

**O efeito da salinidade no crescimento e maturação de
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)**

João Afonso Almeida e Silva

2021

**O efeito da salinidade no crescimento e maturação de
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)**

João Afonso Almeida e Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Ana Margarida Violante
Pombo

2021

**O efeito da salinidade no crescimento e maturação de
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)**

Copyright © João Afonso Almeida e Silva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Politécnico de Leiria, 2021

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o 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

Quero agradecer à minha orientadora Professora Ana Pombo pelo conhecimento transmitido ao longo deste ano.

Um obrigado ao Pedro Santos pelo apoio, por me ter acompanhado ao longo e pelos conselhos que me deu ao longo de todo o ano.

Um obrigado também a todos os meus amigos que estiveram comigo e que me apoiaram durante este ano.

E um agradecimento especial à minha família e também à minha namorada pelo apoio e confiança ao longo deste ano e por me terem ajudado a alcançar este objetivo.

Obrigado a todos!

Resumo

Os ouriços-do-mar são animais muito valorizados a nível comercial. As gónadas destes animais são consumidas há muito tempo e consideradas uma iguaria. Apresentam um valor comercial elevado, por isto as populações de ouriços-do-mar têm sofrido uma elevada pressão ao longo das últimas décadas. Isto faz aumentar o interesse da produção destes animais em aquacultura, como forma de responder a esta pressão e de aliviar a sua pesca excessiva. Os fatores mais importantes na produção destes animais em aquacultura são a qualidade e tamanho das gónadas, sendo a cor das suas gónadas também um fator determinante na atribuição do valor comercial destes animais. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) é o ouriço-do-mar mais consumido na Europa, principalmente porque apresenta uma distribuição ampla e é abundante, desde o Atlântico Nordeste até toda a extensão do Mar Mediterrâneo. Sendo uma espécie bastante comum na costa portuguesa. A maturação e o crescimento das gónadas desta espécie são afetados pela disponibilidade do alimento, bem como a sua qualidade e quantidade. Para além disto os fatores abióticos como a temperatura, o fotoperíodo e a salinidade são também fatores determinantes no crescimento e maturação deste ouriço-do-mar. O objetivo deste estudo é verificar o impacto e importância da salinidade no crescimento e desenvolvimento gonadal nesta espécie. Para isto, foram utilizados 204 *P. lividus* com uma gama de tamanho de 25-35 mm, que foram sujeitos a quatro salinidades diferentes (20, 25, 30 e 35) durante 120 dias, sendo alimentados com uma ração seca desenvolvida com ingredientes de origem vegetal. Os indivíduos sujeitos às salinidades 30 e 35 apresentaram os melhores resultados de taxa de conversão alimentar (1,64 e 1,90, respetivamente), tendo sido estes tratamentos a apresentar melhores resultados de maturação. Foi possível verificar que a salinidade é também um dos fatores determinantes no desenvolvimento e maturação de *P. lividus*, tendo a salinidade de 30 proporcionado o melhor crescimento gonadal, com os indivíduos a apresentar um índice gonadossomático de $17,66 \pm 2,71$ %. Tendo os indivíduos desta salinidade mostrado também uma taxa de crescimento diária e peso ganho superiores em relação às restantes salinidades.

Palavras-Chave: Aquacultura; *Paracentrotus lividus*; Crescimento; Índice Gonadossomático; Cor das gónadas.

Abstract

Sea urchins are highly commercially valued animals. The gonads of these animals, which have been consumed for a long time and considered a delicacy that has a high commercial value. This creates a high demand, which is why sea urchin populations have been under high pressure over the last few decades. Therefore, there's an increase interest in the production of these animals in aquaculture, as a way to respond to this pressure and alleviate their overfishing. The most important factors in the production of these animals in aquaculture is the quality and size of the gonads, with color also being a determinant factor in the attribution of commercial value to these animals. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) is the most consumed sea urchin in Europe, mainly because it has a wide distribution, from the Northeast Atlantic to the entire length of the Mediterranean Sea. Which make it a very common species on the Portuguese coast. The maturation and growth of the gonads of this species are affected by the availability of food, as well as its quality and quantity. In addition, to abiotic factors such as temperature, photoperiod and salinity are also determinant factors. The aim of this study is to verify the impact and importance of salinity on gonadal growth and development in this species. For this, 204 *P. lividus* with a size range of 25-35 mm were used, were subjected to four different salinities (20, 25, 30 and 35) for 120 days and fed with a dry feed developed with vegetable ingredients. The sea urchins maintained in salinities 30 and 35 showed the best results of feed conversion ratio (1.64 and 1.90, respectively), with these treatments also showing the best maturation results. It was possible to verify that salinity is also one of the determining factors in the development and maturation of *P. lividus*, with a salinity of 30 providing the best gonadal growth, with a gonadosomatic index of $17.66 \pm 2.71\%$. With this salinity also showing a higher daily growth rate and weight gain compared to the other salinities.

Keywords: Aquaculture; *Paracentrotus lividus*; growth; Gonadosomatic index; gonad colour.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Aquacultura em Portugal e importância do ouriço-do-mar na aquacultura	1
1.2 Distribuição geográfica de <i>P. lividus</i>	2
1.3 Efeitos da salinidade em ouriços-do-mar	3
1.4 Morfologia de <i>P. lividus</i>	4
1.5 Crescimento e maturação do ouriço-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i>	6
1.6 Alimentação	8
2. Objectivos	11
3. Materiais e Métodos	13
3.1 Recolha dos animais e Acondicionamento	13
3.3 Ensaio de crescimento	14
3.4 Tratamento de dados	15
3.5 Histologia	16
3.6 Análise da cor das gónadas	18
4. Resultados	21
4.1 Diâmetro e Peso	21
4.2 Índice Gonadossomático	24
4.3 Ingestão alimentar e Taxa de conversão alimentar (FCR)	26
4.4 Taxa de crescimento diário e Peso Ganho	28
4.5 Maturação das gónadas	29
4.6 Cor das Gónadas	31
5. Discussão de resultados	35
5.1 Crescimento somático	35
5.2 Alimentação	38
5.3 Peso das gónadas e Índice Gonadossomático	40
5.4 Maturação das Gónadas	41
5.5 Cor das Gónadas	43
6. Conclusões	45
7. Referências	47

Lista de tabelas

Tabela I- Composição aproximada e perfil de ácidos gordos da dieta seca com ingredientes de origem vegetal utilizada durante o ensaio.....	14
Tabela II – Valores de Taxa de conversão alimentar (FCR), Ingestão alimentar (g/ind/dia) (Média ± Desvio-Padrão) e Ingestão alimentar voluntária (g/100g de in/dia) (IAV), dos indivíduos mantidos nas diferentes salinidades em teste, 20, 25, 30 e 35, no final dos 120 dias.....	25
Tabela III - Resultados do Peso ganho (PG) (g/dia) (Média ± Desvio-Padrão) e Taxa de Crescimento Diário (DGR) (%/Dia) (Média ± Desvio-Padrão), nos ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> nas diferentes salinidades 20, 25, 30, 35, ao longo dos 120 dias de ensaio.....	27
Tabela IV- Valores de L*, a* e b*, das gónadas de <i>P. lividus</i> a 60 dias (A) e a 120 dias (B), em todos os indivíduos e separadamente para machos (♂) e fêmeas (♀) (média ± Desvio-Padrão). (Diferentes letras representam diferenças significativas entre tratamentos).....	30

Lista de Figuras

- Figura 1** – Representação esquemática da morfologia interna (A e B) e externa (C e D) de um ouriço-do-mar. Onde Am e In representam as placas ambulacrárias e placas interambulacrárias, respetivamente (Adaptado de Mottet, 1976).....5
- Figura 2** - Representação gráfica do espaço de cor CIELab. (Adaptado de Chien e Bino, 2020).....18
- Figura 3**- Diâmetro (mm) (média \pm Desvio-Padrão) (A) e Peso (média \pm Desvio-Padrão) (B) de *P. lividus*, nos diferentes momentos de amostragem, 0 dias (T0), 60 dias (T1) e 120 dias (T2), para as diferentes salinidades em teste 20, 25, 30 e 35 (As diferentes letras representam as diferenças significativas entre tratamentos).....23
- Figura 4** - Índice Gonadosomático (IG) (%) (Média \pm Desvio-Padrão) de *P. lividus*, aos 60 dias (T1) e 120 dias (T2), para as salinidades 20, 25, 30 e 35. Linha a tracejado representa o IG médio dos ouriços-do-mar amostrados após jejum. (As diferentes letras representam as diferenças significativas entre tratamentos para os diferentes momentos de amostragens).....24
- Figura 5**- (A) Ingestão alimentar (FI) (g/ind/dia) (Média \pm Desvio-Padrão), (B) Taxa de conversão alimentar (FCR) de *P. lividus* obtidos no final do ensaio, nas salinidades de 20, 25, 30 e 35. (Diferentes letras representam diferenças significativas entre sistemas).....26
- Figura 6**- Resultados do peso ganho (PG) (G/ind/dia) (Média \pm Desvio-Padrão) de *P. lividus* alimentados com ração seca com ingredientes de origem vegetal, mantidos a salinidades de 20, 25, 30 e 35 durante 120 dias.....28
- Figura 7**- Cortes transversais de 5 μ m de gónadas de *P. lividus* de macho (A) no estágio de maturação III (prematuro), onde é possível observar espermatozoides maduros (S), fagócitos nutritivos (FN) e ainda espaços vazios (E) e gónada de uma fêmea (A) também no estágio III de maturação (prematuro) onde é possível observar todas as fases de desenvolvimento dos oócitos, como oócitos vitelinos (VO) com o núcleo visível (N), oócitos vitelinos recentes (OR), oócitos maduros (O) e também fagócitos nutritivos (FN).....29
- Figura 8**- Estádios gametogénicos das gónadas de *P. lividus*, no início do ensaio (T0) e no final dos 120 dias para as salinidades 20, 25, 30 e 35. (Estádios de maturação I- Estádio

de recuperação; II- Estádio de crescimento; III- Estágio prematuro; IV- Estádio maduro;
V- Parcialmente desovado e VI- Estádio pós-postura.....29

Figura 9- Valores de L*, a* e b* (A, B e C, respetivamente) (valor médio ± Desvio-
Padrão), das gónadas de *P. lividus*, em gónadas de fêmea e macho para cada tratamento
em teste ao final de 120 dias de ensaio a salinidades de 20, 25, 30 e 35. (Diferentes letras
representam diferenças significativas entre tratamentos, por
sexo).....33

1. Introdução

1.1 Aquacultura em Portugal e importância do ouriço-do-mar na aquacultura

As espécies de ouriço-do-mar têm, normalmente, um grande interesse do ponto de vista comercial devido ao seu elevado valor, principalmente no mercado japonês, que representa cerca de 90% da procura mundial das espécies de ouriço-do-mar. As gónadas são consideradas uma iguaria muito apreciada e valorizada, tendo o seu mercado um peso estimado anual de 70000t de peso húmido, com um valor das suas gónadas que pode variar entre 60 €/Kg e 221 €/Kg (Stefásson et al., 2017).

A crescente procura destes animais e o seu valor de mercado fizeram com que no Japão espécies como *Hemicentrotus pulcherrimus* (Agassiz, 1864), *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1863), *Pseudocentrotus depressus* (Agassiz, 1864) e *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) fossem sobreexploradas, o que levou ao colapso dos stocks no início da década de 70 (McBride, 2005; Andrew et al., 2002). No entanto, o contínuo aumento do consumo desta iguaria fez com que esta procura tivesse que ser saciada por produções e pescas noutros países (Yokota, 2002; Sonu, 2003). Um pouco por toda a Europa também se verificou uma grande diminuição nos stocks de ouriços-do-mar (McBride, 2005). Também o facto de serem animais de lento crescimento e em conjunto com esta elevada pressão, faz com que populações de várias espécies, como é o caso de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) possam ser levadas ao colapso (Sartori et al., 2016). A elevada procura faz com que mais de 80% da produção mundial de ouriço-do-mar tenha como objetivo satisfazer a enorme procura por parte do mercado japonês (FAO, 2015).

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento do número de maternidades de ouriço-do-mar e da produção em cativeiro de ouriços-do-mar em países como Chile, Itália, Noruega, Austrália, Nova Zelândia, China, Escócia, Japão e Irlanda (Carboni et al., 2013). A produção em aquacultura de ouriço-do-mar é muito importante para reduzir esta pressão crescente nos stocks naturais, que têm vindo a ser muito explorados devido ao seu preço e elevada procura (Sun e Chiang, 2015). É necessário também que haja um grande esforço de investigação científica, que tem também crescido nos últimos anos em vários países da Europa, principalmente de *P. lividus* (James e Siikavuopio, 2015). Com

o objetivo principal de conseguir responder à grande procura, fornecendo gónadas de elevada qualidade ao longo de todo o ano e desta forma contornar o problema da sazonalidade presente na dependência de gónadas de ouriços-do-mar selvagens para a obtenção destes produtos (Carboni et al., 2012).

P. lividus, também conhecido como ouriço-do-mar comum, é uma espécie que pertence ao filo Equinodermata (Lawrence, 2007) e à família Echinidae, apresenta o corpo coberto de espinhos longos e fortes, com algumas variações de cor como roxo, verde, acastanhada e ainda esbranquiçada (Saldanha, 2003). É o equinoderme mais consumido no mediterrâneo e na Europa (FAO, 2015). Para a produção desta espécie, os fatores mais referidos como sendo os que maior impacto têm no seu crescimento são: a temperatura, a dieta e o fotoperíodo. (Schlosser et al., 2005; Hermans et al., 2010; Sartori e Gaion, 2016; Santos et al., 2019; Santos et al., 2020; Lourenço et al., 2021). Um dos principais problemas da produção em aquacultura de ouriços-do-mar, na atualidade, é utilização de rações com proteína proveniente de farinha de peixe, uma vez que a pesca intensiva de peixe tem vindo a afetar os ecossistemas marinhos (Sartori et al., 2015). No caso da produção de equinodermes, de forma a combater este problema, tem sido utilizado milho, como principal fonte de proteína, que em vários estudos, tem demonstrado bons resultados conseguindo produzir um bom crescimento gonadal, como bom promotor de maturação (Basuyaux e Blin 1998; Luis et al. 2005). Para a produção destes animais é importante uma ração que proporcione um bom crescimento gonadosomático, e gónadas com uma boa cor, textura e sabor sendo estes os fatores mais apreciados e mais valorizados comercialmente (McBride et al., 2004; Shpigel et al., 2005). Apesar da cor das gónadas de ouriço-do-mar ser uma característica muito variável, dependendo de vários fatores, é sempre uma característica determinante na valorização comercial destes animais, sendo geralmente mais valorizadas fortes colorações amarelas e cor de laranja (Robinson et al., 2002; McBride et al., 2004; Shpigel et al., 2005; Kelly e Symonds, 2013; Stefásson et al., 2017).

1.2 Distribuição geográfica de *P. lividus*

P. lividus apresenta uma ampla distribuição, sendo possível encontrá-la ao longo de toda a costa da Europa no Nordeste Atlântico até ao Sul de Marrocos, incluindo o Arquipélago dos Açores e da Madeira e Ilhas Canárias, bem como na costa do Mar Mediterrâneo (Tortonese, 1965; Alves et al., 2001; Boudouresque e Verlaque 2013).

Encontra-se principalmente em zonas rochosas de intertidal e subtidal (Fernandez, 1997; Hayward e Ryland, 1990; San Martin, 1995; Boudouresque e Verlaque, 2007), entre os 0 e os 30 metros de profundidade (Mortensen, 1927), no entanto a sua abundância tende a baixar a partir dos 10 metros (Chelazzi et al., 1997). Isto faz com que o intervalo de temperaturas da água do mar esteja compreendido principalmente entre 10 a 15 °C no inverno, podendo suportar temperaturas máximas de 25 °C no verão, no mediterrâneo (Mortensen, 1943; Bacallado et al., 1985; Le Gall et al., 1990; Fernandez e Caltagirone, 1994; Fernandez, 1996). É uma espécie bastante resistente a variações ambientais, uma vez que está constantemente sujeita a variações de salinidade e temperatura, bem como a falta de alimento e elevado hidrodinamismo, mostrando uma elevada tolerância a estes fatores (Allian, 1975; Le Gall et al., 1989; Fernandez, 2013; Hereu, 2005). É uma espécie que se encontra com abundância ao longo de toda a costa portuguesa (Gago et al., 2003; Bertocci et al., 2012; Jacinto et al., 2013).

O Oceano Atlântico e o Mar Mediterrâneo apresentam uma salinidade superficial entre 34 e 39 (Reverdin et al., 2007; Hermans et al., 2010). No entanto, o facto destes animais habitarem em zonas de poças de maré, onde a salinidade varia com bastante frequência dependendo da altura do ano, como em épocas de chuva no inverno, baixando bruscamente este parâmetro e no verão com o aumento da temperatura existe um aumento de salinidade, devido à evaporação da água das poças (Stickle e Denoux, 1976).

1.3 Efeitos da salinidade em ouriços-do-mar

Apesar da sua elevada resistência a uma ampla gama de salinidades, são animais que têm pouco controlo sobre a osmolaridade corporal, por norma são animais considerados estritamente marinhos, no entanto, é possível encontrar algumas espécies em ambientes eurialinos (Lawrence, 1975; Himmelman et al., 1983).

As alterações climáticas podem causar não só um aumento do nível da água do mar e na temperatura dos oceanos, como também problemas inesperados relacionados com a acidificação dos oceanos e diminuição da salinidade (Limatola et al., 2020). Podendo estas variações levar também a uma redução da fertilidade dos ouriços-do-mar (Foo e Bryne, 2017; Limatola et al., 2020), uma vez que estes organismos realizam fecundação externa e estão dependentes da qualidade da água para a interação dos gametas (Meijer e Guerrier, 1894; Vacquier, 2011). Provocando uma maior

pressão na macrofauna que habita em zonas intertidais e estuarinas, que estão constantemente sujeitas a alterações ambientais (Fernandez et al., 2006).

Algumas espécies têm expandido a sua distribuição para zonas estuarinas, onde ocorrem variações de salinidade de forma frequente (Stickle e Diehl, 1987). No entanto, os ouriços-do-mar mais pequenos e em fases larvares têm uma baixa tolerância a variações de salinidade, principalmente quando se trata de descidas bruscas deste parâmetro (Goodbody, 1961; Lawrence 1975; Roller e Stickle, 1993). Estas diminuições de salinidade estão associadas a chuvas intensas e, no caso de zonas estuarinas, a descargas de água doce (Lawrence 1996), podendo estas descargas ou chuvas elevadas provocar danos à vida marinha (Fernandez et al. 2006; Carballeira et al., 2011). Em *P. lividus* é possível observar mortalidade quando sujeitos a uma exposição prolongada a salinidade de 15-20, contudo, uma diminuição severa deste parâmetro para 5-17 provoca elevada mortalidade (Le Gall, 1989; Boudouresque e Verlaque, 2001). Sendo por isto importante aferir a tolerância desta espécie a baixas salinidades.

