os detritos orgânicos que permaneciam no sistema poderiam não ser suficientes para alimentação devida dos organismos. De facto, estes resultados sugerem que um regime de acondicionamento em IMTA poderá ser o mais adequado para o acondicionamento da *H. forskali*, uma vez que, tal como anteriormente referido, neste tipo de cultivos as diferentes espécies são incluídas em diferentes subsistemas, utilizando os subprodutos ou resíduos de outros cultivos como alimento e, neste caso, o aumento da carga orgânica no tanque onde se encontram as douradas não seria um problema. Um estudo com base na *Cucumaria frondosa* (Nelson *et al.*, 2012) mostrou que esta espécie tem um grande potencial para incluir em sistemas IMTA e ainda auxiliar na redução da carga orgânica resultante dos sistemas de aquacultura. Com base nos estudos referidos e nos resultados aqui obtidos, é possível afirmar que as holotúrias são organismos com potencial para serem incluídos em policultivos com espécies sésseis ou com reduzida mobilidade e para introduzir em sistemas de IMTA, com espécies de

peixes ou outras espécies cuja produção resulte num elevado conteúdo de detritos orgânicos.

No final do ensaio em que a *H. forskali* foi mantida em policultivo e em monocultivo, também o IG foi calculado de modo a avaliar o estado reprodutivo dos indivíduos, após 3 meses de acondicionamento em cada um dos regimes testados. Os resultados obtidos mostraram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o IG desta holotúria mantida em policultivo ( $7,08 \pm 5,58\%$ ) e em monocultivo ( $10,27 \pm 6,01\%$ ). Contudo, o IG calculado para o grupo de estudo mantido sob o regime de monocultivo, incluindo o IG calculado individualmente para machos ( $5,60 \pm 1,82\%$ ) e fêmeas ( $16,11 \pm 3,14\%$ ) dentro deste grupo, foi mais elevado, comparativamente ao grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo, incluindo o IG calculado para machos ( $1,68 \pm 1,09\%$ ) e para fêmeas ( $11,14 \pm 3,21\%$ ). Porém, estes resultados foram igualmente afetados pelas taxas de mortalidade e evisceração, que foram mais elevadas no grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo, resultando num menor número de indivíduos para incluir no cálculo do IG. Macroscopicamente, foi possível verificar que, em ambos os grupos de estudo, as gónadas femininas eram, de um modo geral, consideravelmente maiores do que as gónadas masculinas, apresentando túbulos com diâmetro maior, comparativamente às gónadas masculinas. Consequentemente, o cálculo do IG realizado para as fêmeas de ambos os grupos de estudo resultou em valores mais elevados do que o IG calculado para os machos de cada grupo. Relativamente aos resultados obtidos no cálculo do IG efetuado para machos ( $1,68 \pm 1,09\%$ ) e fêmeas ( $11,14 \pm 3,21\%$ ), dentro do grupo de estudo mantido sob o regime de policultivo, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre eles, sendo a média respetiva ao IG das fêmeas, significativamente superior ao IG médio calculado para os machos deste grupo. No que diz respeito ao IG calculado para machos ( $5,60 \pm 1,82\%$ ) e fêmeas ( $16,11 \pm 3,14\%$ ), dentro do grupo mantido sob o regime de monocultivo, também foi possível verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois géneros, sendo a média de IG calculado para as fêmeas, significativamente superior à média do IG calculado para os machos deste grupo. Estes resultados são concordantes com um estudo precedente, relacionado com a biologia reprodutiva da *Holothuria sanctori*, outro pepino-do-mar de regiões temperadas, onde, ao longo do estudo, as fêmeas apresentavam valores mais elevados de IG comparativamente aos machos (Navarro *et al.*, 2012). No entanto, e assim como no estudo realizado por Santos *et al.*, (2015), estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Considerando os valores de IG calculados para as fêmeas

