

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) e o efeito de três
dietas no desenvolvimento das suas gónadas.



Andreia I. G. Raposo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura
2017

Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) e o efeito
de três dietas no desenvolvimento das suas
gónadas

Andreia I. G. Raposo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Ana Pombo e
coorientação da Doutora Susana Ferreira

2017

Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e o efeito de três dietas no desenvolvimento das suas gónadas

Copyrights © Andreia I. G. Raposo

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

Agradecimentos:

Agradeço às minhas orientadoras Professora Ana Pombo e Professora Susana Ferreira pela oportunidade de trabalhar com ambas e confiança que depositaram em mim.

Para trabalhar os dados foi imprescindível a ajuda da Professora Carla Tecelão, da área da Bioquímica, e da Professora Susana Mendes da área da Estatística.

Não poderia deixar de parte as minhas colegas *Catarinas* (Barraca e Rosado) mas em especial à Catarina Anjos por tudo o que me ensinou e por toda a paciência que teve para lidar com a minha teimosia e mau feitio!

Um enorme obrigado há minha família por acreditarem em mim e me darem força quando tudo parecia estar a correr mal. Um especial agradecimento ao meu namorado, Pedro Correia, que foi a pessoa que mais sofreu com o meu mau humor e falta de paciência!

Obrigado a todos por me terem ajudado a cumprir mais esta etapa da minha vida!

Publicações:

O presente trabalho resultou diretamente nas seguintes produções científicas:

- Raposo A, Ferreira SM, Ramos R, Anjos CM, Baptista TM, Tecelão C, Gonçalves SC and Pombo A (2016). Effect of three diets in the gonadal growth and maturation of *Paracentrotus lividus*. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR - International Meeting on Marine Research 2016. doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00030 (Poster).
- Raposo A, Ramos R, Anjos CM, Pombo A, Ferreira SM, Baptista TM, Gonçalves SC and Tecelão C (2016). Effect of three diets on gonad fatty acid composition of reared sea urchin *Paracentrotus lividus*. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR - International Meeting on Marine Research 2016. doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00034 (Poster).
- Raposo A, Ramos R, Anjos CM, Pombo A, Tecelão C, Gonçalves S, Baptista T and Ferreira S (2016). Biological characterization of the reproductive cycle of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) in the western central region of Portugal (Peniche). Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR - International Meeting on Marine Research 2016. doi:10.3389/conf.FMARS.2016.04.00035 (Poster).

Resumo

As gónadas de ouriço-do-mar são uma iguaria, apreciada há muito tempo, não só pelos povos Asiático e Nórdico, mas também em Espanha e nalgumas regiões costeiras de Portugal. Peniche e Ericeira são das principais localidades onde existe o hábito da apanha do ouriço-do-mar, quer para fins lúdicos ou comerciais. De forma a garantir o equilíbrio das populações do ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus*, torna-se crucial estudar estas populações e criar novas formas para atender à procura desta iguaria. A aquacultura de ouriços-do-mar tem sido vista como uma possível alternativa. Nos últimos anos, foram desenvolvidos estudos sobre a sua produção e nutrição. Mais recentemente, os Europeus são os que têm vindo a demonstrar um maior interesse neste grupo de invertebrados. O foco tem-se centrado maioritariamente no estudo de novas técnicas de crescimento larvar e desenvolvimento de novas dietas, para melhoramento das gónadas.