1.4 Morfologia de *P. lividus*

Os ouriços-do-mar apresentam, normalmente, um corpo constituído por placas esqueléticas rígidas, que formam um corpo em forma de globo achatado aboralmente, unidas por uma camada de colagénio e interdigitações de calcite (Brusca e Brusca, 2003). É formado por várias placas distintas, cinco placas ambulacrárias ou radiais, onde se situam os pés ambulacrários (Figura 1), são estruturas extensíveis para o exterior da carapaça que estes animais utilizam para se fixar, através de características adesivas, para a sua locomoção e têm também a funções sensoriais como o tato, os pés ambulacrários possuem também órgãos fotorreceptores, o que faz com que os ouriços-do-mar tenham a capacidade de reagir ao fotoperíodo, tornando o fotoperíodo um dos fatores relevantes na maturação destes animais (Shpigel et al., 2004; Raible et al., 2006; Lesser et al., 2011). Possuem também cinco as placas interambulacrárias ou inter-radiais, onde se situam os espinhos duros (Figura 1), que são utilizados para capturar alimento, para a sua locomoção e são também o principal mecanismo de defesa contra predadores (Guidetti et al, 2005; Sartori, 2013). Na parte oral encontra-se a Lanterna de Aristóteles, esta funciona como o maxilar do animal, é uma estrutura extremamente complexa. Esta é formada por 5 dentes capazes de rasgar materiais resistentes, como por exemplo a

cobertura de plástico em armadilhas de lagostas (Hyman, 1955), está coberta por uma fina membrana e por placas, esta possui cinco dentes, que são utilizados para a ingestão de alimento (Martinell et al., 1981; Sartori, 2013). O celoma, é a cavidade interna e é onde se encontram os órgãos internos. Estes animais possuem um sistema digestivo longo com um único tubo, com várias dobras que percorre, a boca até ao ânus passando pela faringe, estômago e intestino. A extremidade o ânus é protegida por placas de cálcio chamadas de periprocto (Smith e Kroh, 2013). Possuem também cinco pares de brânquias externas em volta da membrana peristomial, que são responsáveis por realizar trocas gasosas com o meio, no entanto estas trocas são maioritariamente asseguradas pelos pés ambulacrários (Fermentarian, 1966). Apresentam cinco gónadas situadas no interior das placas interambulacrárias, com uma coloração forte amarela, alaranjada e até vermelha (Sphigle et al., 2005; Carboni, 2013). Quando estão maturadas preenchem uma grande parte do interior do organismo (Walker, 1979; Sartori, 2013). O tamanho das gónadas é dependente de vários fatores abióticos como a salinidade, temperatura e fotoperíodo bem como a disponibilidade de alimento e sazonalidade, sendo por isto, pouco preciso determinar o seu tamanho através do tamanho da carapaça do animal (Shpigel et al., 2004; Boudouresque e Verlaque, 2007) . Na parte superior do corpo onde termina o sistema digestivo no ânus é onde se encontram também os cinco gonopóros, um para cada gónada por onde são libertados os gâmetas (Sartori, 2013).

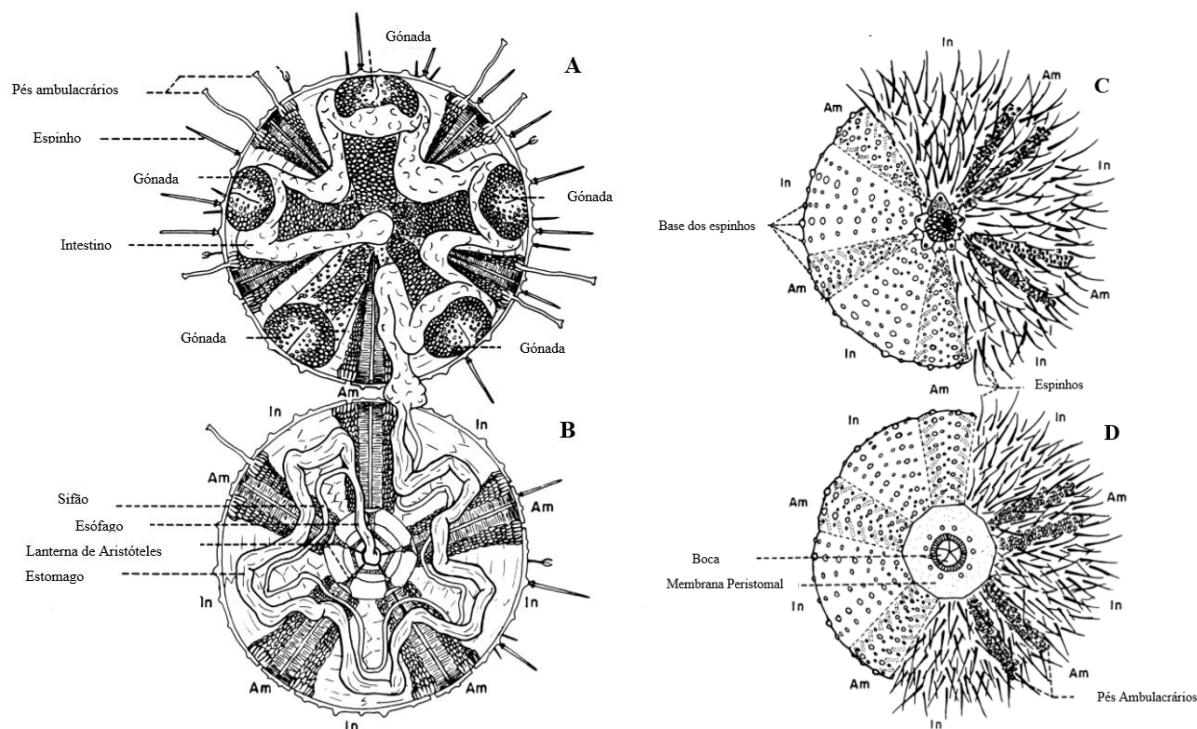


Figura 1 – Representação esquemática da morfologia interna (A e B) e externa (C e D) de um ouriço-do-mar. Onde Am e In representam as placas ambulacrárias e placas interambulacrárias, respetivamente (Adaptado de Mottet, 1976).

1.5 Crescimento e maturação do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*

O desenvolvimento embrionário de *P. lividus* é rápido, passando a larvas pluteus independentes em poucos dias. Esta é uma fase pelágica que pode durar entre 23 e 29 dias no meio natural, no entanto este tempo pode ser reduzido em aquacultura, fornecendo alimento ilimitado e temperatura adequada (Pedrotti, 1993; Lozano et al., 1995; Rahman et al., 2009; Wangensteen et al., 2013; Gomes et al., 2021). As larvas da maior parte das espécies de ouriços-do-mar são pelágicas independentes, nas maternidades é comum usar como alimento espécies de microalgas como, *Dunaliella* sp., *Chaetoceras* sp., *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas* sp., e *Phaeodactylum tricornutum* (Brown e Eddy, 2015, Gomes et al., 2021). Estando o desenvolvimento larvar principalmente limitado pela disponibilidade de alimento e fatores ambientais como a temperatura (Fenaux et al., 1994, Liu e Chang, 2015). Após realizarem as várias metamorfoses e assentarem passam posteriormente a animais bentónicos (Metaxas, 2013). O assentamento está maioritariamente relacionado com a agitação marítima e correntes, que influencia o tempo necessário que para que este se realize, e o tempo até ao assentamento pode ser diminuído em aquacultura (Bourdouresque e Verlaque, 2013). No entanto, nas

maternidades a taxa de sobrevivência destas larvas após o assentamento em alguns casos pode ser inferior a 1% (Mos et al., 2011). Vários estudos mostram que a elevada mortalidade possa estar relacionada com o biofilme e a sua qualidade nutricional, uma vez que esta pode variar de forma considerável, afetando assim esta mortalidade (Xing et al., 2007).

P. lividus são animais gonocóricos, sem dimorfismo sexual, tornando impossível a distinção de sexo através das suas características externas até à altura de reprodução. Uma vez que a fecundação acontece externamente, sendo os gâmetas libertados para a coluna de água, só nessa altura é possível diferenciação do sexo destes animais de forma não evasiva (Allain, 1975). Na altura da reprodução, com a maturação das gónadas, estas tendem a aumentar substancialmente o seu volume, atingindo um conteúdo em gónadas entre 15% (Machado et al., 2019) e 18% (Rocha et al., 2019). Esta fase tem muita importância na produção destes animais, uma vez que é este o órgão de interesse comercial. São capazes de atingir a maturação após o assentamento em 5 meses em cativeiro, quando sujeitos a um conjunto de condições específicas (Cellario e Fenaux, 1990), no entanto, como no meio natural estes animais estão sujeitos a variações constantes de condições ambientais este tempo é muito variável (Dincer e Cakli, 2007).

Os ouriços-do-mar são animais que têm um crescimento muito lento, um indivíduo que apresente um diâmetro de 20 mm considera-se que tenha em média 2 anos de idade, com 40 mm assume-se que tem entre 4 e 5 anos, crescendo cerca de 10 mm por ano (Turon et al. 1995; Fernandez 1996; Grosjean et al. 1996; Sellem et al. 2000; Gago et al. 2003; Grosjean et al. 2003). Os indivíduos desta espécie são capazes de atingir um diâmetro máximo de 75 mm (Byrne, 1990). No entanto, consideram-se adultos a partir dos 30 mm (Ouréns *et al.*, 2011). O seu crescimento varia dependendo da sua localização, uma vez que a sua taxa de crescimento está diretamente relacionada com a temperatura. A taxa de crescimento aumenta com o aumento da temperatura até atingir os 22 °C em cativeiro, verifica-se uma maior taxa de crescimento quando a temperatura da água se encontra entre 12 e 18 °C normalmente na altura da primavera (Azzolina, 1988; Fernandez e Caltagirone, 1994; Turon et al., 1995; Shpigel et al., 2004; Boudouresque and Verlaque, 2013), aos 24 – 28 °C começa a ser observado um impacto negativo no crescimento (Le Gall et al., 1990; Santos et al., 2020).

Por exemplo, na costa italiana no Mar Mediterrâneo, a época reprodutiva dura geralmente de outubro a junho com o aumento da temperatura. O pico de maturação é

observado entre dezembro e março, nesta altura a percentagem de indivíduos maturados pode atingir os 100% (Byrne, 1990), como acontece em muitas populações ao longo da costa mediterrânea (Allain, 1975; Spirlet et al., 1998).

Quanto à maturação das gónadas é possível identificar 6 estádios de maturação ao longo do ano, tais como, recuperação (I), em crescimento (II), prematuro (III), maturo (IV), parcialmente desovado (V), reabsorção (VI) (Byrne, 1990). A qualidade da gónada e o seu estágio de maturação, tanto para consumo como para a reprodução do animal depende muito do alimento, especialmente do seu perfil de ácidos gordos e é também influenciada por fatores ambientais a que os animais estão sujeitos, como a temperatura e salinidade (Arafa et al., 2012; Carboni et al., 2013; Raposo et al., 2019; Santos et al., 2019).

Para a comercialização as gónadas idealmente apresentam uma coloração intensa laranja-amarela provocada por carotenoides, que são responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarela e os animais são capazes de alterar estas moléculas através de oxidação (Shpigel et al., 2005). Que é sintetizado pelos ouriços-do-mar a partir de β -caroteno (Shina et al., 1978; Goodwin, 1984; Matsuno e Tsushima, 2001). Em alguns casos ouriços-do-mar em aquacultura alimentados com dietas artificiais produzem gónadas de grandes dimensões, mas pálidas (McBirde et al., 1997, 2004; Lawrence et al., 1997; Barker et al., 1998; Walker e Lesser, 1998; Pearce et al., 2004). Gónadas com estas características perdem o interesse comercial, uma vez que assim todo o seu valor comercial é reduzido ou até mesmo nulo, o que se torna inaceitável a nível de sustentabilidade económica em aquacultura (Lawrence et al., 1995; Robinson e Colborne, 1998; Watts et al., 1998; McLaughlin e Kelly, 2001). No entanto, como foi demonstrado por Shpigel (2005), as rações preparadas têm um grande potencial de utilização em aquacultura uma vez que promovem um bom crescimento das gónadas e, consequentemente, um bom índice gonadossomático.

O crescimento e reprodução estão também relacionados com a quantidade e qualidade de alimento disponível, sendo muito importante fornecer alimento de boa qualidade e em quantidades adequadas, de forma a manter um equilíbrio, uma vez que uma alimentação de baixa qualidade provoca uma menor taxa de crescimento (Briscoe e Sebens, 1988; Caltagirone et al., 1992; William e Harris, 1998).

1.6 Alimentação

Os ouriços-do-mar são capazes de manter uma alimentação omnívora no caso de existirem limitações na disponibilidade de alimento (Briscoe e Sebens 1988; Nestler e Harris, 1994). No entanto, estes têm um maior crescimento quando estão sujeitos a uma alimentação com um maior nível de proteína vegetal (Williams e Harris, 1998; Lawrence et al., 2001; Watts et al., 2010; Lourenço et al., 2021).

P. lividus é uma espécie maioritariamente herbívora, tendo como alimento preferencial macroalgas e plantas vasculares aquáticas, como *Laminaria* sp. e *Codium* sp. (Benedetti-Checchi et al., 1998; Abraham, 2007), que estão presentes naturalmente no seu habitat (Neil e Pastor, 1973; Verlaque 1987). No entanto, o fator determinante para a sua alimentação é a disponibilidade de alimento (Larson et al., 1980), uma vez que, no seu meio natural é comum o alimento estar disponível apenas de forma esporádica através seu movimento na coluna de água, dependendo assim de encontros esporádicos com o seu alimento (McCarron et al., 2009). No caso da disponibilidade de macroalga não ser limitante os ouriços-do-mar comem incessantemente. Quando isto acontece, o tempo de passagem pelo sistema digestivo é bastante baixo, entre 8 e 12 horas (Lasker e Giese, 1954).

É também considerada uma espécie com hábitos de alimentação maioritariamente noturnos (Dance, 1987; Boudouresque e Verlaque, 2001), no entanto, em algumas zonas estes animais demonstram, um comportamento oposto, como na Irlanda, em Lock Hyne, onde estes demonstram um comportamento de alimentação diurno de forma a evitar predadores noturnos (Barnes e Crook, 2001), o que mostra a versatilidade desta espécie.

A alimentação tem um papel fundamental na regulação do ciclo reprodutivo destes animais, está provado que o desenvolvimento e crescimento das gónadas estão diretamente relacionados com a disponibilidade de alimento, qualidade do alimento e também a quantidade (Fernandez et al., 1995; Boudouresque e Verlaque, 2013). Por isto um dos principais desafios na manutenção destes animais em cativeiro é a determinação do alimento ótimo, ou o alimento mais rentável (Cirino et al., 2017).

Com o contínuo crescimento da aquacultura nos últimos anos, a utilização de macroalgas, sejam elas processadas ou não, torna-se insustentável quando se trata de produções em sistemas de recirculação de água ou em produções de grande escala que necessitem de um maior nível de controlo e investimento, devido aos custos associados a estes tipos de produção (Basuyaux e Blin, 1998; FAO, 2016; C.M. Pearce, Dagget e Robinson, 2002; Schiener et al., 2015). Atualmente ainda são apanhadas grandes

quantidades de macroalgas no meio selvagem para utilizar como alimento de ouriços-do-mar, apesar desta prática ser pouco sustentável tanto a nível económico como ambiental (Basuyaux e Blin, 1998; Vizzini, Vaccaro e Mazzola, 2015). Por isto, é importante optar por um cultivo destas macroalgas (Carboni, 2013), ou a utilização de fontes alternativas de proteína mais económicas na forma de rações preparadas, tendo sempre em conta os requisitos nutricionais da espécie, utilizando por exemplo ingredientes de origem vegetal, provenientes de produtos agrícolas descartados não processados, como milho, espinafres, beterraba e couve, por exemplo (Basuyaux e Blin, 1998; Vizzini, Vaccaro e Mazzola, 2015, Sartori et al., 2015; Sartori et al., 2016).

2. Objetivos

Este estudo realizou-se com o objetivo de verificar a potencialidade da produção de *Paracentrotus lividus* em zonas de menor salinidade, como zonas estuarinas e zonas de ria, onde grande parte da aquacultura portuguesa está localizada e verificar a sua tolerância a uma gama de salinidades mais baixas. Desta forma, estudou-se o efeito da salinidade na ingestão alimentar, taxa da conversão alimentar, taxa de crescimento diária, peso ganho, no índice gonadossomático, maturação e cor das gónadas de *P. lividus*, sujeitos a 4 salinidades distintas. Para cumprir este objetivo foram testadas as salinidades 20, 25, 30 e 35. Para verificar se existia algum impacto da salinidade no crescimento e maturação dos ouriços-do-mar e verificar a possibilidade de produzir e manter estes ouriços-do-mar nestas salinidades. Os ouriços-do-mar foram alimentados com uma ração seca com ingredientes de origem vegetal, avaliando também a performance de uma ração com ingredientes alternativos na produção desta espécie em aquacultura.

3. Materiais e Métodos

3.1 Recolha dos animais e Acondicionamento

A recolha dos animais selvagens foi realizada no dia 19 de novembro de 2020, sendo recolhidos 240 indivíduos *P. lividus* com um diâmetro entre 25 e 35 mm. Estes foram recolhidos durante a maré baixa numa zona rochosa intertidal, na zona da praia da Consolação em Peniche, Portugal (39° 19.354' N, 9° 21.548' W). Os animais foram transportados para o laboratório de aquacultura do MARE- Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, do Politécnico de Leiria. Foram aclimatizados num tanque de 200L com recirculação de água, com arejamento constante, de forma a garantir circulação da água e uma boa saturação de oxigénio e filtração, realizada com o auxílio de um escumador de proteínas Bubble Magus C3.5 (Jiyang Aquarium Equipment Co., Ltd., Jiangmen, China). Realizaram-se trocas parciais de água de cerca de 60% do volume total três vezes por semana, de forma a manter as condições ótimas de qualidade da água. Os animais capturados foram submetidos a um período de jejum à temperatura ambiente durante 15 dias, para promover a reabsorção das gónadas (Spirlet et al., 1998b; Santos et al., 2020)

Após o período de jejum todos os indivíduos foram medidos e pesados numa balança de precisão Adam PGL 3002 (Adam Equipment Co. Ltd, Milton Keynes, UK) (peso húmido (g) \pm 0,01g). Foram também selecionados aleatoriamente 36 indivíduos, que foram sacrificados, para que fossem pesadas as suas gónadas (peso húmido (g) \pm 0,01g) de forma a calcular o índice gonadossomático (IG) inicial.

3.2 Desenho experimental

Os 204 *P. lividus* foram distribuídos por 12 tanques de 40L cada (17 indivíduos por tanque). Em sistemas de recirculação de água (RAS) com 3 tanques cada. Foi utilizada uma salinidade por sistema, tendo sido utilizadas 4 salinidades distintas: 20, 25, 30 e 35, resultando num total de 51 *P. lividus* por salinidade, e mantidas durante 120 dias.