de ambos os grupos de estudo, policultivo ( $11,14 \pm 3,21\%$ ) e monocultivo ( $16,11 \pm 3,14\%$ ), verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre estes valores, contudo, a média relativa ao IG, calculado para as fêmeas mantidas sob o regime de monocultivo, foi mais elevada. Relativamente ao IG calculado para os machos de ambos os grupos de estudo, policultivo ( $1,68 \pm 1,09\%$ ) e monocultivo ( $5,60 \pm 1,82\%$ ), foi possível verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre estes valores, sendo a média respetiva ao IG, calculado para os machos do grupo mantido sob o regime de monocultivo, significativamente mais elevada. Em suma, os resultados obtidos mostram que, ao fim de 3 meses de acondicionamento, os indivíduos do grupo mantido sob o regime de monocultivo se encontravam num estágio de maturação mais avançado do que os indivíduos do grupo mantido sob o regime de policultivo, sugerindo que o regime de monocultivo foi o mais propício ao desenvolvimento gonadal e à evolução da sua maturação sexual.

De um modo geral, os resultados obtidos mostraram que as condições reunidas no regime de monocultivo se revelaram bastante mais favoráveis para o acondicionamento da *H. forskali*. Ainda assim, também foi possível manter os indivíduos acondicionados sob o regime de policultivo, durante todo o período de estudo, tendo-se verificado uma taxa de mortalidade bastante reduzida e uma taxa de evisceração apenas ligeiramente superior à verificada no grupo mantido sob o regime de monocultivo.



## **5. Conclusão**

## Conclusão

Desde meados da década de 2000, o fornecimento global de pepinos-do-mar produzidos em aquacultura tem aumentado, pelo que esta parece ser a melhor solução para evitar a sobre-exploração das populações naturais. No entanto, estes equinodermes não apresentam dimorfismo sexual e, deste modo, não é possível determinar externamente o género dos indivíduos, salientando, assim, a importância do presente estudo. A obtenção de informações sobre novas técnicas, mais eficazes e menos invasivas, de identificação do género em holotúrias e, conseqüentemente, sobre a sua época reprodutiva, irá possibilitar não apenas o progresso da investigação centrada no conhecimento sobre o ciclo reprodutivo destas espécies, aumentando as probabilidades do sucesso dos programas de produção, bem como impulsionar a sua produção em aquacultura.

Em conclusão, e concordantemente com os resultados anteriormente descritos e discutidos, os melhores resultados, no que diz respeito à identificação do género, foram conseguidos na técnica com agulha de biópsia, tendo-se obtido uma taxa de identificação de 100%, sem quaisquer registos de eventos de evisceração ou mortalidade.

Além da aquisição de conhecimentos sobre a biologia reprodutiva de holotúrias, o sucesso do cultivo de pepinos-do-mar muito dependerá da disponibilidade de alimento, adequado a cada fase do seu ciclo de vida, sendo este o principal fator que influencia o sucesso dos cultivos de holotúrias. Um dos grandes desafios para a indústria da aquacultura é o desenvolvimento de dietas ótimas do ponto de vista nutricional, com o menor custo e impacto ambiental possíveis. Uma vez que as holotúrias têm a capacidade de se alimentar apenas de detritos orgânicos resultantes do cultivo de outras espécies, são consideradas espécies com uma grande mais-valia para utilização em policultivos e sistemas IMTA, cultivos muito vantajosos do ponto de vista ecológico e económico.