Neste estudo foi caracterizado o ciclo gametogénico do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. As épocas de reprodução e postura, que são tão importantes na compreensão do seu ciclo de vida, foram identificadas. Através de técnicas histológicas foi possível verificar que os ouriços-do-mar se encontravam maduros nos meses de abril e maio, realizando a postura nos meses de Verão. Além disso, avaliou-se o efeito de três dietas diferentes na maturação das suas gónadas. As dietas utilizadas foram: (A) *Codium tomentosum*, uma macro alga verde que se encontra naturalmente no seu habitat; (B) um *mix* de vegetais e algas gelificados e (C) milho e espinafres. No final do ensaio, através da comparação dos valores dos índices gonadossomáticos e da composição nutricional das gónadas, concluiu-se que o uso de uma dieta composta por milho e espinafres é bastante vantajosa a nível comercial. A dieta gelificada que continha o *mix* de vegetais e algas (dieta B) revelou ser bem aceite pelos ouriços-do-mar. No entanto, os ouriços-do-mar alimentados com essa dieta apresentaram valores de índice gonadossomático inferiores ($3,80 \pm 2,37 \%$), em relação aos alimentados com a dieta C ($9,97 \pm 6,4 \%$). A quantidade de lípidos também foi inferior nos indivíduos alimentados com a dieta B ($27,34 \pm 7,37 \text{ mg g}^{-1}$), quando comparados com os alimentados com a dieta C (milho e espinafres) ($46,97 \pm 25,99 \text{ mg g}^{-1}$). As gónadas de *P. lividus* mostraram ser compostas por uma percentagem elevada de ácidos gordos saturados, principalmente nos indivíduos alimentados com a dieta A ($53,9 \pm 13,6 \%$) e B ($50,1 \pm 14,3 \%$). Os indivíduos alimentados com a dieta C mostraram ser nutricionalmente mais ricos, apresentando valores mais elevados de PUFA (A – $27,9 \pm 11,6 \%$; B – $31,0 \pm 10,2 \%$; C – $37,1 \pm 3,0 \%$).

Abstract:

The sea urchin gonads have been considered one of the most appreciated delicacies, not only by the Asian and Nordic people, but also in Spain and in some coastal regions of Portugal. Peniche and Ericeira are two of the main places where there is the habit of capturing sea urchins, either for recreational or commercial purposes. In order to ensure the balance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations, it is crucial to study them and create new alternatives to meet the demand for this delicacy. Aquaculture of sea urchins has been considered a possible alternative. In the last years, studies on aquaculture and nutrition of sea urchins have grown exponentially. Recently, the Europeans have been the ones who have shown greater interest in this invertebrate group. The focus has been mainly in the study of new techniques for larval growth and new feeds for improving the quantitative and qualitative attributes of the gonads.

In this study, the gametogenic cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* was characterized. Thus, the breeding and spawning seasons were identified, which are so important to understand the life cycle of the species. The maturation state of the gonads was assessed through histological techniques. The sea urchins matured in the months of April and May and spawned during the summer.

Furthermore, it was evaluated the effects of three different diets in the development of *Paracentrotus lividus* gonads. The diets consisted on: (A) *Codium tomentosum*, a green macroalgae that occurs naturally in the habitat of *P. lividus*; (B) a jellified mix of vegetables and algae; (C) maize and spinach. At the end of the trial, it was concluded that the use of a diet with maize and spinach brought commercial advantages, by comparing the values of the gonadosomatic index and the nutritional value of the gonads. The diet containing a jellified mix of vegetables and algae (diet B) was found to be well accepted by sea urchins. Nevertheless, sea urchins fed with this diet presented lower values of the gonadosomatic index (3.80 ± 2.37 %) than those fed with the diet C (9.97 ± 6.4 %). The amount of lipids was also lower in sea urchins fed with diet B (27.34 ± 7.37 mg g⁻¹), when compared to those fed with the diet C (maize and spinach; 46.97 ± 25.99 mg g⁻¹). The gonads of *P. lividus* showed to be composed by a high percentage of saturated fatty acids, mainly in the individuals fed with diet A (53.9 ± 13.6 %) and B (50.1 ± 14.3 %). The individuals fed with the diet C showed to be nutritionally richer, presenting higher values of PUFA (A - 27.9 ± 11.6 %; B - 31.0 ± 10.2 %; C - $37.1 \pm 3, 0$ %).