Cada sistema RAS está equipado com um filtro de 70L com escumador de proteína Bubble Magus Needle wheel (Jiyang aquarium Equipment, China), biobolas de plástico, uma esponja e lã de vidro, uma bomba de retorno Reef Pump 2000 com uma capacidade de 1000 l/h (TMC, Lisboa, Portugal) e com arejamento constante, sendo cada sistema constituído por um volume total de 190L.

Os parâmetros de qualidade da água foram medidos três vezes por semana. Para a medição da temperatura (°C), salinidade, pH e oxigénio dissolvido (OD) (%) foi utilizada a sonda multiparamétrica YSI Pro Plus (YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA), para a medição de amónia e nitritos (mg/L) foram utilizados kits colorimétricos (API, Mars Fishcare Inc., EUA). Ao longo do período de acondicionamento, os valores médios de temperatura, oxigénio dissolvido e pH foram: $18,43 \pm 0,22$ °C, $94,32 \pm 0,57$ % e $8,20 \pm 0,03$, respetivamente, enquanto os valores da amónia e nitritos foram mantidos sempre inferiores ao limite crítico da espécie (Basuyaux e Mathieu, 1999; Camargo et al., 2005). Foi mantido um fotoperíodo constante de 10h (luz) : 14h (escuridão).

3.3 Ensaio de crescimento

No início do ensaio, os ouriços-do-mar (N = 204) tinham em média um diâmetro (D) de $31,20 \pm 2,09$ mm e um peso (P) médio de $13,80 \pm 3,02$ g. Após o jejum os animais foram alimentados 3 vezes por semana com uma dieta seca, 2% da biomassa total de cada tanque, valor semelhante ao utilizado por outros autores que utilizaram também ração seca (Cirino et al., 2017). Este valor corresponde a aproximadamente 7 grãos de ração uma vez que cada um tem um peso médio de 0,71g. Os grãos de ração eram ainda distribuídos de forma homogénea, para fazer chegar alimento da melhor maneira possível a todos os indivíduos e garantir que todos tinham o mesmo acesso ao alimento.

A água utilizada no ensaio foi preparada previamente, utilizando água de captação de profundidade, com uma salinidade aproximada de 32, e água doce de forma a baixar a salinidade para as salinidades de 20, 25 e 30. No caso do sistema com a salinidade de 35 foi utilizado um sal comercial *ReefSalt* (Aquaforest, Polónia), para aumentar a salinidade.

Em todos os tratamentos foi utilizada uma ração seca produzida em SPAROS (Olhão, Portugal), com ingredientes provenientes de vegetais terrestres, incluindo concentrado de soja, farinha de soja e glúten de trigo (Tabela I).

A ração não consumida foi removida 48h após a alimentação, com auxílio de um crivo, para ser contabilizada a ingestão de alimento. O alimento não ingerido foi recolhido antes da seguinte alimentação no momento da troca parcial de água do sistema. Este alimento não ingerido colocado numa estufa a 105 °C durante 24 horas (Siikavuopio et al., 2007), e posteriormente pesado de forma a calcular a ingestão em cada aquário.

Foi realizada uma amostragem intermédia aos 60 dias de ensaio, onde foram registados o diâmetro (mm \pm 0,1 mm) e o peso húmido (g \pm 0,01g) da totalidade dos ouriços-do-mar, de forma a compreender melhor o efeito dos tratamentos no crescimento.

Tabela I- Composição aproximada e perfil de ácidos gordos da dieta seca com ingredientes de origem vegetal utilizada durante o ensaio.

Lípidos (% PS)		9,40
Proteína (% PS)		31,32
Hidratos de carbono (% PS)		46,22
Humidade (%)		4,99
Matéria seca (%)		95,00
Cinzas (%)		13,06
Ácidos gordos	C14	8,49
	C16	35,85
	C16:1n7	6,06
	C18	7,46
	C18:1n9	30,91
	C18:2n6	11,22

3.4 Tratamento de dados

- a) A ingestão alimentar (g/ind/dia) (FI) foi calculada utilizando o peso alimento fornecido seco (g) e do alimento não ingerido seco (g) (Siikavuopio et al., 2012), após secagem do alimento não ingerido a 105 °C numa estufa durante 24 horas:

$$FI = \frac{(\text{Alimento fornecido} - \text{Alimento não ingerido})}{n^{\circ} \text{ de individuos}} / t \quad (\text{eq. 1})$$

- b) A taxa de conversão alimentar (FCR) foi determinada utilizando o Peso do alimento ingerido (g) e o peso ganho dos ouriços-do-mar ao longo do ensaio (g) (Siikavuopio et al., 2012), em cada salinidade em teste:

$$FCR = \frac{\text{Peso de alimento ingerido}}{\text{Peso ganho}} \quad (\text{eq. 2})$$

- c) A ingestão alimentar voluntária (g/100g de ind /dia) (IAV), utilizando o alimento ingerido (g), o peso médio húmido dos ouriços-do-mar (g) e onde t corresponde ao tempo (dias) (Lourenço et al., 2021):

$$IAV = 100 \times \frac{(\text{Alimento ingerido}/\text{Peso médio})}{t} \quad (\text{eq.3})$$

- d) Foi calculado o peso ganho (g) (PG) onde P_{final} e P_{inicial} correspondem ao peso médio húmido final e inicial dos ouriços-do-mar (g) e t representa o tempo (dias):

$$PG = \left(\frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{t} \right) \quad (\text{eq.4})$$

- e) Taxa de crescimento diário (%/dia) (DGR) Foi determinada através da seguinte formula onde P_{final} e P_{inicial} correspondem ao peso húmido final e inicial dos ouriços-do-mar, respetivamente, e t corresponde ao tempo (dias):

$$DGR = \left[\left(\frac{P_{\text{final}}}{P_{\text{inicial}}} \right)^{1/t} - 1 \right] * 100 \quad (\text{eq.5})$$

- f) O índice gonadossomático (%) (IG) foi calculado utilizando o peso húmido das gónadas (g) e o peso húmido dos ouriços-do-mar (Sartori and Gaion, 2015; Carboni et al., 2015):

$$IG = \frac{\text{Peso húmido das gónadas}}{\text{Peso húmido total}} * 100 \quad (\text{eq.6})$$

3.5 Histologia

Para a análise histológica foram amostrados 36 indivíduos no início do ensaio (T0), 72 indivíduos na amostragem intermédia (T1) (6 ind/tanque) e no final do ensaio (T2) foram amostrados 132 (11 ind/tanque).

Em todas as amostragens as gónadas recolhidas foram colocadas numa solução de formalina a 4% durante 48 horas. Após este período foram transferidas para uma solução de etanol a 70%, sendo armazenadas até ao processamento. As amostras foram processadas num processador de tecidos automático Leica TP1020 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), seguidas de ciclos de desidratação em soluções de etanol com concentrações crescentes. Após este procedimento as amostras passaram por xilol, seguidos de impregnação em parafina. Posteriormente realizaram-se os blocos de parafina utilizando uma placa fria Kunz Instruments CP-4 (Kunz Instruments, Dinamarca). Os cortes foram realizados com uma espessura de 5 µm, utilizando um micrótomo Accu-Cut® SMR™ 200 (Sakura Finetek Europe BV, Holanda). A coloração das amostras foi realizada utilizando soluções de hematoxilina (Scharlab S.L., Sentmenat, Barcelona, Espanha), eosina Y (VWR International, Leuven, Bélgica), xilol e diferentes concentrações de álcool. A análise destes cortes foi realizada através de um microscópio ótico Leica® DM 2000 LED equipado com uma câmara de microscópio Leica® MC170 5MP HD e com o software LAS V4.4.0 (Leica Application Suite).

Foi utilizada a caracterização das fases de maturação segundo Bryne (1990):

Estádio I- Fase de recuperação: Nesta fase as gónadas apresentam gâmetas primários aglomerados ao longo da parede ascinal. **Estádio II-** Em crescimento- nesta fase dá-se o início da vitelogénese, existe um aumento do tamanho oócitos primários através da absorção de fagócitos nutritivos e as gónadas aumentam também de tamanho. **Estádio III-** prematuro: nesta fase estão presentes todas as fases de desenvolvimento dos oócitos rodeados por fagócitos nutritivos, os oócitos que se encontram maduros deslocam-se para o lúmen. **Estádio IV-** maduro: as gónadas estão cheias de oócitos maduros, nesta fase há uma redução do número de fagócitos nutritivos e a parede ascinal é muito fina. **Estádio V-** “Parcialmente desovados”: os gâmetas encontram-se mais soltos e com alguns espaços vazios. **Estádio VI-** Fase pós-postura: nesta fase as gónadas apresentam uma parede ascinal fina, a gónada perde a sua estrutura interna e existem vários espaços vazios entre oócitos não libertados.

3.6 Análise da cor das gónadas

Foi também realizada a medição quantitativa da cor das gónadas amostradas, tendo sido amostrados 18 indivíduos por tratamento na amostragem intermédia (T1), tendo sido recolhidos 6 indivíduos aleatoriamente de cada tanque e no final do ensaio (T2) foram amostrados 33 indivíduos por tratamento. Esta medição foi realizada através do sistema de cor CIELab, utilizando um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Tóquio, Japão), utilizando o iluminante padrão D65 e o grau de observador padrão de 2°, recorrendo à utilização do software SpectraMagic™ NX Color (Konica Minolta, Tóquio, Japão), de forma a determinar as coordenadas de cor $L^*a^*b^*$, correspondendo L^* à luminosidade, estando compreendida entre 0 (preto) e 100 (branco), o valor de a^* e b^* correspondem às coordenadas verde (-60)-vermelho (+60) e azul (-60) – amarelo (+60), respetivamente (Woods et al., 2008) (Figura 2). Foram analisados e comparados os resultados dos valores de L^* , a^* e b^* de todos os indivíduos em geral e foram também comparados os resultados destes valores em macho e fêmeas, depois da identificação através da análise histológica.

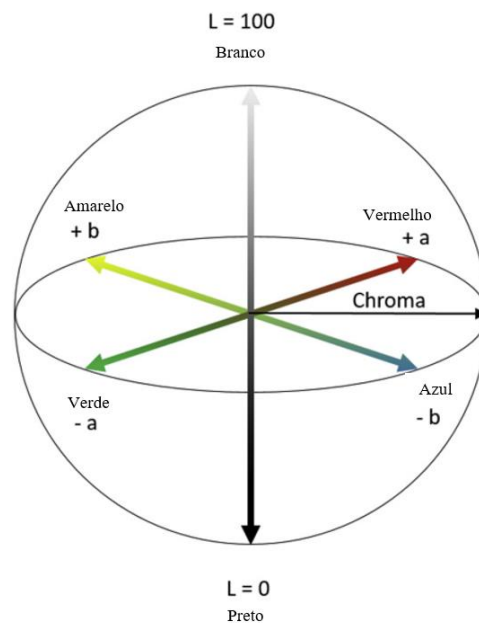


Figura 2 - Representação gráfica do espaço de cor CIELab. (Adaptado de Chien e Bino, 2020)

3.7 Análise de Dados

As representações gráficas foram todas realizadas em *Microsoft Office Excel* (Versão 2109). As análises estatísticas de todos os resultados deste ensaio foram realizadas no software IBM SPSS™ versão 27 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA).

Os resultados foram apresentados como valor médio \pm desvio-padrão, sempre que adequado. Na análise estatística foi utilizado um valor de significância $\alpha = 0,05$.

O diâmetro da carapaça, o peso e cor foram avaliados em 3 momentos de amostragens, no início da amostragem, aos 60 dias e aos 120 dias. O índice gonadosomático foi calculado inicialmente, a partir de uma amostra inicial de 36 indivíduos, foi calculado aos 60 dias onde foram sacrificados 18 indivíduos por salinidade e na amostragem final onde foram todos os indivíduos amostrados. Os resultados foram comparados entre os 4 tratamentos, existindo 3 replicados para cada salinidade em teste (20, 25, 30 e 35). A análise destes resultados foi realizada para cada momento de amostragem, sendo comparados os diferentes tratamentos, tendo sido feita uma ANOVA de um fator, caso os valores apresentassem todos os requisitos de homogeneidade de variâncias e distribuição normal. No caso de serem observadas diferenças significativas foi realizado um teste de comparações múltiplas, utilizando o post-hoc teste de Tukey (onde p corresponde ao nível de significância). Quando os requisitos de homogeneidade de variâncias e normalidade de distribuição não se verificaram, foi realizado um teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

No caso dos resultados de ingestão alimentar, taxa de conversão alimentar, taxa de crescimento diário não foram apresentados valores intermédios sendo apenas apresentados os valores obtidos no final dos 120 dias, no entanto os procedimentos de análise de resultados foram idênticos aos referidos anteriormente.

4. Resultados

4.1 Diâmetro e Peso

Quanto ao diâmetro em T0 não se verificaram diferenças no diâmetro médio (mm) dos indivíduos sujeitos às diferentes salinidades. Tendo sido observado os seguintes diâmetros: $31,18 \pm 2,29$ mm (20), $31,26 \pm 1,90$ mm (25) $31,25 \pm 2,25$ mm (30) e $31,10 \pm 1,93$ mm (35) (Figura 3A). Garantindo desta forma o início do ensaio com diâmetro idêntico dos indivíduos nos quatro sistemas em teste ($p = 0,980$).

De T0 para T1 nos indivíduos mantidos a 20 de salinidade, verificou-se uma diminuição do diâmetro de *P. lividus*, tendo os animais amostrados a T1 apresentado um diâmetro de $30,54 \pm 2,32$ mm. Nos indivíduos mantidos a uma salinidade de 25 o diâmetro dos indivíduos apresentou um ligeiro aumento, apresentando um diâmetro em T1 de $31,73 \pm 2,02$ mm. Nos indivíduos mantidos a uma salinidade de 30 houve um aumento superior ao verificado nos indivíduos mantidos a 25 de salinidade, tendo os indivíduos apresentado um diâmetro de $32,24 \pm 2,29$ mm. Os indivíduos mantidos a uma salinidade de 35 apresentaram um aumento semelhante, com um diâmetro em T1 de $32,28 \pm 1,95$ mm (Figura 3 A).

Em T1 verificaram-se diferenças significativas no diâmetro da carapaça, entre os indivíduos mantidos a salinidade de 20 em comparação com os indivíduos mantidos nas restantes salinidades, sendo este significativamente inferior aos restantes. ($p = 0,031$ (20-25); $p < 0,01$ (20-30) e $p < 0,01$ (20-35)).

Quando comparando o diâmetro observado em T1 e T2, os indivíduos mantidos na salinidade de 20 demonstraram novamente uma diminuição do diâmetro, no entanto em T1 foram amostrados um menor número de indivíduos. O valor do diâmetro observado nos indivíduos do sistema 20 em T2 foi de $29,75 \pm 2,24$ mm (Figura 3 A). O diâmetro dos indivíduos no sistema com uma salinidade de 25 em T2 foi de $30,52 \pm 1,94$ mm, tendo sido também ligeiramente inferior ao observado em T1 ($31,73 \pm 2,02$ mm). Os ouriços-do-mar mantidos a uma salinidade de 30 demonstraram uma diminuição no diâmetro em relação ao observado em T1, sendo $32,07 \pm 2,43$ mm. Também no Sistema 35 se verificou uma diminuição no diâmetro dos indivíduos, sendo em T2 $31,98 \pm 2,17$ mm.

Quando comparando o diâmetro entre salinidades em T2, neste momento de amostragem os indivíduos mantidos na salinidade 20 apresentaram um diâmetro significativamente inferior quando comparando com os indivíduos mantidos nas salinidades de 30 e 35, ($p < 0,01$). As diferenças observadas entre os indivíduos mantidos nas salinidades 20 e 25 em T1 não foram observadas nesta última amostragem ($p = 0,489$). Foram também observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao diâmetro médio, entre os indivíduos mantidos na salinidade de 25 e os indivíduos mantidos a 30 e 35 de salinidade, sendo este significativamente inferior ($p = 0,025$ e $p = 0,039$, respectivamente). Por fim, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao diâmetro entre os indivíduos mantidos a 30 e 35 de salinidade ($p = 0,999$).

No início do ensaio o peso médio dos ouriços-do-mar era semelhante em todos os sistemas, tendo sido $13,32 \pm 3,13$ g (20), $14,01 \pm 2,96$ g (25), $13,94 \pm 3,34$ g (30) e $13,93 \pm 2,65$ g (35), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os ouriços-do-mar mantidos nas diferentes salinidades ($p = 0,629$) (Figura 3 B).

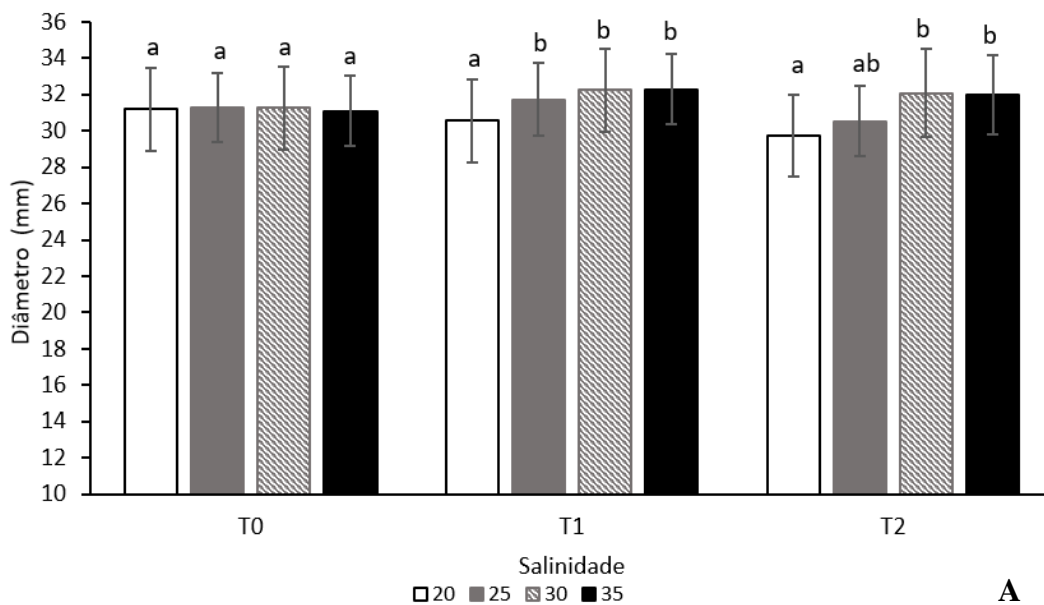
Em T1 os indivíduos mantidos a uma salinidade de 20 apresentaram um peso de $13,52 \pm 2,85$ g sendo semelhante ao peso observado em T0, nos indivíduos mantidos a 25 de salinidade observou-se um ligeiro aumento de peso em relação a T0, $31,73 \pm 2,02$ g. Também nos indivíduos mantidos a 30 e 35 de salinidade foi observado um aumento de peso em relação a T0, superior ao observado nos indivíduos mantidos a 25 de salinidade, tendo sido observado um peso de $32,24 \pm 2,29$ g e $32,28 \pm 1,95$ g nos indivíduos dos sistemas 30 e 35 respectivamente (Figura 3 B).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparando o peso dos indivíduos mantidos na salinidade de 20 com os mantidos a 25 ($p = 0,041$), tendo os indivíduos mantidos a 20 de salinidade um peso significativamente inferior, e diferenças mais acentuadas quando comparando o peso dos indivíduos mantidos a 20 de salinidade com o peso observado nos mantidos a 30 e 35 de salinidade ($p < 0,01$), apresentando os indivíduos mantidos a 20 de salinidade um peso significativamente inferior. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso dos indivíduos mantidos nas salinidades de 25, 30 e 35 ($p > 0,05$) (Figura 3 B).