Os resultados obtidos nos ensaios de acondicionamento permitiram concluir que, apesar do regime de monocultivo ter sido o mais favorável ao desenvolvimento dos indivíduos e à evolução da sua maturação sexual, pode-se considerar que a *H. forskali* constitui uma espécie promissora, sendo uma excelente candidata para introdução de novas espécies em aquacultura, tanto em mono como policultivos e até mesmo em sistemas IMTA. O facto de ter sido possível manter os indivíduos em regime de policultivo durante 3 meses de acondicionamento, com uma taxa de mortalidade associada muito reduzida (8%), reforça ainda mais a ideia de que esta é uma espécie com

grande potencial para a indústria da aquacultura, embora sejam necessários grandes esforços ao nível da investigação científica, no sentido de otimizar os sistemas de produção desta espécie. Deste modo, concluiu-se que o policultivo de *H. forskali* com douradas é viável e que as holotúrias possuem a capacidade de se alimentar apenas de detritos resultantes do cultivo das douradas, sendo o seu custo de produção praticamente nulo.

De facto, torna-se necessário investir em investigação nesta área, uma vez que existem inúmeras vantagens associadas aos regimes de policultivo. Além da considerável possibilidade de aumentar a produção de indivíduos por unidade de área, em comparação com os sistemas de monocultura, a combinação de espécies diferentes, num sistema de policultivo, também contribui eficazmente para melhorar as descargas de efluentes. No caso das holotúrias, existe ainda uma vantagem adicional, uma vez que participam ativamente na oxigenação dos sedimentos. Efetivamente, o grande desafio para a comunidade científica e para a indústria da aquacultura consiste numa mudança no sentido de uma menor utilização dos recursos marinhos durante o processo de produção. Tal mudança terá como objetivo o desenvolvimento de alimentos mais sustentáveis, que não comprometam a qualidade do pescado relativamente aos atributos sensoriais e que permitam assegurar níveis adequados de ácidos gordos omega-3 de cadeia longa, tão importantes na alimentação humana.



## **6. Perspetivas Futuras**

## **Perspetivas Futuras**

De forma a complementar os estudos desenvolvidos ao longo do presente trabalho, e com o objetivo de alcançar novos contributos para o desenvolvimento científico nesta área, serão necessários mais estudos, sugerindo-se que se desenvolvam avanços nas seguintes áreas:

Reprodução da *H. forskali* em cativeiro, através de técnicas já conhecidas de indução da desova, utilizadas para espécies de holotúrias de zonas temperadas;

Testar a introdução da *H. forskali* em sistemas de policultivo com, por exemplo, bivalves, camarão ou macroalgas;

Com vista à otimização do crescimento e do desenvolvimento dos pepinos-do-mar, é também crucial realizar estudos aprofundados, focados na alimentação e na nutrição destas espécies, com base nas suas necessidades nutricionais.



## **7. Referências Bibliográficas**

## Referências Bibliográficas

Al-Rashdi, K. M., Al-Busaidi, S. S., Al-Rassadi, I. H. 2007. Status of the sea cucumber fishery in the Sultanate of Oman. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 25:17–21.

Alexander, K. A., Potts, T. P., Freeman, S., Israel, D., Johansen, J., Kletou, D., Melande, M., Pecorinof, D., Rebours, C., Shorteng, M., Angel, D. L. 2015. The implications of aquaculture policy and regulation for the development of interated multi-trophic aquaculture in Europe. *Aquaculture*. 443:16–23.

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

Asha, P. S., Muthiah, P. 2006. Effects of single and combined microalgae on larval growth, development and survival of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *Aquaculture Research*. 37:113-118.

Asha, P. S., Muthiah, P. 2007. Growth of the hatchery-produced juveniles of comercial sea cucumber *Holothuria (Theelothuria) spinifera* Theel. *Aquaculture Research*. 38:1082-1087.

Aydin, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y., Kose, S. 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*. 46:500–508.

Battaglone, S. C. 1999. Culture of tropical sea cucumbers for stock restoration and enhancement. *Naga: The ICLARM Quarterly*. 22 (4):4-11.

Battaglone, S. C., Seymor, J.E., Ramofafia, C., Lane, I. 2002. Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. *Aquaculture*. 207: 29-47.

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

Benítez-Villalobos, F., Avila-Poved, O. H., Gutiérrez-Méndez, I. S. 2013. Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms*. Vol. 1: 13–24.