Key-words: sea urchin; reproductive biology; histology; aquaculture.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Apanha do Ouriço-do-mar em Portugal	2
1.2. Aquacultura de ouriços-do-mar.....	3
1.3. Biologia da espécie	4
1.3.1. Hábitos alimentares	6
1.3.2. Reprodução	7
1.3.2.1. Gametogénese.....	11
1.3.2.2. Postura.....	12
1.4. Objetivos do estudo.....	13
2. Materiais e métodos.....	15
2.1. Caracterização da Biologia reprodutiva de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	15
2.1.1. Recolha de espécimes.....	15
2.1.2. Recolha de dados biométricos	15
2.1.3. Histologia	16
2.2. Efeito de três dietas no desenvolvimento das gónadas de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	17
2.2.1. Aquisição e acondicionamento dos organismos.....	17
2.2.2. Período de jejum.....	17
2.2.3. Ensaio experimental	18
2.2.3.1. Dietas.....	18
2.2.4. Recolha de dados biométricos	19
2.2.5. Histologia.....	19
2.2.6. Análises bioquímicas	19
2.3. Análise de dados.....	21
3. Resultados.....	23
3.1. Caracterização da Biologia reprodutiva de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	23
3.1.1. Dados biométricos	23
3.1.2. Histologia.....	27
3.1.2.1. Gametogénese.....	33

3.2. Efeito de três dietas no desenvolvimento das gónadas de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	34
3.2.1. Dados biométricos	34
3.2.1.1. Jejum	34
3.2.1.2. Ensaio	34
3.2.1.3. Taxa de ingestão alimentar	35
3.2.2. Histologia	36
3.2.3. Análises bioquímicas	37
3.2.3.1. Lípidos totais e ácidos gordos nas dietas	37
3.2.3.2. Lípidos totais e ácidos gordos nas gónadas de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	40
4. Discussão	42
4.1. Caracterização da Biologia reprodutiva de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	42
4.2. Efeito de três dietas no desenvolvimento das gónadas de <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	48
5. Considerações finais.....	53
Referências bibliográficas	55
Anexos.....	67

Índice de tabelas

Tabela 1 – Identificação e quantificação de ácidos gordos presentes nas diferentes dietas (média \pm desvio-padrão, percentagem), fornecidas aos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (A – *Codium tomentosum*; B – Mix de algas e vegetais; C – Milho e espinafres).....39

Tabela 2 – Identificação e quantificação de ácidos gordos presentes nas gónadas dos ouriços-do-mar, alimentados com diferentes dietas (A – *Codium tomentosum*; B – Mix de algas e vegetais; C – Milho e espinafres).....41

Tabela 3 – Épocas de postura de *Paracentrotus lividus* em diferentes locais.....44

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema representativo do ciclo de vida do ouriço-do-mar (adaptado de Carboni, 2013).....	8
Figura 2 – (A) Representação esquemática do sistema reprodutivo ouriço-do-mar em vista lateral e aboral; (B) Representação esquemática dos tecidos da parede da gónada; (C) Uma gónada ouriço-do-mar, onde se vê os músculos na superfície exterior da cavidade genital hemal (GHS) do saco interior (tiras brancas). A - ânus; CTL - camada de tecido conjuntivo; GL - lúmen das gónadas; H – placa madrepórica; NP - fagócitos nutritivos; GCS – cavidade celómica genital; GHS - cavidade genital hemal; TF- pés ambulacrários; VP - peritoneu visceral (adaptado de Carboni, 2013).....	10
Figura 3 – Variação do diâmetro da carapaça (DC) e peso húmido (P) de <i>Paracentrotus lividus</i> , na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.....	23
Figura 4 – Variação do peso das gónadas (PG) e do índice gonadossomático (IG) de <i>Paracentrotus lividus</i> , na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.....	24
Figura 5 – Variação da temperatura média mensal da água do mar (T), do fotoperíodo em número médio de horas de luz diárias por mês (FP) e do índice gonadossomático (IG) de <i>Paracentrotus lividus</i> , na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.....	25
Figura 6 – Variação do diâmetro dos oócitos (DO) nas gónadas de <i>Paracentrotus lividus</i> fêmeas, na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.....	26
Figura 7 – Frequência relativa de machos e fêmeas de <i>Paracentrotus lividus</i> , durante 12 meses de amostragem na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.....	26
Figura 8 – Ciclo gametogénico feminino da espécie <i>Paracentrotus lividus</i>	29
Figura 9 - Ciclo gametogénico masculino da espécie <i>Paracentrotus lividus</i>	31
Figura 10 – Frequência relativa dos estádios gametogénicos de <i>Paracentrotus lividus</i> ao longo dos 12 meses de amostragem na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016. I – Inicial; II – Crescimento; III – Prematuro; IV – Maturados; V – Postura; VI – Pós-postura; VII– Reabsorção.....	33
Figura 11 – (A) Peso gonadal (PG) e (B) índice gonadossomático (IG) dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> sujeitos a diferentes dietas. Dieta A – <i>Codium tomentosum</i> ; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. As letras <u>a</u> e <u>b</u> representam grupos com diferenças estatisticamente significativas.....	35
Figura 12 – Quantidade média de alimento ingerido até ao final do ensaio, de cada dieta fornecida aos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> . Dieta A – <i>Codium tomentosum</i> ; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. Letras a e b indicam as diferenças significativas (p <0,05).....	36