No último momento de amostragem do ensaio (T2) os indivíduos mantidos a 20 apresentaram uma ligeira diminuição de peso em relação ao observado em T1 apresentando um valor de $12,70 \pm 2,97$ g. Os indivíduos mantidos na salinidade 30

apresentaram um aumento de peso em relação a T1 ($16,33 \pm 3,86$ g). Nos indivíduos mantidos a 25 e 35 de salinidade foi observado uma pequena diminuição de peso médio em relação a amostragem anterior, apresentando em T2 um peso de $14,58 \pm 1,94$ e $15,82 \pm 2,89$ g, respectivamente (Figura 3 A).

Em T2 os indivíduos mantidos na salinidade de 20 apresentaram um peso significativamente inferior quando comparando com os indivíduos mantidos a 30 e 35 ($p < 0,01$). Entre os indivíduos dos mantidos a 20 e 25 de salinidade não se verificaram diferenças significativas no peso ($p = 0,08$). Também não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao peso quando comparando os indivíduos mantidos nas salinidades de 25, 30 e 35 neste momento de amostragem ($p = 0,116$ (25-30), $p = 0,387$ (25-35) e $p = 0,913$ (30-35)).



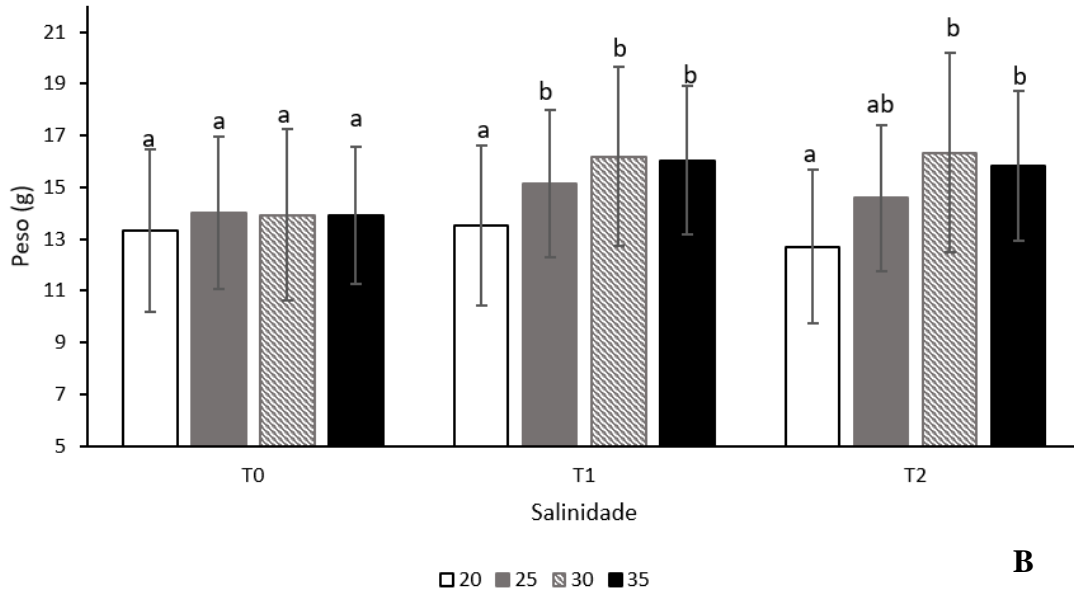


Figura 3- Diâmetro (mm) (média \pm Desvio-Padrão) (A) e Peso (média \pm Desvio-Padrão) (B) de *P. lividus*, nos diferentes momentos de amostragem, 0 dias (T0), 60 dias (T1) e 120 dias (T2), para as diferentes salinidades em teste 20, 25, 30 e 35 (As diferentes letras representam as diferenças significativas entre tratamentos) (T0- n= 36 ind; T1- n= 52 ind/tratamento; T2- n= 33 ind/tratamento)

4.2 Índice Gonadossomático (IG)

Antes de se iniciar o ensaio foram amostrados 36 ouriços-do-mar após o período de jejum, tendo-se observado um valor de IG de $6,32 \pm 2,55$ %.

Em T1 foram amostrados 18 indivíduos por salinidade para o cálculo do índice gonadossomático. Para os indivíduos mantidos a 20 de salinidade, foi obtido um valor de $6,93 \pm 1,93$ %, nos indivíduos mantidos a 25 de salinidade observou-se um IG de $12,04 \pm 3,08$ %, nos indivíduos mantidos a 30 e 35 o IG foi de $11,15 \pm 2,73$ % e $13,36 \pm 3,09$ % em T1, respetivamente (Figura 4).

Na amostragem intermédia (T1), verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos mantidos a 20 de salinidade e os restantes indivíduos, sendo o valor de IG dos indivíduos sujeitos a esta salinidade significativamente inferior ao observado nos indivíduos das restantes salinidades ($p < 0,01$). Os indivíduos mantidos a 25, 30 e 35 não apresentaram diferenças significativas entre si em relação ao valor de IG ($p > 0,05$).

No final do ensaio (T2) foram amostrados 33 indivíduos por salinidade. Nos indivíduos mantidos a 20 de salinidade o IG foi superior ao observado em T1 ($8,66 \pm 3,77$ %). Nos indivíduos mantidos nos sistemas 25, 30 e 35 também se verificou um aumento em relação ao momento anterior (T1) (25: $14,53 \pm 3,48$ %; 30: $17,66 \pm 2,71$ %; 35: $13,36 \pm 3,09$ %) (Figura 4).

No final do ensaio, nos indivíduos mantidos na salinidade 20 o IG foi significativamente inferior em relação ao observado nos indivíduos mantidos nas restantes salinidades ($p < 0,01$). Verificaram-se também diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos do Sistema 25 e 30 ($p < 0,01$), observando-se um IG significativamente inferior nos indivíduos mantidos a 25 de salinidade. Comparando os indivíduos mantidos a 25 de salinidade com os mantidos a 35 não se verificaram diferenças significativas no IG ($p = 0,467$). O IG observado em T2 nos indivíduos mantidos no sistema a 30 de salinidade foi significativamente superior em relação ao observado nos indivíduos mantidos a 35 de salinidade ($p < 0,01$) (Figura 4).

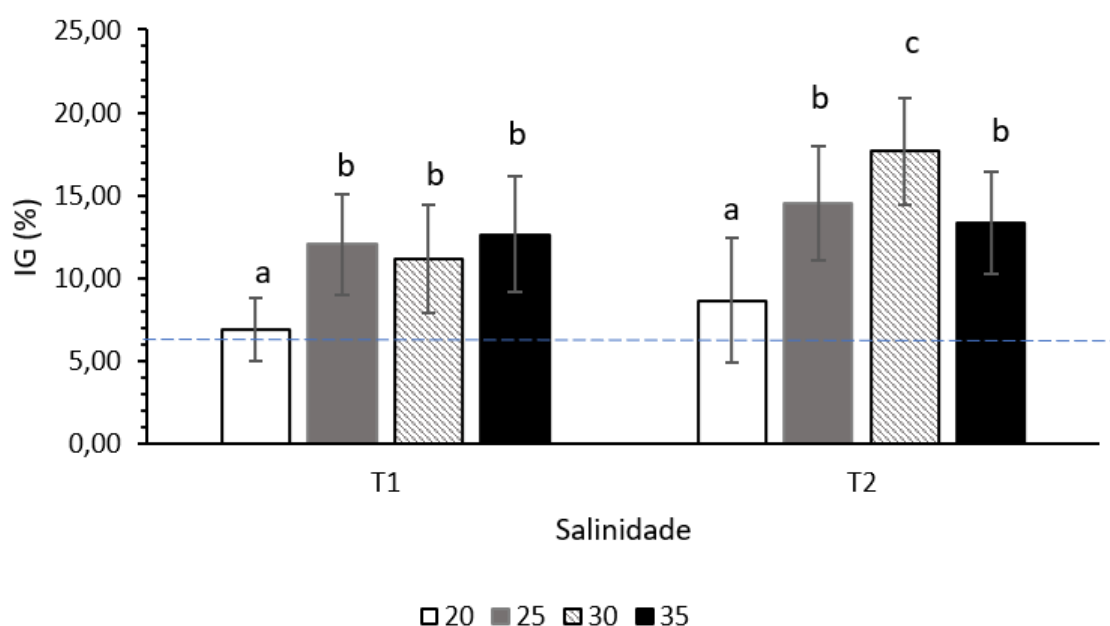


Figura 4 - Índice Gonadosomático (IG) (%) (Média \pm Desvio-Padrão) de *Paracentrotus lividus*, aos 60 dias (T1) e 120 dias (T2), para as salinidades 20, 25, 30 e 35. Linha a tracejado representa o IG médio dos ouriços-do-mar amostrados após jejum. (As diferentes letras representam as diferenças significativas entre tratamentos para os diferentes momentos de amostragens) (T0- n= 36; T1- n= 6 ind/tratamento; T2- n=11).

4.3 Ingestão alimentar (FI), Taxa de conversão alimentar (FCR) e Ingestão alimentar voluntária (IAV)

Foi calculada a ingestão diária dos indivíduos de cada sistema (FI) (g/ind/dia). Os indivíduos mantidos a 20 de salinidade mantiveram uma ingestão alimentar significativamente inferior comparando com os indivíduos sujeitos às restantes salinidades ($p < 0,01$), com uma ingestão alimentar de $0,068 \pm 0,005$ g/ind/dia. Os indivíduos mantidos no sistema a 25 de salinidade apresentaram uma ingestão alimentar diária de $0,093 \pm 0,004$ g/ind/dia, sendo significativamente superior à mantida pelos indivíduos a 20 de salinidade e significativamente inferior à observada nos indivíduos sujeitos às salinidades de 30 e 35 ($p < 0,01$) (Figura 5 A). Os indivíduos mantidos nos sistemas 30 e 35 não apresentaram diferenças significativas entre si na ingestão diária ($p = 0,921$), tendo os indivíduos mantidos a 30 apresentado uma ingestão diária de $0,104 \pm 0,003$ g/ind/dia e os mantidos a 35 apresentaram uma ingestão diária mais elevada com um valor de $0,106 \pm 0,007$ g/ind/dia (Figura 5 A).

Foi calculada a taxa de conversão alimentar (FCR), utilizando o peso médio ganho por sistema e o alimento médio ingerido em cada sistema. Nos indivíduos sujeitos a uma salinidade de 20 verificou-se um FCR de -6,57. O melhor FCR foi observado nos indivíduos mantidos a uma salinidade de 30 (FCR = 1,64), o que significa que é necessário dar menos quantidade de ração para que os ouriços-do-mar aumentem de peso. Nos indivíduos mantidos a 25 foi observado um FCR de 4,96 e os indivíduos mantidos a 35 mostraram um FCR de 1,90 (Figura 5 B).

Verificou-se também o menor valor de ingestão alimentar voluntária (IAV) nos indivíduos mantidos a salinidade de 20, apresentando um valor de $0,41 \pm 0,13$ g/ 100g de ind/ dia. Também à semelhança do observado na ingestão alimentar, os indivíduos mantidos nas salinidades de 30 e 35 apresentaram uma ingestão alimentar voluntária superior ($0,51 \pm 0,12$ e $0,52 \pm 0,10$ g/100g de ind/dia, respetivamente). Os indivíduos a 25 de salinidade apresentaram um IAV de $0,49 \pm 0,12$ g/100g de ind/dia (Tabela II).

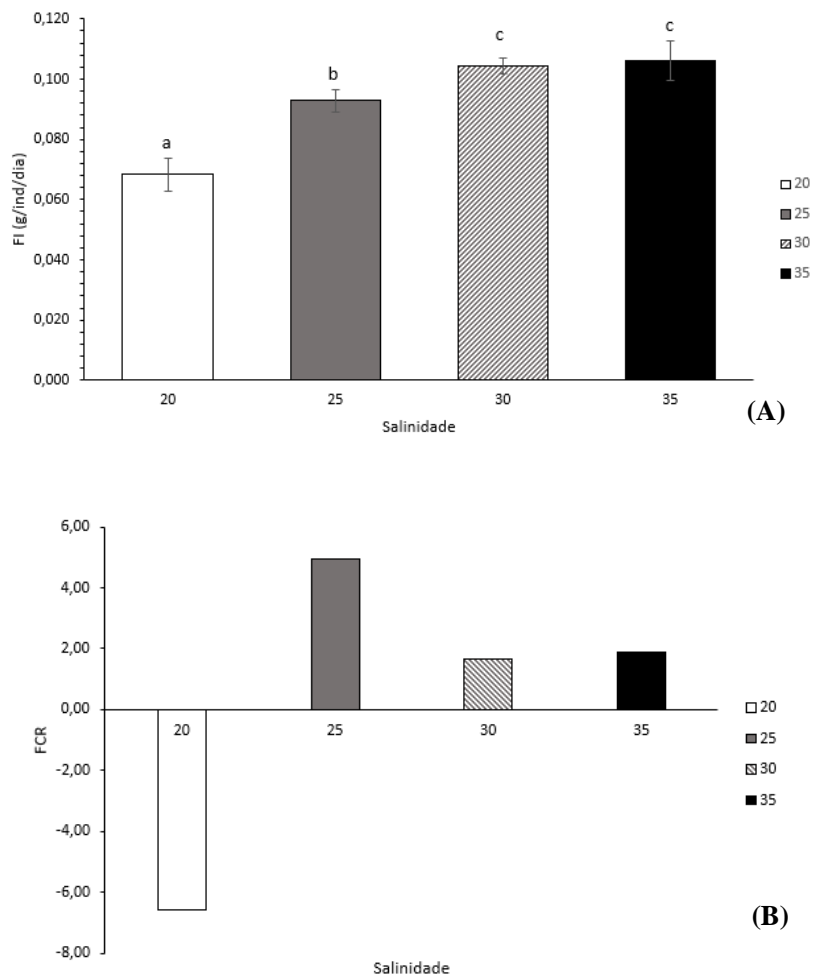


Figura 5- (A) Ingestão alimentar (FI) (g/ind/dia) (Média ± Desvio-Padrão), (B) Taxa de conversão alimentar (FCR) de *P. lividus* obtidos no final do ensaio, nas salinidades de 20, 25, 30 e 35. (Diferentes letras representam diferenças significativas entre sistemas) FI- n=6; FI- n= 3.

Tabela II- Valores de Taxa de conversão alimentar (FCR), Ingestão alimentar (g/ind/dia) (Média ± Desvio-Padrão) e Ingestão alimentar voluntária (g/100g de ind/ dia) (IAV), dos indivíduos mantidos nas diferentes salinidades em teste, 20, 25, 30 e 35, no final dos 120 dias.

Salinidade	FCR	IF (g/ind/dia)	IAV (g/100g de ind/ dia)
20	-6,57	0,068 ± 0,005	0,41 ± 0,13
25	4,96	0,093 ± 0,004	0,49 ± 0,12
30	1,64	0,104 ± 0,003	0,51 ± 0,12
35	1,90	0,106 ± 0,007	0,52 ± 0,10

4.4 Taxa de crescimento diário (DGR) e Peso Ganho (PG)

No final dos 120 dias de ensaio também foi calculada a Taxa de crescimento diário (DGR). Os indivíduos mantidos a 20 de salinidade apresentaram um crescimento negativo ao longo do ensaio. Os indivíduos mantidos a salinidade de 25 apresentaram um crescimento relativamente mais baixo, tendo apresentado o menor DGR comparando com os indivíduos mantidos a 30 e 35 de salinidade, com um valor de $0,033 \pm 0,039$ %/dia (25). No entanto este crescimento não é significativamente superior ao observado nos indivíduos mantidos a salinidade de 20 ($p = 0,232$). Os ouriços-do-mar mantidos a 30 apresentaram o maior crescimento diário, com um valor de $0,132 \pm 0,016$ %/dia e os indivíduos mantidos a 35 de salinidade apresentaram um valor de $0,105 \pm 0,044$ %/dia (Tabela III), não havendo diferenças significativas entre eles ($p = 0,857$), no entanto, o valor de DGR observado nos indivíduos mantidos a 30 e 35 de salinidade foi significativamente superior ao observado nos indivíduos mantidos a 20 de salinidade ($p < 0,05$).

Os resultados do peso ganho por dia foram semelhantes aos do DGR como era expectável. Também neste parâmetro se observou um PG nulo nos indivíduos mantidos a salinidade de 20. Nos ouriços-do-mar mantidos a 25 de salinidade observou-se um PG de $0,0048 \pm 0,005$ mg/dia, este valor não mostra diferenças significativas ao valor observado nos indivíduos mantidos no sistema 20 ($p = 0,257$). Os indivíduos mantidos a 30 de salinidade foram os que demonstraram um PG mais elevado ($0,020 \pm 0,002$ mg/dia). No entanto, este valor não é significativamente superior ao observado nos indivíduos mantidos a 35 de salinidade ($p = 0,824$). Apesar disto, ambos são significativamente superiores ao valor observado nos indivíduos mantidos a 20 de salinidade ($p < 0,05$) (Tabela III).

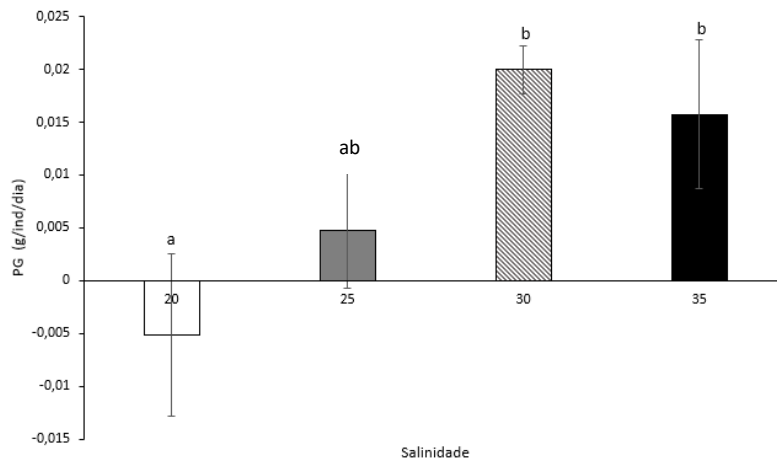


Figura 6- Resultados do peso ganho (PG) (G/ind/dia) de *P. lividus* alimentados com ração seca com ingredientes de origem vegetal, mantidos a salinidades de 20, 25, 30 e 35 durante 120 dias.

Tabela III - Resultados do Peso ganho (PG) (g/dia) (média ± Desvio-Padrão) e Taxa de Crescimento Diário (DGR) (%/Dia) (média ± Desvio-Padrão), nos ouriços-do-mar *P. lividus* nas de salinidades 20, 25, 30, 35, ao longo dos 120 dias de ensaio.