Betchel, P. J., Oliveira, A. C. M., Demir, N., Smiley, S. 2012. Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus calicornicus*, commercially harvested in Alaska. *Food Science and Nutrition*. 63-73.

Bordbar, S., Anwar, F., Saari, N. 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - a review. *Marine drugs*. 9 (10): 1761-1805.

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

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151: 315-331.

Canario, A. V. M., Condeça, J., Power, D. M. 1998. The effect of stocking density on growth in the gilthead sea-bream *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture Research*. 29: 177-181.

Chang-Lee, M. V., Price, R. J., Lampila, L. E. 1989. Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus spp.*). *Journal of Food Science*. 54:567-572.

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

Chen, J. 2004. Present status and prospects of sea cucumber industry in China. 25–38pp. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F., Mercier, A. (eds) Advances in sea cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper, No. 463. Rome, FAO. 425 p.

Colloca, F., Cerasi, S. 2005. Cultured aquatic species information programme, *Sparus aurata*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. ([www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en)). Consultado a 22 de janeiro de 2017.

Cowden, R. 1968. Cytological and histochemical observations on connective tissue cells and cutaneous wound healing in the sea cucumber *Stichopus badionotus*. Journal of Invertebrate Pathology. 10:151-159.

Dereli, H., Çulha, S. T., Çulha, M., Ozalp, B. H., Tekinay, A. A. 2016. Reproduction and population structure of the sea cucumber *Holothuria tubulosa* in the Dardanelles Strait, Turkey. Mediterranean Marine Science. 47-55.

Dimitriou, E., Katselis, G., Moutopoulos, D. K., Akovitiotis, C., Koutsikopoulos, C. 2007. Possible influence of reared gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) on wild stocks in the area of the Messolonghi lagoon (Ionian Sea, Greece). Aquaculture Research, 38(4): 398-408.

Eriksson, H., Clarke, S. 2015. Chinese market responses to overexploitation of sharks and sea cucumbers. Biological Conservation. 184: 163–173.

FAO. 2017. Species Fact Sheets - *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). Fisheries and Aquaculture Department. Rome. (<http://www.fao.org/fishery/species/2384/en>). Consultado a 2 de fevereiro de 2017.

Ferreira, J. G., Saurel, C., Ferreira, J. M. 2012. Cultivation of gilthead bream in monoculture and integrated multi-trophic aquaculture. Analysis of production and environmental effects by means of the FARM model. Aquaculture. 358–359: 23–34.

Fredalina, B. D., Ridzwan, B. H., Abidin, A. Z., Kaswandi, M. A., Zaiton, H., Zali, I., Jais, A. M. 1999. Fatty acid compositions in local sea cucumber. *General Pharmacology: The Vascular System*. 33(4): 337-340.

Ghobadyan, F., Morovvati, H., Ghazvineh, L., Tavassolpour, E. 2012. An investigation of the macroscopic and microscopic characteristics of gonadal tubules in the sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Persian Gulf, Iran). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*. 32: 6-14.

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

Hannah, L., Pearce, C. M., Cross, S. F. 2013. Growth and survival of California sea cucumbers (*Parastichopus californicus*) cultivated with sablefish (*Anoplopoma fimbria*) at an integrated multi-trophic aquaculture site. *Aquaculture*. 406–407: 34–42.

Ivy, G., Giraspy, D. A. 2006. Development of large-scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. *versicolor* (Conand, 1986) in Queensland, Australia. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*. 24:28–34.

Keshavarz, M., Mohammadikia, D., Dabbagh, A. R., Kamrani, E. 2012. Reproductive biology of the sea cucumber for successful breeding: a review. *Journal of Animal Production Advances*. 2(2): 208-213.

Klaoudatos, S. D., Conides, A. J. 1996. Growth, food conversion, maintenance and long-term survival of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., juveniles after abrupt transfer to low salinity. *Aquaculture Research*. 27:765-774.