Sistema	PG (g/dia)	DGR (%/dia)
20	-0,0051 ± 0,008 ^a	-0,038 ± 0,057 ^a
25	0,0048 ± 0,005 ^{ab}	0,033 ± 0,039 ^{ab}
30	0,020 ± 0,002 ^b	0,132 ± 0,016 ^b
35	0,0157 ± 0,007 ^b	0,105 ± 0,044 ^b

4.5 Maturação das gónadas

Após a amostragem final obteve-se um rácio macho:fêmea de 1:1, existindo no total 66 machos e 66 fêmeas. Na salinidade de 20 observou-se um rácio de 1,06:1, na salinidade de 25 observou-se um rácio de 0,65:1, na salinidade de 30 o rácio foi de 1,2:1 e na salinidade de 35 o rácio foi de 1,2:1.

Antes de ser iniciado o ensaio, foram removidas gónadas de 36 indivíduos *P. lividus* para ser realizada a análise histológica, de forma a determinar o sexo e o estágio de maturação e desta forma verificar a eficácia do período de jejum. Foi observado um rácio Macho/Fêmea de 1,5/1, neste momento existiam 40% indivíduos no estágio I de maturação e 60% no estágio VI.

No final do ensaio na salinidade de 20 existiam 33,33% indivíduos no estágio de maturação I e 33,33% no estágio de maturação II, 21,21% no estágio de maturação III e

por fim 12,12% em estágio de maturação IV. Na salinidade de 25 observaram-se 24,24% dos indivíduos no estágio II, encontravam-se também 33,33% no estágio III, sendo este estágio o mais frequente a esta salinidade, observaram-se ainda 21,21% dos indivíduos no estágio IV, 18,18% no estágio V e 3,03% no estágio VI. No sistema 30 o estágio mais frequente foi o estágio IV representando 48,48% dos indivíduos amostrados, 9,09% encontravam-se no estágio III, 27,27% no estágio V e 15,15% no estágio IV. Na salinidade de 35 o estágio de maturação mais frequente foi também o estágio IV, apresentando um número de indivíduos neste estágio superior ao observado nos indivíduos mantidos na salinidade de 30 (57,58%), 3,03% encontravam-se ainda no estágio I, no estágio III encontravam-se 33,33% e 6,06% no estágio V (Figura 8).

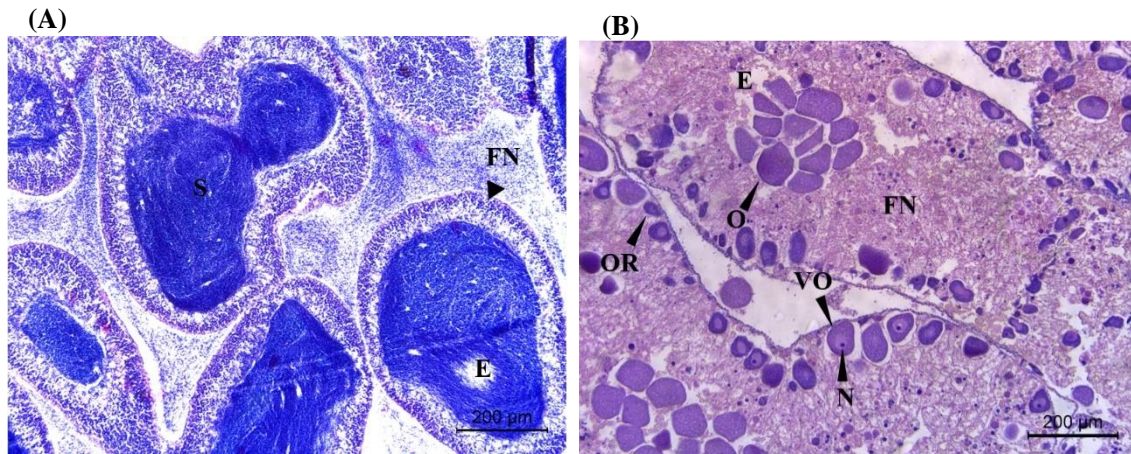


Figura 7- Cortes transversais de 5 µm de gónadas de *P. lividus* de macho (A) no estágio de maturação III (premature), onde é possível observar espermatozoides maduros (S), fagócitos nutritivos (FN) e ainda espaços vazios (E) e gónada de uma fêmea (B) também no estágio III de maturação (premature) onde é possível observar todas as fases de desenvolvimento dos oócitos, como oócitos vitelinos (VO) com o núcleo visível (N), oócitos vitelinos recentes (OR), oócitos maduros (O) e também fagócitos nutritivos (FN).

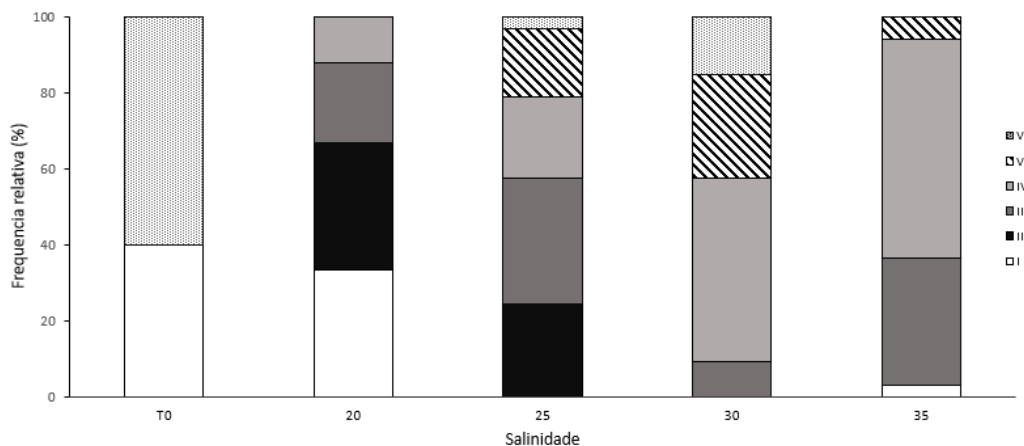


Figura 8- Estádios gametogénicos das gónadas de *P. lividus*, no início do ensaio (T0) e no final dos 120 dias para as salinidades 20, 25, 30 e 35. (Estádios de maturação I- Estádio de recuperação; II- Estádio de crescimento; III- Estágio prematuro; IV- Estádio maturo; V- Parcialmente desovado e VI- Estádio pós-postura.

4.6 Cor das Gónadas

No momento de amostragem T1 não se verificaram diferenças significativas do valor de L* entre as gónadas dos indivíduos mantidos nas diferentes salinidades, no total dos animais amostrados ($p = 0,293$). Isto também se verificou quando comparando apenas os machos nas diferentes salinidades ($p = 0,522$) e quando comparando o valor de L* das gónadas de fêmea ($p = 0,286$) (Tabela IV A).

Os resultados foram semelhantes para o valor a* e b* não existindo diferenças significativas entre tratamentos quando comparando as amostras no total, nem quando comparando individualmente ambos os sexos (a* total $p = 0,439$; para o valor de a* macho $p = 0,169$; para a* fêmea $p = 0,705$; Valor b* total $p = 0,750$; nos valores de b* macho $p = 0,303$; para os valores de b* fêmea $p = 0,573$) (Tabela IV A).

Apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas no momento de amostragem intermédio, no final do ensaio verificaram-se efeitos da salinidade em alguns parâmetros da cor nas gónadas do *P. lividus*.

O valor L* em T2 mostrou diferenças estatisticamente significativas quando comparando ambos os sexos em conjunto para as diferentes salinidades. Tendo sido este valor na salinidade de 20 de $46,68 \pm 7,09$, significativamente inferior quando comparando com as restantes salinidades ($p < 0,05$, quando comparando 20 com 25 e 35, $p < 0,01$ entre 20 e 30). Quando comparando os animais do sistema 25 e 30 também se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os indivíduos mantidos a 25 de salinidade apresentado um valor médio de $50,39 \pm 3,39$ e os animais mantidos a 30 de salinidade um valor de $53,77 \pm 4,96$, tendo sido este o maior valor de L* de todos os sistemas, entre o sistema de 25 e 35 não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Comparando os indivíduos mantidos a salinidades de 30 e 35 verifica-se que o valor de L* médio foi significativamente superior nas gónadas dos indivíduos mantidos a salinidade 30 ($p < 0,05$) (Tabela IV B).

Este parâmetro foi também comparado entre machos e fêmeas. Quanto ao valor de L* nos machos, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas. Os machos

mantidos a uma salinidade de 20 apresentaram um valor de L^* inferior quando comparando com os indivíduos mantidos nas salinidades de 30 e 35 ($p < 0,05$), no entanto quando estas diferenças não se verificam comparando as gónadas dos machos mantidos nas salinidades de 20 com 25 ($p > 0,05$). O valor de L^* é também significativamente inferior nas gónadas dos machos mantidos a 25 e 35 quando comparando com os indivíduos mantidos a 30 de salinidade, observando-se o valor mais elevado nas gónadas dos indivíduos mantidos a 30 ($56,75 \pm 4,17$). O valor de L^* para as gónadas fêmea não mostrou diferenças significativas ($p = 0,224$) (Figura 9 A).

O valor de a^* em T2, de todos os indivíduos não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre salinidades ($p = 0,136$). Comparando machos e fêmeas também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre salinidades no valor de a^* (machos- $p = 0,201$; Fêmeas- $p = 0,103$) (Figura 9 C).

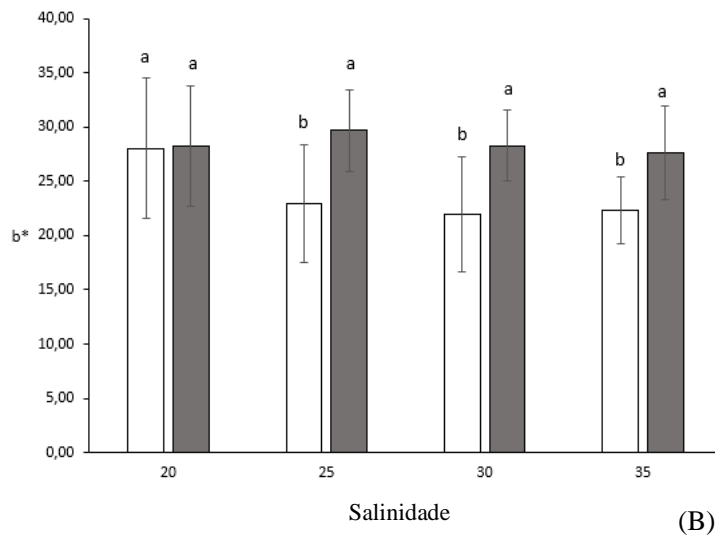
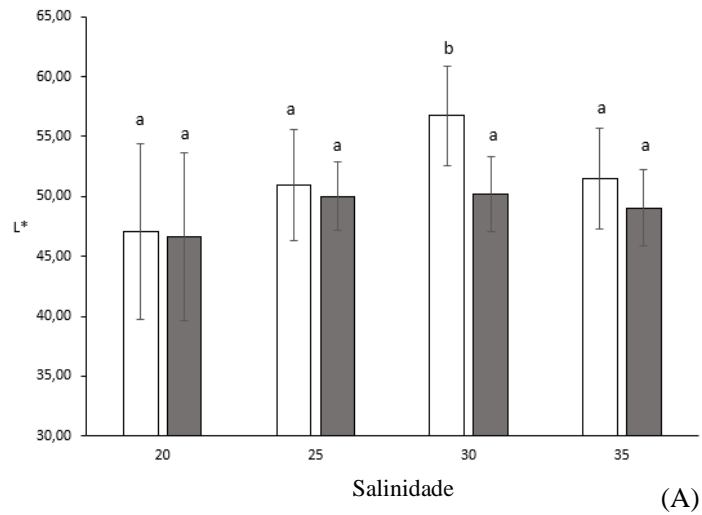
Para o valor de b^* total, neste momento de amostragem (T2) não mostrou diferenças estatisticamente significativas, no entanto este valor foi superior no sistema 20 ($b^* = 28,16 \pm 5,95$).

O valor médio de b^* quando comparando as gónadas de fêmeas não apresentam diferenças significativas entre as diferentes salinidades ($p = 0,552$). No entanto as gónadas de macho apresentam diferenças significativas no valor de b^* ($p < 0,01$). O valor de b^* das gónadas de macho mantidos na salinidade de 20 ($28,06 \pm 6,48$) foi significativamente superior quando comparando com as restantes salinidades ($22,91 \pm 5,42$ (25); $21,95 \pm 5,35$ (30); $22,33 \pm 3,14$ (35)), tendo sido esta a única diferença estatisticamente significativa neste parâmetro (Figura 9 B).

Tabela IV- Valores de L^* , a^* e b^* , das gónadas de *P. lividus* a 60 dias (A) e a 120 dias (B), em ambos os sexos em simultâneo (Total), para machos (♂) e fêmeas (♀) separadamente (média \pm Desvio-Padrão). (Diferentes letras representam diferenças significativas entre tratamentos)

(A)	L^*			a^*			b^*		
	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀
20	41,87 \pm 5,31 ^a	46,14 \pm 5,63 ^a	40,56 \pm 4,13 ^a	14,87 \pm 4,29 ^a	13,45 \pm 2,41 ^a	15,24 \pm 1,21 ^a	29,55 \pm 5,03 ^a	34,83 \pm 6,05 ^a	28,45 \pm 4,30 ^a
25	46,25 \pm 4,65 ^a	46,96 \pm 4,19 ^a	44,24 \pm 3,82 ^a	13,25 \pm 2,92 ^a	13,05 \pm 2,44 ^a	15,33 \pm 2,42 ^a	30,34 \pm 3,92 ^a	29,57 \pm 5,92 ^a	32,16 \pm 5,77 ^a
30	48,08 \pm 4,18 ^a	46,14 \pm 8,21 ^a	47,21 \pm 2,33 ^a	11,69 \pm 4,38 ^a	8,82 \pm 1,36 ^a	15,64 \pm 1,22 ^a	27,89 \pm 6,32 ^a	23,15 \pm 7,44 ^a	33,57 \pm 4,09 ^a
35	47,37 \pm 6,27 ^a	59,48 ^a	47,12 \pm 6,22 ^a	13,19 \pm 3,95 ^a	5,17 ^a	13,01 \pm 3,26 ^a	29,13 \pm 4,93 ^a	20,36 ^a	29,07 \pm 5,93 ^a

(B)	L*			a*			b*		
	Sistema	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂
20	46,88±7,09 ^b	47,08±7,35 ^a	46,66±7,03 ^a	11,12±3,78 ^a	8,67±2,32 ^a	13,73±3,28 ^a	28,16±5,95 ^a	28,06±6,48 ^a	28,26±5,55 ^a
25	50,93±3,59 ^a	50,96±4,61 ^a	50,02±2,82 ^a	11,02±2,75 ^a	8,78±2,80 ^a	12,48±1,45 ^a	27,01±5,52 ^a	22,91±5,4 ^b	29,67±3,73 ^a
30	53,77±4,96	56,75±4,17 ^b	50,19±3,17 ^a	9,61±3,70 ^a	7,11±2,81 ^a	12,61±2,03 ^a	24,84±5,49 ^a	21,95±5,3 ^b	28,31±3,29 ^a
35	50,37±3,90 ^a	51,46±4,19 ^a	49,06±3,18 ^a	9,87±2,60 ^a	8,52±2,34 ^a	11,48±1,92 ^a	24,76±4,55 ^a	22,33±3,1 ^b	27,67±4,32 ^a



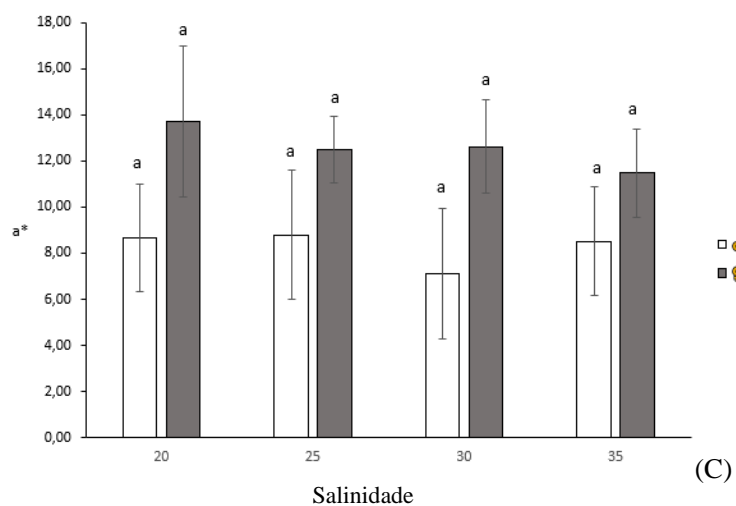


Figura 9- Valores de L*, b* e c* (A, B e C, respectivamente) (valor médio \pm Desvio-Padrão), das gónadas de *P. lividus*, em gónadas de fêmea e macho para cada tratamento em teste ao final de 120 dias de ensaio a salinidades de 20, 25, 30 e 35. (Diferentes letras representam diferenças significativas entre tratamentos, por sexo).

5. Discussão de resultados

5.1 Crescimento somático

O crescimento somático e gonadal é afetado não só pela disponibilidade e qualidade de alimento, mas também por vários fatores abióticos, sendo os mais importantes a temperatura, a salinidade e o fotoperíodo (Spirlet et al., 2001; Shpigle et al., 2004; Dickey et al., 2009; Santos et al., 2019; Santos et al., 2020). Durante o ensaio a temperatura foi idêntica nos quatro sistemas RAS com as diferentes salinidades, uma vez que foram mantidos à temperatura ambiente, tendo-se mantido uma temperatura média ao longo dos 120 dias de $18,43 \pm 0,22$ °C. Esta gama de temperatura é semelhante à observada na costa portuguesa no verão (18-20 °C) (Boudouresque and Verlaque, 2013), sendo também uma temperatura adequada para a manutenção de *P. lividus* (Grosjean, 1998), uma temperatura compreendida entre 18-22°C promove não só um bom crescimento somático como gonadal (Le Gall et al. 1990; Spirlet et al., 2001; Shpigle et al. 2004). O fotoperíodo foi também mantido constante ao longo de todo o ensaio, tendo-se utilizado um fotoperíodo 10h (luz): 14h (escuridão) (Santos et al., 2020).

Ao longo do ensaio as diferentes salinidades provocaram diferenças significativas no peso e no peso ganho dos ouriços-do-mar. No momento intermédio do ensaio (T1) os ouriços-do-mar sujeitos à salinidade de 20 apresentavam um peso significativamente inferior aos indivíduos mantidos nas restantes salinidades ($13,52 \pm 3,09$ g), apesar disto, nos primeiros 60 dias de ensaio os indivíduos apresentaram um ligeiro aumento de peso (T0: $13,32 \pm 3,13$ g). No entanto, houve uma evidente perda de peso nos indivíduos mantidos a 20 de salinidade de T1 para T2 ($12,70 \pm 2,97$ g). Este facto pode estar relacionado com um nível de stress elevado, que provoque uma reabsorção dos tecidos das gónadas e dos fagócitos nutritivos utilizados para manutenção das funções básicas do corpo, sendo uma reação comum destes animais a longos períodos de jejum (Lawrence e Lane 1982; Lares e Pomory 1998).