Lambeth, L. 2000. The subsistence use of *Stichopus variegatus* (now *S. hermanni*) in the Pacific Islands. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*. 13: 18-21.

Laxminarayana, A. 2005. Induced spawning and larval rearing of the sea cucumbers, *Bohadschia marmorata* and *Holothuria atra* in Mauritius. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 22: 48-52.

Marôco, J. 2014. Análise Estatística com o SPSS Statistics. 6ª edição. Pêro Pinheiro: Report Number, Lda.

Menton, D. N., Eisen, A. Z. 1973. Cutaneous wound healing in the sea cucumber, *Thyone briareus*. Journal of morphology. 141(2): 185-203.

Miguel-Ruiz, J. E. S., García-Arrarás, J. E. 2007. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. BMC Developmental Biology. 7(1): 115.

Mihelakakis, A., Tsoikas, C., Yoshimatsu, T. 2002. Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol 33. No 2.

Morgan, A. D. 2000. Aspects of sea cucumber broodstock management (Echinodermata: Holothuroidea). SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 13: 2-8.

Navarro, P. G.; García-Sanz, S.; Tuyá, F. 2012. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). Scientia Marina 76(4): 741-752.

Nelson, E. J., MacDonald, B. A., Robinson, S. M. C. 2012. The absorption efficiency of the suspension-feeding sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, and its potential as an extractive integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) species. Aquaculture. 370–371: 19–25.

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

Plagányi, É. E., Skewes, T., Murphy, N., Pascual, R., Fischer, M. 2015. Crop rotations in the sea: Increasing returns and reducing risk of collapse in sea cucumber fisheries. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 112: 21.

Poot-Salazar, A., Hernández-Flores, Á., Ardisson, P. 2014. Use of the SLW index to calculate growth function in the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *Scientific reports*. 4:5151.

Pratas, D., Santos, F., Augusto, A., Baptista, T., Pombo, A. 2014. Sea cucumber: New source of protein and fatty acids for human consumption. *Aquaculture Europe*; 14-17 Oct. 2014. Donostia-San Sebastián, Spain.

Purcell, S. W., Samyn, Y., Conand, C. 2012. Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. No 6. Rome, FAO. 150 p.

Rahman, M. M., Varga, I., Chowdhury, S. N. 1992. *Manual on polyculture and integrated fish farming in Bangladesh*. FAO, Fisheries and Aquaculture Department.

Ramofafia, C., Battaglione, S. C., Bell, J. D., Byrne, M. 2000. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. *Marine Biology*. 136 (6): 1045-1056.

Ramofafia, C., Byrne, M., Battaglione, C. S. 2003. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology*. 142:281–288.

Ramón, M., Lleonart, J., Massutí, E. 2010. Royal cucumber (*Stichopus regalis*) in the northwestern Mediterranean: Distribution pattern and fishery. *Fisheries Research*. 105:21–27.

Renbo, W., Yuan, C. 2004. Breeding and culture of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, Liao. 277-286 pp. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F., Mercier, A. (eds) Advances in sea cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper, No. 463. Rome, FAO. 425 p.

Robinson, G., Lovatelli, A. 2015. Global sea cucumber fisheries and aquaculture FAO's inputs over the past few years. FAO Aquaculture Newsletter. 53: 55-57.

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

Ruppert, E. E., Barnes, R. D. 1996. Zoologia dos Invertebrados. McGraw-Hill Interamericana. México. 1114p.

Saldanha, L. 2003. Fauna Submarina Atlântica: Portugal continental, Açores e Madeira. 4ª edição. Publicações Europa-América. Portugal. 224p.

Samyn, Y. 2000. Conservation of aspidochirotid holothurians in the littoral waters of Kenya. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 13: 12-17.

Santos, F., Pratas, D., Baptista, T., Pombo, A. 2014a. Aquaculture potencial of sea cucumber *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*, A reproductive biology approach. Aquaculture Europe; 14-17 Oct. 2014. Donostia-San Sebastián, Spain.