Analisando os resultados do diâmetro médio, observou-se uma diminuição deste parâmetro nos indivíduos mantidos na salinidade de 20 de T0 para T1 ($31,18 \pm 2,29$ mm e $30,54 \pm 2,32$ mm, respetivamente), terminando o ensaio com um diâmetro médio de $29,75 \pm 2,24$ mm. Apenas nesta salinidade se observou uma diminuição nos dois momentos de amostragem no diâmetro, sendo este significativamente inferior ao diâmetro observado nos indivíduos mantidos nas restantes salinidades. No entanto,

observou-se também um valor inferior de diâmetro dos indivíduos mantidos nas salinidades de 25, 30 e 35 em T1 em relação a T2. Dickey et al. (2009) observaram também uma diminuição do diâmetro médio em *Anthocardaris crassispina*, tanto em salinidades baixas (25) como em água salgada natural em tratamentos com limitação de alimento, tendo observado uma diminuição superior em salinidade baixa, à semelhança do reportado por McCarron et al. (2010), onde os autores observaram uma diminuição no diâmetro de *P. lividus* com uma gama de tamanhos de 19,5 – 23,0 mm nos primeiros meses de manutenção dos animais mantidos num fotoperíodo de 16h (luz) – 8h (escuridão). Isto pode estar relacionado com a plasticidade das partes rijas do corpo, em resposta a fatores bióticos e abióticos adversos (Marcus, 1983; Levitan, 1991). Fatores de stress como elevada limitação de alimento podem levar a diminuição do diâmetro, como é possível acontecer em longos períodos de jejum (Régis, 1979; Lawrence e Lane 1982; Levitan, 1988; Leviatan, 1991). Em contraste, Campbell e Russel (2004) demonstraram que variações periódicas de salinidade, expondo os ouriços-do-mar a uma salinidade de 21,5 duas vezes por semana, não provocava uma diminuição de diâmetro, no entanto causava um enfraquecimento da adesão dos pés ambulacrários dos ouriços-do-mar. O facto de terem sido sacrificados indivíduos em T1 pode ter resultado num enviesamento dos resultados, tendo sido amostrado um número diferente de indivíduos em T1 (17 ind/Tanque) e T2 (11 ind/Tanque), o que pode influenciar o diâmetro médio.

A diminuição de peso observada nos indivíduos mantidos na salinidade de 20 nos dois momentos de amostragem (T1 e T2) resultou num PG negativo de $-0,00513 \pm 0,0076$ g/dia/ind e também um DGR de $-0,038$ %/dia/ind ao longo de todo o ensaio, tornando evidente a reação adversa provocada pelo stress causado a *P. lividus* mantidos a esta salinidade. Estes resultados podem ser interpretados com a alocação de todos os recursos energéticos para a manutenção do corpo numa situação de condições adversas, ao contrário do que acontece em situações alimento abundante onde existe uma maior alocação de energia para o crescimento gonadal e não somático (Vadas, 1977; Dickey et al, 2009). No momento intermédio do ensaio (T1) os indivíduos mantidos nas salinidades 25, 30 e 35 não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si no peso. No entanto verificou-se um valor do peso médio superior ao observado no início do ensaio. A salinidade de 30 promoveu o maior aumento de peso. Este crescimento prolongou-se até ao final do ensaio terminando com o maior peso, apesar de não existirem diferenças significativas também em T2 entre este tratamento e os indivíduos mantidos nas salinidades de 25 e 35. Também a taxa de crescimento diária foi superior nos indivíduos

mantidos a salinidade de 30 ($0,135 \pm 0,016$ %/ind/dia), apesar de não existirem diferenças significativas com a salinidade de 35. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Dickey et al. (2009), onde os autores obtiveram também os melhores resultados de crescimento numa gama de salinidades de 31,5 a 33,5 com alimentação *ad libitum* em *Anthocardaris crassispina* numa gama de tamanhos semelhante à utilizada neste ensaio (25-30 mm). Os resultados de peso médio na salinidade 25 mostraram um aumento de T0 para T1, no entanto de T1 para T2 observou-se uma diminuição do peso, estes resultados são também semelhantes aos descritos por Dickey et al (2009), onde os autores relatam um aumento no tamanho nas primeiras 8 semanas de ensaio e subsequentemente uma estagnação do crescimento, a 25 de salinidade com alimentação *ad libitum*.

Apesar da manutenção do corpo ser a maior prioridade no que toca à energia assimilada, a prioridade em relação ao crescimento e reprodução de ouriços-do-mar varia consoante a espécie, a fase de vida e fatores ambientais (Guillou et al., 2000). Vários estudos demonstraram que o crescimento e reprodução dos ouriços-do-mar estão diretamente relacionados com a quantidade e qualidade do alimento disponível (Briscoe e Sebens, 1988; Caltagirone et al., 1992; Grosjean et al., 1996; Williams e Harris, 1998). Por isto é importante garantir que existe um fornecimento de alimento adequado, de forma a assegurar que a escassez não tenha impacto nos resultados deste ensaio. Neste sentido os ouriços-do-mar foram alimentados 3 vezes por semana, 2% da biomassa total de cada aquário, valor superior ao utilizado em *P. lividus* por Prato et al (2018), onde os autores alimentaram duas vezes por semana 1,5% do peso corporal. Siikavuopio et al (2007) alimentaram os ouriços-do-mar em excesso de forma a promover um maior crescimento somático. O facto de ter sido possível a recolha de alimento não ingerido após cada alimentação mostra que a disponibilidade de alimento não foi um fator limitante neste ensaio.

A salinidade de 20 foi o que promoveu menor crescimento de entre todos os tratamentos, todos os restantes não mostraram diferenças estatisticamente significativas, no entanto, a salinidade de 30 foi onde se observou um maior peso e crescimento da carapaça isto demonstra que em salinidades superiores a 25 os ouriços-do-mar *P. lividus* apresentam um crescimento favorável, no entanto o ideal é que a salinidade esteja compreendida entre 30 e 35 uma vez que é neste intervalo onde se observam os melhores resultados de crescimento somático.

5.2 Alimentação

A ingestão alimentar é utilizada como indicador de bem-estar, sendo que, por norma verifica-se redução do apetite quando os animais estão sujeitos a condições ambientais adversas (Jobling, 1994; Ranking e Jensen, 1993; Wedemeyer, 1996; Thetmeyer et al., 1999; Anras et al., 2001; Siikavuopio et al., 2007), tendo um impacto direto no volume e qualidade das gónadas de ouriços-do-mar (Pearse e Cameron, 1991; Cuesta-Gomez e Sánchez-Saavedra, 2016). O facto de ter sido observada ingestão e em conjunto com 0% de mortalidade observada em todos os tratamentos ao longo dos 120 dias de ensaio, mostra que a gama de salinidades utilizada neste ensaio está dentro do limite de tolerância desta espécie. Os grãos de ração eram também distribuídos de forma homogénea com o objetivo de distribuir a ração uniformemente por todos os indivíduos, também o alimento neste formato é normalmente mais fácil de capturar comparando com alga fresca, devido ao seu formato e textura (Spirlet et al., 2001).

Foi calculada a ingestão (FI) ao longo do ensaio, tal como a conversão alimentar (FCR), através do peso ganho e o alimento ingerido ao longo dos 120 dias de ensaio. As salinidades 30 e 35 foram as que promoveram maiores taxas de ingestão ($0,104 \pm 0,003$ g/ind/dia e $0,106 \pm 0,007$ g/ind/dia, respetivamente), não apresentando diferenças significativas entre si e sendo significativamente superior à ingestão observada nos indivíduos mantidos nas restantes salinidades. Christiansen e Siikavuopio (2007), em *Strongylocentrotus droebachiensis* obtiveram uma ingestão superior observando uma ingestão diária de $0,38 \pm 0,02$ g/ind/dia, no tratamento de controlo utilizando ração húmida. No entanto, Schlosser et al. (2005) demonstrou que *P. lividus* consome cerca de três vezes mais alga do que ração seca preparada, mostrando que o tipo de alimento fornecido afeta os valores de ingestão observados. Apesar disto, Lourenço et al. (2021) obteve uma ingestão alimentar voluntária inferior à obtida neste ensaio ($0,51 \pm 0,12$ e $0,52 \pm 0,10$ g/100g de ind/dia, na salinidade de 30 e 35, respetivamente), tendo observado $0,43 \pm 0,04$ e $0,43 \pm 0,02$ g/100g de ind/ dia, em fêmeas e machos, respetivamente, também para uma ração seca com ingredientes de origem vegetal, em *P. lividus* com um diâmetro inferior ao utilizado neste ensaio. Esta diferença de ingestão pode estar relacionada com as classes de tamanho, uma vez que diferentes classes de tamanho apresentam prioridades energéticas e valores de ingestão diferentes (Fernandez e Boudouresque, 2000; Spirlet et al., 2000; McCarron et al., 2009).

Os ouriços-do-mar mantidos a 20 de salinidade apresentaram a ingestão alimentar mais baixa ($0,068 \pm 0,005$ g/ind/dia). No entanto, esta ingestão em conjunto com a diminuição do peso observada ao longo do ensaio, levou a uma taxa de conversão negativa (-6,67). Este resultado enfatiza o efeito adverso causado por esta salinidade no crescimento desta espécie provocando uma taxa de conversão alimentar negativa. Também Rodde et al. (2020) obtiveram uma taxa de conversão negativa em *Oreochromis niloticus*, ao observar uma diminuição de peso nos peixes. Não sendo comum observar valores de FCR negativos, é possível em condições de stress. Os ouriços-do-mar mantêm uma alimentação contínua em caso de disponibilidade constante de alimento (McBride et al., 2004), isto explica a contínua ingestão, ainda que baixa, observada nos indivíduos mantidos a salinidades mais baixas, mostrando que os ouriços-do-mar continuam a alimentar-se mesmo em condições desfavoráveis. Em contraste, os indivíduos sujeitos a uma salinidade de 30 apresentaram a menor taxa de conversão alimentar (1,64), este valor foi semelhante ao observado nos indivíduos mantidos na salinidade de 35 (1,90). Estes resultados são superiores aos observados por Lourenço et al. (2021), em *P. lividus*, onde os autores obtiveram um FCR de $1,13 \pm 0,49$ e $1,44 \pm 0,28$ em fêmeas e machos, respetivamente. No entanto, estes resultados foram obtidos em indivíduos com um diâmetro inferior ao utilizado neste ensaio ($17,6 \pm 3,5$ mm). Apesar disto, os resultados deste ensaio são semelhantes aos obtidos por Sphigel et al. (2004) onde os autores obtiveram um FCR de 1,94 em *P. lividus* a uma temperatura de 18°C e um FCR de 1,60 a uma temperatura superior (20-22 °C), numa gama de tamanhos semelhante à utilizada neste ensaio (35mm) e utilizando também uma ração preparada com baixo teor de proteína. Também Baião et al. (2019) obtiveram valores de FCR semelhantes em *P. lividus* com uma ração de elevado teor de proteína ($1,63 \pm 0,26$ e $1,76 \pm 0,09$). Este aumento do FCR das salinidades 30 e 35 para 25 (FCR = 4,94), pode indicar que os custos metabólicos aumentam com a diminuição da salinidade, em semelhança ao demonstrado por Siikavuopio et al. (2012) em que ouriços-do-mar da espécie *Strongylocentrotus droebachiensis* apresentam um aumento de FCR com o aumento de temperatura. Isto pode ainda ter consequências na manutenção de ouriços-do-mar em aquacultura, principalmente quando se aplica alimentação *ad libitum*, em condições desfavoráveis não letais, levando a uma falta de eficiência do alimento fornecido devido à falta de regulação do apetite, levando à ingestão em excesso, não sendo convertida em crescimento, podendo isto levar também à diminuição da qualidade da água, devido à decomposição do alimento não ingerido na água ao longo do tempo (Siikavuopio et al., 2012).

Este ensaio mostrou um impacto negativo de baixas salinidades, na ingestão alimentar e consequentemente na taxa de conversão, mostrando mais uma vez que o intervalo ótimo de salinidade para manutenção desta espécie está compreendido entre 30 e 35 e preferencialmente utilizando uma ração com elevados teores de proteína (Baião et al, 2019).

5.3 Peso das gónadas e Índice Gonadosomático

A qualidade e o tamanho das gónadas podem ser afetados por diferentes fatores, como fatores abióticos, como a temperatura, salinidade, densidade e a circulação da água e fatores nutricionais, como o tipo de ingredientes da ração e a sua composição química (Lourenço et al., 2018; Rocha et al., 2018; Rocha et al., 2019).

Antes do início do ensaio (T0) todos os ouriços-do-mar foram sujeitos a duas semanas de jejum de forma a induzir a reabsorção das gónadas, para garantir um reinício do ciclo reprodutivo de todos os ouriços-do-mar (Spirlet, Grosjean, e Jangoux, 1998, Shpigel et al., 2004). No final deste período foi obtido um índice gonadosomático médio de $6,32 \% \pm 2,52$, este valor é idêntico ao observado por outros autores com períodos de jejum semelhantes (Fernandez e Boudouresque, 2000; Siikavuopio et al., 2007), no entanto, é superior ao observado por Santos et al. (2020), que obteve um valor de 3,33% após um jejum de 30 dias, isto mostra a importância da disponibilidade de alimento e da duração do jejum na reabsorção das gónadas.

No momento intermédio do ensaio (T1) apenas os ouriços-do-mar sujeito ao tratamento com a salinidade 20 mostram diferenças significativas no IG, sendo este significativamente inferior ($6,93 \pm 1,93\%$) em relação ao IG observado nos indivíduos mantidos a 25, 30 e 35 de salinidade, que não mostraram diferenças significativas entre si. Sendo este muito semelhante ao valor observado na amostragem após jejum. Também no final do ensaio (T2) o tratamento com a salinidade 20 apresentou o IG mais baixo de todos os tratamentos ($8,66 \pm 3,77\%$), sendo novamente significativamente inferior aos restantes tratamentos. Este valor é semelhante ao observado em ouriços-do-mar em situações de stress, como o demonstrado por Siikavuopio et al. (2007), onde o autor obteve um IG de $7,4 \pm 2,8\%$ no tratamento com elevado CO₂. Ainda que não tenha sido observada mortalidade ao longo deste ensaio, este IG relativamente baixo mostra que salinidade baixa provoca um efeito negativo no desenvolvimento gonadal desta espécie.

O tratamento com a salinidade 30 foi o que proporcionou um melhor crescimento gonadal de entre todos os tratamentos, apresentando um valor final de $17,66 \pm 2,71\%$. Este valor foi significativamente superior ao observado nos indivíduos mantidos a salinidades de 25 e 35 ($14,53 \pm 3,48\%$ e $13,36 \pm 3,09\%$, respetivamente). Estes resultados são ainda superiores aos valores de IG reportados em *P. lividus* no meio natural (5-8%) (Spirlet et al., 1998a; Spirlet et al., 2000; Jacquin et al., 2006; Ouréns et al., 2011; Baião et al., 2019). Pelo contrário, são inferiores aos observados em estudos semelhantes com *P. lividus*, como é o caso de Shpigel et al. (2003), onde os autores obtiveram um intervalo de IG de 22,97 a 28,28%, em ouriços-do-mar com 35 mm de diâmetro. Também os autores Baião et al., (2019) obtiveram um intervalo de IG de 19% a 23%, resultados superiores aos observados neste ensaio. No entanto, os resultados observados vão de encontro aos resultados reportados por Fernandez e Boudouresque (2000), com ração e uma gama de tamanhos semelhantes à utilizada neste ensaio (10-12%). McCarron et al. (2009) obtiveram em *P. lividus* mantidos numa salinidade 32-33 sem limitação de alimento resultados semelhantes aos obtidos neste ensaio no tratamento de salinidade 30, tendo obtido um IG de 15,76% em indivíduos com um diâmetro de 29,0-33,0 mm. Dickey et al. (2009) obteve resultados de IG semelhantes em *Anthocardaris crassispina*, tanto na salinidade de 25 como na salinidade de 31,5-33,5, sem limitação de alimento, promovendo esta última salinidade o maior IG, à semelhança do observado neste ensaio em *P. lividus*.

Ao longo dos 120 dias a salinidade mostrou ter uma grande influência no crescimento das gónadas, tendo a salinidade de 30 promovido o melhor crescimento gonadal de entre as salinidades em teste. A salinidade de 20 mostrou ter um efeito negativo no crescimento das gónadas potencialmente causado pelo stress provocado por este fator abiótico como foi observado também pelo seu desempenho no crescimento somático. Estes resultados enfatizam a gama ótima de salinidades anteriormente discutida, mantendo-se entre 25-35, ainda que idealmente seja mais próxima de 30.

5.4 Maturação das Gónadas

Vários estudos demonstram que os fatores abióticos, como a temperatura e o fotoperíodo têm grande impacto na maturação (Shpigel et al., 2004; Santos et al., 2020), contudo, é importante aferir também a importância da salinidade.

Após o período de jejum de 15 dias, de forma a reiniciar o ciclo gametogénico, 40% dos indivíduos encontravam-se na fase de recuperação (I), enquanto os restantes 60% se encontravam em fase de reabsorção (VI), estes resultados são semelhantes aos reportados por Fabbrocini et al. (2015), onde os autores após 7 dias de jejum observaram a maioria dos indivíduos também no estágio de reabsorção (VI). Também Schlosser et al. (2005), utilizando um período de jejum de 1 semana observaram indivíduos maioritariamente em fase de recuperação e também em fase de crescimento. Sartori e Gaion (2015) e Sartori et al. (2016), em períodos mais longos de jejum, relataram 90% dos indivíduos em fase VI, à semelhança do reportado por Santos et al. (2020). É também comum alguns estudos fazerem referência a um estágio de maturação intermédio entre o estágio de reabsorção/gasto (VI) e o estágio recuperação (I), após um período de jejum (Byrne, 1990; Sartori et al., 2015). Estes resultados mostram que o período de jejum, teve os resultados pretendidos, reiniciando o ciclo reprodutivo destes indivíduos, isto é importante para avaliar a influência da salinidade na maturação das gónadas, porque o ciclo reprodutivo dos ouriços-do-mar pode variar, dependendo de vários fatores mesmo dentro da mesma população (Spirlet et al., 1998b; Shpigel et al., 2004), e desta forma garante-se um início do ensaio no mesmo estágio de maturação.