Santos, F., Pratas, D., Baptista, T., Pombo, A. 2014b. Sex determination in sea cucumbers: *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*. International Meeting on Marine Research; 10-11 Julho. 2014. Peniche, Portugal.

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

Shiell, G. R., Uthicke, S. 2006. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria whitmaei*. [Holothuroidea Aspidochirotida] In the Indian and Pacific Ocean Regions of Australia. *Marine Biology*. 148: 973-986.

Sicuro, B., Levine, J. 2011. Sea cucumber in the Mediterranean: A potential species for aquaculture in the Mediterranean. *Reviews in Fisheries Science*. 19(3): 299-304.

Slater, M. J., Carton, A. G. 2007. Survivorship and growth of the sea cucumber *Australostichopus (Stichopus) mollis* (Hutton 1872) in polyculture trials with green-lipped mussel farms. *Aquaculture*. 272: 389–398.

Sun, L., Chen, M., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Shu, C., Gardiner, D. M. 2011. Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*. 6(2): 195-205.

Takahashi, T., Sutherland, S. C. 2013. Climatological mean distribution of pH and carbonate ion concentration in global ocean surface waters in the unified pH Scale and mean rate of their changes in selected areas. Final report submitted to the National Science Foundation, Washington, D. C. for Grant: OCE. 10-38891.

Tuwo, A., Conand, C. 1992. Reproductive biology of the holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *Journal of Marine Biology. Ass.* 72: 745– 758.

Valente, L. M. P., Cornet, J., Donnay-Moreno, C., Gouygou, J. P., Bergé, J. P., Bacelar, M., Escórcio, C., Rocha, E., Malhão, F., Cardinal, M. 2011. Quality differences of gilthead sea bream from distinct production systems in Southern Europe: Intensive, integrated, semi-intensive or extensive systems. *Food Control*. 22: 708-717.

VandenSpiegel, D., Jangoux, M., Flammang, P. 2000. Maintaining the line of defense: Regeneration of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *Biology Bulletin*. 198(1): 39-49.

Wang, J., Ren, T., Han, Y., Zhao, Y., Liao, M., Wang, F., Jiang, Z. 2015a. The effects of dietary lead on growth, bioaccumulation and antioxidant capacity in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 40: 535-540.

Wang, J., Ren, T., Han, Y., Zhao, Y., Liao, M., Wang, F., Jiang, Z. 2015b. Effects of dietary vitamin C supplementation on lead-treated sea cucumbers, *Apostichopus japonicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 118:21–26.

Watters C.; Iwamura S.; Ako H.; Deng D. 2012. Nutrition considerations in aquaculture: The importance of omega-3 fatty acids in fish development and human health. *Foods and Nutrition*.

Yahyavi, M., Afkhami, M., Javadi, A., Ehsanpour, M., Khazaali, A., Khoshnood, R., Mokhlesi, A. 2012. Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilota* from Qeshm Island (Persian Gulf). *African Journal of Biotechnology*. Vol.11 (12), 2862–2869.

Yanagisawa, T. 1998. Aspects of the biology and culture of the sea cucumber. *Tropical mariculture*. Academic Press. London, 291-308p.

Yu, H-B., Gao, Q-F., Dong, S-L., Wen, B., Hou, Y-R., Ning, L-G. 2015. Utilization of corn meal and extruded soybean meal by sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka): Insights from carbon stable isotope analysis. *Aquaculture*. 435: 106–110.

Zar, J. H., Hall, P. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5<sup>th</sup> Edition. 944p.



## **8. Anexos**

## **Anexo I**

### Processamento de Amostras

#### **1. Fixação**

- Fixador: formol tamponado a 10%
- As amostras permanecem mergulhadas no fixador durante 2 dias

#### **2. Desidratação e Inclusão em Parafina**

Esta etapa decorre no processador de tecidos.