No final deste ensaio, verificou-se que a salinidade tem um impacto grande na maturação das gónadas de *P. lividus*. No tratamento com a salinidade 20, a maioria dos indivíduos encontravam-se no estágio de recuperação (I) ou em crescimento (II), isto pode indicar que a alocação de energia destes animais era direcionada maioritariamente para a manutenção do corpo e não para maturação, o que é comum em situações de stress (Guillou et al., 2000), pelo que não se observou avanço nenhum avanço na gametogénese. Na salinidade de 25 a maioria dos indivíduos encontrava-se no estágio de prematuro (III) (33,33%) e 24,24% em fase de crescimento (II) encontrando-se poucos indivíduos no estado completo de maturação (18,18%), isto tem importância na atribuição do valor comercial destas gónadas uma vez que, as fases de maturação ideais para comercialização e consumo são a fase de crescimento e fase prematura (Spirlet et al., 2000). Nos tratamentos com as salinidades 30 e 35, a maioria dos indivíduos encontrava-se nas fases IV e V, indo de encontro com outros ensaios de alimentação (Sartori e Gaion, 2015; Baião et al., 2019). Isto indica que estas salinidades permitem uma evolução a nível de maturação das gónadas superior em relação às restantes salinidades, sendo este o intervalo

de salinidade mais indicado quando o objetivo é a maturação das gónadas, sendo as que promovem evolução mais rápidas das fases gametogénicas.

5.5 Cor das Gónadas

A qualidade das gónadas depende principalmente do seu tamanho, consistência, sabor e cor (Pearce et al., 2002; Prato et al., 2018b). A cor é um dos fatores mais importantes na valorização das gónadas de ouriço-do-mar. É normalmente manipulada com sucesso com recurso à introdução de carotenóides no seu alimento (Suckling et al., 2011).

Neste ensaio foi analisada a cor das gónadas dos ouriços-do-mar, sem diferenciação sexual como é comum em vários estudos (Robinson et al., 2002; Pearce et al., 2004; Shpigel et al., 2006; Symonds et al., 2007) e foi também realizada a diferenciação entre os valores de L^* , a^* e b^* de machos e fêmeas, de forma a perceber se as diferentes salinidades provocam diferenças nestes valores.

À semelhança do observado noutros estudos (Phillips et al., 2009; Baião et al., 2019), não foram observadas diferenças significativas entre salinidades nos valores de a^* e b^* , nem no geral, nem quando analisando os valores obtidos em machos e fêmeas separadamente. No entanto, o valor de L^* , correspondente ao valor do brilho, foi significativamente superior na salinidade de 30, em relação a todas as outras salinidades, nas gónadas de macho ($56,75 \pm 4,17$). Este valor é semelhante ao observado por Baião et al. (2019) tendo os autores relatado um valor de $58,99 \pm 6,61$, nos ouriços-do-mar alimentados com a ração em teste, e $47,82 \pm 4,70$ em machos *P. lividus* selvagens. Este valor observado em machos selvagens vai também de encontro ao observado neste ensaio nos ouriços-do-mar sujeitos a uma salinidade de 20 ($47,07 \pm 7,35$). Também McCarron et al. (2009) obteve valores semelhantes de L^* aos observados na salinidade de 30, no entanto os autores não fazem diferenciação entre sexos. Este valor superior de L^* na salinidade 30, e sendo este superior ao observado em *P. lividus* no meio selvagem pode indicar que esta salinidade promove uma melhor cor no parâmetro de luminosidade, em machos, para além do crescimento referido anteriormente. No entanto, isto pode estar relacionado também com o facto de os ouriços-do-mar nesta salinidade, estarem num

estado de maturação diferente dos indivíduos sujeitos aos restantes tratamentos, uma vez que a cor depende não só do sexo como também do estado de maturação do animal (Plank, 2000; Carboni et al., 2013). O valor de L^* não mostrou diferenças significativas entre salinidades nas fêmeas, apesar disto os valores obtidos foram superiores aos relatados por Baião et al. (2019) em *P. lividus* fêmea no meio natural.

Os valores de a^* não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes salinidades, em ambos os sexos. Tanto em machos (valor máximo de a^* na salinidade de 25- $8,78 \pm 2,80$) como em fêmeas (valor máximo de a^* na salinidade de 20- $13,73 \pm 3,28$), este valor foi inferior ao relatado por Baião et al. (2019) em ouriços-do-mar no meio natural (machos- $14,65 \pm 2,9$ e fêmeas- $25,41 \pm 3,16$) e semelhante ao obtido por este autor em machos alimentados com uma dieta de baixo teor de proteína e baixo teor lipídico, o que indica que o facto do valor obtido neste ensaio ser inferior ao observado no meio natural possa estar relacionado com o tipo de alimento fornecido, uma vez que vários estudos mostram que frequentemente ouriços-do-mar alimentados com rações preparadas produzem gónadas grandes mas pálidas (McBride et al., 1997, 2004; Lawrence et al., 1997; Barker et al., 1998; Walker and Lesser, 1998; Pearce et al., 2004), não sendo por isto comercialmente interessantes (Lawrence et al., 1995; Robinson and Colborne, 1998; Watts et al., 1998; McLaughlin and Kelly, 2001).

No valor de b^* apenas foram observadas diferenças significativas entre salinidades nos machos, onde este valor observado em machos mantidos a 20 de salinidade foi significativamente inferior ao observado nos indivíduos mantidos nas restantes salinidades. Possivelmente devido ao diferente estado de maturação em que os animais terminaram o ensaio, uma vez que os indivíduos sujeitos a esta salinidade se encontravam maioritariamente no estágio I e II de maturação, estádios inferiores aos observados nos indivíduos mantidos nas restantes salinidades.

6. Conclusões

No final deste estudo foi possível concluir que a salinidade é um fator importante para o desenvolvimento somático e gonadal do *P. lividus*, sendo um a ter em conta na manutenção destes animais em aquacultura. Esta espécie é capaz de suportar toda a gama de salinidades testadas neste ensaio (20-35), durante um período relativamente longo de tempo (120 dias), não tendo apresentado qualquer mortalidade. No entanto, à salinidade de 20 não se observa qualquer crescimento nem somático nem gonadal, tendo que alocar as energias para manutenção, sendo esta a maior prioridade. Tendo isto também impacto na cor das gónadas, observando-se a esta salinidade um valor de b^* inferior ao observado nas restantes salinidades devido ao baixo desenvolvimento do estágio de maturação das gónadas. Para esta espécie a salinidade ideal aparenta ser a 30, uma vez que de entre as quatro salinidades em estudo foi a que proporcionou o melhor crescimento, apesar de que entre 30-35 as diferenças de peso e peso ganho não serem significativas, podendo ser este considerado o melhor intervalo para a manutenção da espécie. Com este estudo foi também possível observar que é possível manter *P. lividus* em salinidades baixas de até 25, sem que seja observada mortalidade, no entanto, do ponto de vista da aquacultura a produção desta espécie em salinidades inferiores a 25 torna-se inviável devido aos custos associados por se ter observado uma taxa de conversão alimentar muito elevada. Foi também utilizada neste ensaio uma ração seca com ingredientes de origem vegetal, que no intervalo de salinidade ideal provocou crescimento somático e gonadal relativamente elevado, proporcionando também um acentuado desenvolvimento gametogénico. Mostrando por isto, ser também uma alternativa viável para utilização em aquacultura. No futuro seria interessante aferir, *in situ*, em zonas de rias ou estuários, onde a salinidade é variável, a viabilidade da produção desta espécie e a sua performance de crescimento e maturação.

7. Referências

- Abraham, E. R., 2007. Sea-urchin feeding fronts. *Ecological Complexity*. 4. 161-168.
- Allain, J. Y., 1975. Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 39(2), 171-212.
- Alves, F., Chícharo, L., Serrao, E., Abreu, A. D. (2001). Algal cover and sea urchin spatial distribution at Madeira Island (NE Atlantic). *Scientia Marina*. 65, 383- 392.
- Andrew N.L., Agatsuma Y., Ballesteros E., Bazhin A.G., Creaser E.P., Barnes D.K.A., Botsford L.W., Bradbury A., Campbell A., Dixon J.D., Einarsson S., Gerring P.K., Hebert K., Hunter M., Hur S.B., Johnson CR, Juinio-Meñez M.A., Kalvass P., Miller R.J., Moreno C.A., Palleiro J.S., Rivas D., Robinson S.M.L., Schroeter S.C., Steneck R.S., Vadas R.L., Woodby D.A., Xiaoqi Z., 2002. Status and management of world sea urchin fisheries. *Oceanography Marine Biology Annual Review*. 40. 343–425.
- Anras, M.-L.B., Beauchaud, M., Juell, J.-E., Coves, D., Lagardere, J.-P., 2001. Environmental factors and feed intake: rearing system. Food intake in fish. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), COST-Action 827. Blackwell Science.
- Arafa, S., Chouaibi, M., Sadok, S., El Abed, A., 2012. The influence of season on the gonad index and biochemical composition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from the Gulf of Tunis. *The Scientific World Journal*.
- Azzolina, J. F., 1988. Contribution à l'Étude de la Dynamique des Populations de l'Oursin Comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck). Croissance, Recrutement, Mortalité, Migrations. Thèse Doctorat. Université Aix-Marseille 2, Marseille.
- Bacallado, J. J., Moreno, E., Pérez Ruzafa, A., 1985. Echinodermata (Canary Islands) – Provisional check-list. In: Keegan, B.F., O'Connor, B.D.S. (Eds.), *Echinodermata*, Balkema, Rotterdam. 149–151.

- Baião L.F., Rocha F., Costa M., Sá T., Oliveira A., Maia M.R.G., Fonseca A.J.M., Pintado M., Valente L.M.P., 2019. Effect of protein and lipid levels in diets for adult sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture*. 506. 127-138.
- Barker, M.F., Keogh, J.A., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., 1998. Feeding rate, absorption efficiencies, growth, and enhancement of gonad production in the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* Valenciennes (Echinoidea: Echinometridae) fed prepared and natural diets. *Journal of Shellfish Research*. 17. 1583– 1590.
- Barnes, D.K.A., Crook, A.C., 2001. Quantifying behavioural determinants of the coastal European sea-urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*. 138. 1205–1212.
- Basuyaux, O. and Blin, J. L., 1998. Use of maize as a food source for sea urchins in a recirculating rearing system. *Aquaculture International*. 6. 233-247.
- Basuyaux O., Mathieu M., 1999. Inorganic nitrogen and its Effect on growth of the abalone *Haliotis tuberculata* Linnaeus and the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 174. 95-107.
- Bertocci, I., Dominguez, R., Freitas, C. & Sousa-Pinto, I., 2012. Patterns of variation of intertidal species of commercial interest in the Parque Litoral Norte (North Portugal) MPA: Comparison with three reference shores. *Marine Environmental Research*. 77. 60-70.
- Benedetti-Cecchi, L., Bulleri, F., Cinelli, F. 1998. Density dependent foraging of sea urchins in shallow subtidal reefs on the west coast of Italy (western Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*. 163. 203-211.
- Boudouresque, C.F., Verlaque, M., 2001. Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Edible Sea urchins: Biology and Ecology*. Elsevier, Amsterdam. Vol.32.
- Boudouresque, C. F. & Verlaque, M., 2007. Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. 37. 243-285.
- Boudouresque, C.F., Verlaque, M., 2013. Sea Urchin. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Paracentrotus lividus*. *Biology and Ecology*. 38. 297–327.
- Briscoe, C.S., Sebens, K.P., 1988. Omnivory in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muller) (Echinodermata: Echinoidea): predation on subtidal mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 115. 1–24.
- Brusca, R. C. and Brusca, G. J., 2003. Phylum Echinodermata. In *Invertebrates*. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts. 836-871.
- Byrne, M., 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*. 104. 275–289.

- Caltagirone, A., Francour, P., Fernandez, C., 1992. Formulation of an artificial diet for the rearing of the urchin *Paracentrotus lividus*: I. Comparison of different binding agents. In: Scalera-Liaci, L., Canicatti, C. (Eds.), Echinoderm Research. 115–119.
- Camargo J.A., Alonso A., Salamanca A., 2005. Nitrate toxicity to animals: a review data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 58. 1255-1267.
- Carboni S., Addis P., Cau A., Atack T., 2012. Aquaculture could enhance Mediterranean sea urchin fishery, expand supply. *Global Aquaculture Advocate*. 15. 44-45.
- Carboni, S., Hughes, A. D., Atack, T., Tocher, D. R., Migaud, H., 2013. Fatty acid profiles during gametogenesis in sea urchin (*Paracentrotus lividus*): Effects of dietary inputs on gonad, egg and embryo profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 164. 376-382.
- Carboni, S., Hughes, A. D., Atack, T., Tocher, D. R. & Migaud, H., 2015. Influence of broodstock diet on somatic growth, fecundity, gonad carotenoids and larval survival of sea urchin. *Aquaculture Research*. 46(4). 969-976.
- Campbell, J.&M. P. Russell. 2004. Acclimation and growth response of the green urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* to fluctuating salinity. In: J. M. Lawrence & O. Guzmán, editors. *Sea urchin fisheries and ecology*. Proceedings of the International Conference on Fisheries and Aquaculture. Lancaster: DEStech Publication. 110–117.
- Carballeira C., Martín-Díaz L., DelValls T.A., 2011. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *Marine Environmental Research*. 72. 196-203.
- Cellario, C. & Fenaux, L., 1990. *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): parameters of growth observed two years following metamorphosis. *Aquaculture*. 84. 173-188.
- Chelazzi, G., Serra, G., Bucciarelli, G., 1997. Zonal recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 212. 1–7.
- Christiansen J., Siikavuopio S.I., 2007. The relationship between feed intake and gonad growth of single and stocked green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in a raceway culture. *Aquaculture*. 262. 163-167.
- Cirino P., Ciaravolo M., Paglialonga A., Toscano A., 2017. Long-term maintenance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in culture. *Aquaculture Reports*. 27-33.
- Cuesta-Gomez, D.M., Sánchez-Saavedra, M.D.P., 2016. Increased gonad growth of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) fed the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) and the sea lettuce (*Ulva lactuca*) enriched with nutrients. *Aquaculture Research*. 47. 2150-2163.
- Dance, C., 1987. Patterns of activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the bay of Port-Cros (Var, France, Mediterranean). *P.S.Z.N.I. Marine Ecology*. 8. 131–142.

Dickey L. C.C, Stanley, L.C.K., Pey-Yuan, Q., Jian-Wen, Q., 2009. Morphological plasticity and resource allocation in response to food limitation and hyposalinity in sea urchin. *Journal of Shellfish Research*. 28(2). 383-388.

Dincer, T. and Cakli S., 2007. Chemical composition and biometrical measurements of the Turkish sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47(1) 21-26.

FAO., 2015. FAO fisheries commodities production and trade. 1976–2015.

FAO, 2016. Food outlook, biannual report on global food markets. In: Food and agriculture organization of the United Nations. 60-66.

Fermentarian, A., 1966. The respiratory physiology of echinoderms. In: Boolootian, R.A. (ed), *Physiology of Echinoderms*. Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York. 245–265.

Fernandez, C. and Caltagirone, A., 1994. Growth rate of adult sea urchins, *Paracentrotus lividus* in a lagoon environment: the effect of different diet types. In: David, B., Guille, A., Féral, J.P., Roux, M. (Eds.), *Echinoderms through Time*. 655–660.

Fernandez, C., 1996. Croissance et nutrition de *Paracentrotus lividus* dans le Cadre d'un Projet Aquacole avec Alimentation Artificielle. Thèse Doctorat. Université Corse, Corte.

Fernandez, C. 1997. Effect of diet on the biochemical composition of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) under natural and rearing conditions (effect of diet on biochemical composition of urchins). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A (4). 1377-1384.

Fernandez C., Boudouresque C., 2000. Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different artificial food. *Marine Ecology Progress Series*. 204. 131-141.

Fernandez, C., Pasqualini, V., Boudouresque, C.F., Johnson, M., Ferrat, L., Caltagirone, A., Mouillot, D., 2006. Effect of an exceptional rainfall event in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 68. 259-270.

Fernández, R. D., 2013. Caracterização do habitat preferencial do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) nas poças do intermareal rochoso da costa norte portuguesa com técnicas de análise multivariada. Tese de mestrado da Universidade do Porto, Portugal.

Gago, J., Range, P., Luís, O. J., 2003. Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. *Echinoderm research*. 269-276.

Goodbody, I. 1961. Mass mortality of a marine fauna following tropical rains. *Ecology* 42: 150-155.

- Goodwin, T.W., 1984. Animals, (2nd ed.). The Biochemistry of the Carotenoids, vol. II. Chapman & Hall, New York.
- Gomes A., Lourenço S., Santos P.M., Raposo A., Mendes S., Gonçalves S.C., Ferreira S.M.F., Pombo A., 2021. Aquaculture International. 29. 1069-1090.
- Grosjean, P., Spirlet, C., Jangoux, M., 1996. Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 201. 173–184.
- Grosjean, P., Spirlet, C., Gosselin, P., Vaitilingon, D., Jangoux, M., 1998. Land-based, closed cycle Echinoculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): a long-term experiment at a pilot scale. Journal of Shellfish Research. 17. 1523–1531.
- Grosjean P, Spirlet C, Jangoux M, 2003. A functional growth model with intraspecific competition applied to a sea urchin, *Paracentrotus lividus*. Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences. 60(3). 237–246
- Guillou, M., L. J. L. Lumingas & C. Michel. 2000. The effect of feeding or starvation on resource allocation to body components during the reproductive cycle of the sea urchin *Spaerechinus granularis* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 245. 183–196.
- Guidetti, P., Bussotti, S., and Boero, F., 2005. Evaluating the effects of protection on fish predators and sea urchins in shallow artificial rocky habitats: a case study in the northern Adriatic Sea. Marine Environmental Research. 59. 333-348.
- Hayward, P. J. & Ryland, J. S., 1990. The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe. Clarendon Press. 688.
- Hereu, B., 2005. Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. Marine Ecology. 26. 54-62.
- Hermans, J., Borremans, C., Willenz, P., André, L., Dubois, P., 2010. Temperature, Salinity and growth rate dependences of Mg/Ca and Sr/Ca ratios of the skeleton of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck): an experimental approach. Marine Biology. 157. 1293–1300.
- Hyman, L.H. (1955) *The Invertebrates: Echinodermata*. Vol. IV. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York. 763.
- Himmelman, J.H., Lavergne, Y., Axelsen, F., Cardinal, A., Bourget, E., 1983. Sea urchins in the St. Lawrence estuary: their abundance, size structure, and suitability for commercial exploitation. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 40. 474-486.
- Jacinto, D., Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L. & Cruz, T., 2013. Patterns of abundance, population size structure and microhabitat usage of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in SW Portugal and NW Italy. Marine Biology. 160(5). 1135-1146.