A sequência de processamento tem como objetivo desidratar os tecidos passando por uma concentração crescente de álcoois, aclarar os tecidos em xilol e incluir a parafina nos tecidos, sendo definida tendo em conta as dimensões das amostras analisadas. Neste trabalho, a sequência de processamento utilizada foi a seguinte:

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

Após a inclusão de parafina líquida nos tecidos, as peças são incorporadas em blocos de parafina, com um dispensador de parafina e uma placa fina, de acordo com a orientação desejada.

### **3. Cortes Histológicos**

Os cortes dos blocos de parafina são realizados no micrótomo, com uma espessura ideal de 8  $\mu\text{m}$ . Os cortes obtidos são colocados em lâminas limpas, com uma camada de água destilada, de forma a ficarem esticados sobre a lâmina e, posteriormente, são introduzidos na estufa a 37 °C até à realização da coloração.

## **Anexo II**

### Coloração com Hematoxilina & Eosina

#### **Desparafinação e Re-hidratação I:**

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

#### **Desidratação I:**

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

No final do processo acima descrito, procede-se à montagem definitiva das lâminas com DPX (Difco) (cola apropriada), deixando-se depois secar, durante pelo menos 48 horas.

## Anexo III

### Produção científica no âmbito do presente trabalho de investigação

---

#### Posters apresentados

2014

- (01) Pratas, D., Santos, F., Baptista, T., Pombo, A. Sea Cucumber: New Source of Protein for Human Consumption. International Meeting Marine Research. 10-11 de julho de 2014. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche, Portugal.
- (02) Santos, F., Pratas, D., Baptista, T., Pombo, A. Sex Determination in Sea Cucumbers: *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*. International Meeting Marine Research. 10-11 de julho de 2014. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche, Portugal.
- (03) Pratas, D., Santos, F., Augusto, A., Baptista, T., Pombo, A. Sea Cucumber: New Source of Protein and Fatty Acids for Human Consumption. Aquaculture Europe; 14-17 de outubro de 2014. Donostia - San Sebastián, Spain.
- (04) Santos, F., Pratas, D., Baptista, T., Pombo, A. 2014. Aquaculture Potencial of Sea Cucumber *Holothuria forskali* and *Stichopus regalis*, A Reproductive Biology Approach. Aquaculture Europe; 14-17 de outubro de 2014. Donostia - San Sebastián, Spain.

2015

- (01) Pombo, A., Santos, A., Pratas, D., Baptista, T. Aceitação sensorial de pepinos do mar acondicionados em sistema RAS. XV Congreso Nacional Y I Congreso Ibérico de Acuicultura; 13-16 de outubro de 2015. Huelva, Spain.
- (02) Pombo, A., Pratas, D., Santos, F., Morais, H., Baptista, T. Transportation Methods of Sea Cucumber Broodstock, *Holothuria forskali*. Aquaculture Europe; 20-23 de outubro de 2015. Rotterdam, Holland.
- (03) Pombo, A., Santos, F., Pratas, D., Dias, S., Santos, R., Baptista, T. Sea Cucumbers: Broodstock Collection and Economic Valuation of Fisheries Rejects. Preliminary Results. Aquaculture Europe; 20-23 de outubro de 2015. Rotterdam, Holland.

### **Comunicações orais**

2015

- (01) Pombo, A., Santos, F., Pratas, D., Baptista, T. Sea Cucumbers Aquaculture: Protein Evaluation of Broodstock Conditioning. Latin American and Caribbean Aquaculture; 16-19 de novembro de 2015. Fortaleza, Brasil.

### **Artigos científicos**

2016

- (01) Pratas, D., Santos, F., Dias, S., Rodrigues, V., Couto, M., Santos, R., Baptista, T., Pombo, A. 2016. Development of Techniques for Gender Identification in *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) from Peniche Coast (Portugal).