- Jacquín, A.G., Donval, A., Guillou, J., Leyzour, S., Deslandes, E., Guillou, M., 2006. The reproductive response of the sea urchins *Paracentrotus lividus* (G.) and *Psammechinus miliaris* (L.) to a hyperproteinated macrophytic diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 339. 43–54.
- James, P. & Siikavuopio, S. I., 2015. The effects of tank system, water velocity and water movement on survival, somatic and gonad growth of juvenile and adult green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture Research*. 46. 1501–1509.
- Jobling M., 1994. Biotic factors and growth performance. In: Jobling, M. (Ed.), *Fish Bioenergetics*. Fish and Fisheries Series, vol. 13. Chapman e Hall. 155-201.
- Kelly, M.S., Symonds, R.C., 2013. Carotenoids in sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Sea Urchins: Biology and Ecology*. Elsevier, Amsterdam. 171–178.
- Lares, M.T. & Pomory, C.M., 1998. Use of body components during starvation in *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 225. 99-106.
- Larson, B. R., Vadas, R. L., Keser, M., 1980. Feeding and nutritional ecology of *Strongylocentrotus droebachiensis* in Maine, USA. *Marine Biology*. 59. 49-62
- Lasker, R. & Giese, A.C., 1954. Nutrition of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biological Bulletin*. 106 (3). 328–340.
- Lawrence, J.M., 1975. The effect of temperature-salinity combinations on the functional well-being of adult *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 18. 271-275.
- Lawrence, J. M., and Lane, J. M., 1982. The utilization of nutrients by post-metamorphic echinoderms. In M. Jangoux and J. M. Lawrence, editors. *Nutrition of echinoderms*. Balkema, Rotterdam, The Netherlands. 331–371
- Lawrence, J.M., Olave, S., Otaiza, R., Lawrence, A.L., Bustos, E., 1995. A comparison of gonad production in *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) fed algae and prepared feeds. *Am. Zool.* 35. 109A.
- Lawrence, J.M., Olave, S., Otaiza, R., Lawrence, A.L., Bustos, E., 1997. Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*. 28. 91–96.
- Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., McBride, S., George, S.B., Watts, S.A. & Plank, L.R. 2001. Developments in the use of prepared feeds in sea-urchin aquaculture. *World Aquaculture*. 32. 34–39.
- Lawrence, J. M., Lawrence, A. L. & Watts, S. A., 2007. Chapter 7. Feeding, digestion, and digestibility, In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Edible sea urchins: biology and ecology*, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, 135–158.

- Le Gall, P., 1989. Echinoculture. In: Aquaculture (ed. G. Barnabe) Lavoisier: Paris, 1, 468–491.
- Le Gall, P., 1990. Culture of echinoderms. In: Aquaculture 1 (Barnabe, G. ed.). Ellis Horwood, New York. 443–462.
- Lesser, M.P., Carleton, K.L., Böttger, S.A., Barry, T.M. and Walker, C.W., 2011. Sea urchin tube feet are photosensory organs that express a rhabdomeric-like opsin and PAX6. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences Journal*. 278(1723), 3371-9.
- Levitán, D. R., 1988. Asynchronous spawning and aggregative behavior in the sea urchin *Diadema antillarum* Philippi. In R. D. Burke, P. V. M. Ladenov, P. Lambert, and R. Parsley, editors. *Echinoderm biology*. AA Balkema, Rotterdam, The Netherlands. 181–186.
- Levitán, D. R. 1991. Skeletal changes in the test and jaws of the sea urchin *Diadema antillarum* in response to food limitation. *Marine Biology*. 111:431–435.
- Liu, H., Chang, Y., 2015. Sea urchin aquaculture in China. In N.P.Brown S.D.Eddy (Eds), *Echinoderm aquaculture*. Singapore: C.O.S. Printers Pte Ltd. 127-146.
- Limatola N., Chun J.T., Santella L., 2020. Effects of Salinity and pH of Seawater on the Reproduction of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *The Biological Bulletin*. 239. 000-000.
- Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., Palacín, C., Morera, G., 1995. Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Programme Series*. 122, 179–191.
- Lourenço, S., Valente, L.M.P., Andrade, C., 2018. Meta-analysis on nutrition studies modulating sea urchin roe growth, colour and taste. *Reviews in Aquaculture*.
- Lourenço S, Cunha B, Raposo A, Neves M, Santos PM, Gomes AS, Tecelão C, Ferreira SMF, Baptista T, Gonçalves SC, Pombo, A., 2021. Somatic growth and gonadal development of juvenile *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) fed with diets of different ingredient sources. *Aquaculture* 736589.
- Luis O, Delgado F, Gago J., 2005. Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquatic Living Resources*. 18. 45–54.
- Machado, I., Moura, P., Pereira, F., Vasconcelos, P., Gaspar, M.B., 2019. Reproductive cycle of the commercially harvested sea urchin (*Paracentrotus lividus*) along the western coast of Portugal. *Invertebrate Biology*. 138. 40–54.
- Marcus, N. H. 1983. Phenotypic variability in echinoderms. *Echinoderm Studies*. 1. 19–37.

- Martinell, J. 1981. Actividad erosiva de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) en el litoral gerundense. *Oecologia Aquatica*. 5, 219-225.
- Matsuno, T., Tsushima, T., 2001. Carotenoids in sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Edible sea urchins: Biology and Ecology*. Amsterdam, Elsevier. 115–138.
- McBride, S.C., Pinnix, W.D., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., Mulligan, T.M., 1997. The effect of temperature on production of gonads by the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* fed natural and prepared diets. *Journal of World Aquaculture Society*. 28. 357– 365.
- McBride, S. C., Price, R. J., Tom, P. D., Lawrence, J. M., Lawrence, A. L., 2004. Comparison of gonad quality factors: colour, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture*. 233. 405–422.
- McBride, S.C., 2005. Sea urchin aquaculture. *American Fisheries Society Symposium*. 46. 179–208.
- McCarron E., Burnell G., Mouzakitis G., 2009. Growth assessment on three size classes of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* using continuous and intermittent feeding regimes. *Aquaculture*. 288. 83-91.
- McCarron E., Burnell G., Kerry J., Mouzakitis G., 2010. An experimental assessment on the effects of photoperiod treatments on the somatic and gonadal growth of the juvenile European purple sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture Research*. 41. 1072-1081.
- McLaughlin, G., Kelly, M.S., 2001. Effect of artificial diets containing carotenoid-rich microalgae on gonad growth and colour in the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*. 20 (1). 377– 382.
- Meijer L., e Guerrier P., 1984. Effects of seawater acidification in starfish oocytes. *International review of cytology*. 86. 129-196.
- Metaxas A., 2013. Larval ecology of echinoids. In: Lawrence, J.M. (Ed) *Sea urchins: Biology and Ecology*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 313-327.
- Mortensen, T.H., 1927. *Handbook of the Echinoderms of the British Isles*. Clarendon Press, Oxford. 471.
- Mortensen, T., 1943. A monograph of the Echinoidea, III.3 Camarodonta. II. Echinidae, Strongylocentrotidae, Paraseleniidae, Echinometridae. CA Reitzel, Copenhagen. 446.
- Mos, B., Cowden, K.L., Nielsen, S.J. & Dworjanyn, S.A., 2011. Do cues matter? Highly inductive settlement cues don't ensure high post-settlement survival in sea urchin aquaculture. *PLoS ONE*. 6 (12). e28054
- Neill, F. X. & Pastor, R., 1973. Relaciones tróficas de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) en la zona litoral. *Investigación Pesquera*. 37 (1). 1-7.

- Nestler, E.C. & Harris, L.G., 1994. The importance of omnivory in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muller) in the Gulf of Maine. *Echinoderms through Times*.
- Ouréns, R., Fernández, L., Freire, J., 2011. Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*. 158. 793–804.
- Pearce, C.M., Daggett, T.L., Robinson, S.M.C., 2002. Effect of protein source ratio and protein concentration in prepared diets on gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 214. 307–332.
- Pearce, C.M., Daggett, T.L., Robinson, S.M.C., 2004. Effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*. 233. 337–367.
- Pearse, J.S., Cameron, R.A., 1991. Echinoderme: Echinoidea. In: Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B. (Eds.), *Reproduction of Marine Invertebrates*. 6. The Boxwood Press, California. 513-662.
- Pedrotti, M. L., 1993. Spatial and temporal distribution and recruitment of echinoderm larvae in the Ligurian Sea. *Journal of Marine Biology Association UK*. 73. 513–530.
- Plank, L. R., 2000. The effect of dietary carotenoids on gonad growth, development and color in *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) (Master's thesis). University of South Florida, Tampa, FL.
- Prato, E., Fanalli, G., Agioni A., Biandolino, F., Parlapiano, I., Papa, L., Denti, G., Secci, M., Chiantore, M., Kelly, M.S., Ferranti M.P., Addis, P., 2018. Influence of a prepared diet and a macroalga (*Ulva* sp.) on the growth, nutritional and sensory qualities of gonads of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 493. 240-250.
- Prato, E., Chiantore, M., Kelly, M.S., Hughes, A.D., James, P., Ferranti, M.P., Biandolino, F., Parlapiano, I., Sicuro, B., Fanelli, G., 2018b. Effect of formulated diets on the proximate composition and fatty acid profiles of sea urchin *Paracentrotus lividus* gonad. *Aquaculture International*. 26. 185–202.
- Rahman, S., Tsuchiya, M., Uehara, T., 2009. Effects of temperature on hatching rate, embryonic development and early larval survival of the edible sea urchin, *Tripneustes gratilla*. *Biologia*. 64. 768-775.
- Raible F., Tessmar-Raible K., Arboleda E., Kaller T., Bork, P., Arendt, D. and Amone, M. I., 2006. Opsins and clusters of sensory G-protein coupled receptors in the sea urchin genome. *Developmental Biology*. 300. 461–475.
- Ranking J.C., Jensen F.B., 1993. *Fish ecophysiology*. Fish and Fisheries Series, vol. 9. Chapman e Hall. 161-180.
- Raposo A.I.G., Ferreira S.M.F, Ramos R., Santos P.M., Anjos C., Baptista T., Tecelão C., Costa J.L., Pombo A., 2019. Effetc of three diets on the gametogenic development and fattyacid profile of *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) gonads. *Aquaculture research*. 50. 2023-2038.

- Régis, M. B., 1979. Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoides (*Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*) du Golfe de Marseille. *Tethys* 9. 167–181.
- Reverdin G., Kestenare E., Frankignoul C., Delcroix, 2007. Surface salinity in the Atlantic Ocean. *Progress in Oceanography*. 73. 311-340.
- Robinson, S.M.C., Colborne, L., 1998. Roe enhancement trials of the green sea urchin using an artificial food source. In: Moo, R., Telford, M. (Eds.), *Proceedings of the 9th International Echinoderm Conference*, San Francisco, 1996. 803.
- Robinson, S.M.C., Castell, J.D., Kennedy, E.J., 2002. Developing suitable colour in the gonads of cultured green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*. 206. 289–303.
- Rocha, F., Baião, L.F., Montinho, S., Reis, B., Oliveira, A., Arenas, F., Maia, M.R.G., Fonseca, A.J.M., Pintado, M., Valente, L.M.P., 2018. The effect of sex, season and gametogenic cycle on gonad yield, biochemical composition and quality traits of *Paracentrotus lividus* along the North Atlantic coast of Portugal. *Scientific Reports*. 9. 2994.
- Rocha, F., Rocha, A.C., Baião, L.F., Gadelha, J., Camacho, C., Carvalho, M.L., Arenas, F., Oliveira, A., Maia, M.R.G., Cabrita, A.R., Pintado, M., Nunes, M.L., Almeida, C.M.R., Valente, L.M.P., 2019. Seasonal effect in nutritional quality and safety of the wild sea urchin *Paracentrotus lividus* harvested in the European Atlantic shores. *Food Chemistry*. 282. 84–94.
- Rodde C., Chatain B., Vandeputte M., Trinh T. Q., Benzie J.A.H., Verdal. H., 2020. Can individual conversion ratio at commercial size be predicted from juvenile performance in individually reared Nile tilapia *Oreochromis niloticus*? *Aquaculture Reports* 17. 100349
- Roller, R.A. & Stickle, W.B. 1993. Effect of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata : Echinoidea). *Marine Biology*. 116: 583-591.
- Saldanha, L. (2003). *Fauna Submarina Atlântica*. 4ª Edição Publicações Europa-América. Portugal, 232.
- San Martin, G. A., 1995. Contribution à la gestion des stocks d'oursins: étude des populations et transplantations de *Paracentrotus lividus* à Marseille (France, Méditerranée) et production de *Loxechinus albus* à Chiloe (Chili, Pacifique). Doctoral dissertation, Université d'Aix – Marseille II, Marseille, France, 166.
- Santos, P.M., Ferreira, S.M.F., Albano, P., Raposo A., Costa J.L., Pombo A., 2019. Can artificial diets be a feasible alternative for the gonadal growth and maturation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)? *World Aquaculture Society*. 51. 463-487.
- Santos P.M., Albano P., Raposo A., Ferreira S.M.F., Costa J.L., Pombo A., 2020. The effect of temperature on somatic and gonadal development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture*. 528. 735487.

Sartori, D., 2013. Echinoculture: rearing of *Paracentrotus lividus* in recirculating aquaculture system. Experimentations of artificial diets for sexual maturation. Doctoral dissertation, University of Naples "Federico II". Napoli, Italy. 82.

Sartori, D. and Gaion, A., 2015. Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility evaluation. *Aquaculture Nutrition*. 22, 1214-1221.

Sartori, D., Pellegrini, D., Macchia, S., Gaion, A., 2016. Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 451, 39-46.

Schlosser S.C., Lupatsch I., Lawrence J.M., Lawrence A., Shpigel M., 2005. Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) fed algal and prepared diets during spring and fall. *Aquaculture Research*. 36. 972-982.

Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S. & Green, D. H. 2015. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*. 27(1). 363-373.

Sellem F., Langar H., Pesando D., 2000. Age et croissance de l'oursin *Paracentrotus lividus* Lamarck, 1816 (Echinodermata-Echinoidea) dans le golfe de Tunis (Méditerranée). *Oceanol Acta*. 23(5). 607-613

Shina, A., Gross, J., Lifshitz, A., 1978. Carotenoids of the invertebrates of the Red Sea (Eilat Shore): II. Carotenoid pigments in the gonads of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinodermata). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 61B. 123-128.

Shpigel M., McBride S.C., Marciano S., Lupatsch I., 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 232. 343-355.

Shpigel, M., McBride, S.C., Marciano, S., Ron, S., Ben-Amotz, A., 2005. Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 245. 101-109.

Shpigel, M., Schlosser, S.C., Ben-Amotz, A., Lawrence, A.L., Lawrence, J.M., 2006. Effects of dietary carotenoid on the gut and the gonad of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 261. 1269-1280.

Siikavuopio S.I., Dale T., Mortensen A., 2007. The effects of stocking density on gonad growth, survival and feed intake of adult green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*. 262. 78-85.

Siikavuopio S.I., James P., Lysne H., Seather B.S., Samuelsen T.A, Mortensen A., 2012. Effects of size and temperature on growth and feed conversion of juvenile green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*. 354-355. 27-30

- Smith, A.; Kroh, A. 2013. Capítulo 1 Phylogeny of Sea Urchins em Lawrence. J. Sea urchins: Biology and ecology, Tampa, Florida, USA.
- Sonu, S.C. 2003. The Japanese sea urchin market. NOAA Technical Memorandum NMFS.
- Sun, J.; Chiang, F. 2015. Capítulo 2- Use and exploitation of sea urchins. Brown, P.; Eddy, D. Echinoderm Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M., 1998. Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of maturity index. Invertebrate Reproduction and Development. 34. 69–81.
- Spirlet, C., Grosjean, P., & Jangoux, M., 1998b. Optimizing food distribution in closed-circuit cultivation of edible sea urchins (*Paracentrotus lividus*: Echinoidea). Aquatic Living Resources. 11. 4. 273–277.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M., 2000. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). Aquaculture 185, 85–99.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M., 2001. Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. Aquaculture Nutrition. 7, 91-100.
- Suckling C.C., Symonds R.C., Kelly M.S., Young A.J., 2011. The effect of artificial diets on gonad colour and biomass in the edible sea urchin *Psammechinus miliaris*. Aquaculture. 318. 335-342.
- Stefánsson, G., Kristinsson, H., Ziemer, N., Hannon, C., James, P., 2017. Markets for Sea Urchins: A Review of Global Supply and Markets. Food Research, Innovation and Safety. 45.
- Stickle, W. B. & Denoux G. J. 1976. Effects of in situ tital salinity fluctuation on osmotic and ionic composition of body fluid in southeastern Alaska rocky intertidal fauna. Marine Biology. 37. 125–135.
- Stickle, W. B. & W. J. Diehl. 1987. Effects of salinity on echinoderms. Echinoderm Studies. 2. 235–285.
- Symonds, R.C., Kelly, M.S., Caris-Veyrat, C., Young, A.J., 2007. Carotenoids in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: occurrence of 9'-cis-echinenone as the dominant carotenoid in gonad colour determination. Comparative Biochemistry and Physiology. B: Biochemistry Molecular Biology. 148. 432–444.
- Thetmeyer H., Walker U., Black K.D., Inselman S., Rosenthal, 1999. Growth of European sea bass (*Discentrarchus labrax* L.) under hypoxia and oscillating oxygen condition. Aquaculture. 174. 355-367.
- Tortonese, E. (1965). Fauna d'Italia; Echinodermata. Edizioni Calderini, Bologna. 422.

- Turon, X., Giribet, G., López, S., Palacín, C., 1995. Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Programme Series*. 122. 193–204.
- Vacquier, V.D., 2011. Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 78. 553-564.
- Vadas, R. L. 1977. Preferential feeding: an optimization strategy in sea urchins. *Ecological Monographs*. 47. 337–371.
- Verlaque, M., 1987. Relations entre *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et le phytobenthos de Méditerranée occidentale. In: Boudouresque CF (ed) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. Groupement d'Interet Scientifique Pour L'environnement Marin en particulier des Posidonies, Marseille, 5–36.
- Vizzini, S., Miccichè, L., Vaccaro, A., Mazzola, A., 2015. Use of fresh vegetable discards as sea urchin diet: effect on gonad index and quality. *Aquaculture international*. 23. 127-139.
- Walker, C. W., 1979. Ultrastructure of the somatic portion of the gonads in asteroids, with emphasis on flagellated-collar c-ells and nutrient transport. *Journal of Morphology*, 166. 81–107.
- Walker, C.W., Lesser, M.P., 1998. Manipulation of food and photoperiod promotes out of-season gametogenesis in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Mar. Biol.* 132. 663– 676.
- Watts, S.A., Boettger, S.A., McClintock, J.B., Lawrence, J.M., 1998. Gonad production in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck) fed prepared diets. *Journal of Shellfish Research*. 17 (5). 1591– 1595.
- Watts, S.A., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., 2010. Approaches to the study of sea urchin nutrition. In: Harris, L.G., Böttger, S.A., Walker, C.W. & Lesser, M.P. (eds), *Proceedings of the 12th International Echinoderm Conference*. CRC Press/Balkema, Durham. 331–345.
- Wedemeyer G.A., 1996. *Physiology of fish in intensive Culture Systems*. Chapman e Hall. 277.
- Williams, C.T., Harris, L.G., 1998. Growth of juvenile green urchins on natural and artificial diets. In: Mooi, Telford (Eds.), *Echinoderms*. 887–892.
- Wood C.M.C., James P.J., Moss G.A., Wright J., Siikavuopio S., 2008. A comparison of the effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the sea urchin *Evechinus chloroticus* Valenciennes. *Aquaculture International*. 16. 49-68.

Xing, R., Wang, C., Cao, X., Chang, Y., 2007. The potential value of different species of benthic diatoms as food for newly metamorphosed sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture*. 263. 142–149.

Yokota, Y., 2002. Fishery and consumption of the sea urchin in Japan. In: Yokota, Y., Matranga, V. & Smolenicka, Z. (eds), *The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture*. A.A. Balkema Publishers. 29–138.