Figura 13 – Frequência relativa dos estádios gametogénicos identificados nos indivíduos *Paracentrotus lividus*, alimentados com diferentes dietas. Dieta A – *Codium tomentosum*; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. I – fase inicial; II – crescimento; III – pré-maturação; IV – Maturação; V – Postura; VI – pós-postura; VII – reabsorção.....37

Figura 14 – Quantidade de lípidos presentes nas diferentes dietas (mg g⁻¹) fornecidas aos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Dieta A – *Codium tomentosum*; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. Letras a, b e c representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....38

Figura 15 – Quantidade de lípidos presentes nas gónadas dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, alimentados com diferentes dietas (A – *Codium tomentosum*; B – Mix de algas e vegetais; C – Milho e espinafres) (mg g⁻¹). Letras a e b representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....41

1. Introdução

Tendo em conta o atual declínio dos recursos pesqueiros em Portugal e no resto do Mundo, é necessário que haja um foco nos recursos menos conhecidos ou não tão comuns. Embora sejam nativos em toda a costa Portuguesa, os ouriços-do-mar são um recurso que tem passado despercebido. Não é por serem menos conhecidos que os torna menos importantes, pelo contrário, são determinantes no que diz respeito ao equilíbrio das comunidades onde estão inseridos (Fernandez, 1997; Gago *et al.*, 2003). São considerados os maiores consumidores de macroalgas, controlando assim o crescimento e a propagação excessiva das mesmas (Boudouresque and Verlaque, 2007). Além disso, os ouriços-do-mar adultos servem muitas vezes de abrigo para a pequenos organismo invertebrados, como os ofiúros, poliquetas ou lesmas-do-mar (Brusca and Brusca, 2003).

Este estudo focou-se em *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) que é uma das espécies de ouriço-do-mar que aparece ao longo de todas as zonas intermareais rochosas da costa Portuguesa. Em Portugal, é uma espécie bem conhecida, especialmente em pequenas comunidades nas zonas do litoral Norte (Bertocci *et al.*, 2012; Domínguez *et al.*, 2015), no Oeste (Peniche e Ericeira; Silva, 2012) e Sudoeste (Jacinto *et al.*, 2013), assim como, nas ilhas da Macaronésia (Alves *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2012). Mundialmente, esta espécie distribui-se pelas costas do Nordeste Atlântico, desde o Norte de França (Allain, 1975) até ao sul de Marrocos (Bayed *et al.*, 2005), incluindo as Ilhas Britânicas (Byrne, 1990) mas também por todo o Mediterrâneo, sendo mais abundante no Mediterrâneo ocidental (Hereu *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2006; Lawrence, 2013), incluindo os mares das Baleares (Haya de la Sierra, 1990; Catoira, 1995; Hereu *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2006; Ouréns *et al.*, 2013; Lawrence, 2013), o mar Tirreno, Jónico (Pais *et al.*, 2007; Guidetti *et al.*, 2004; Pais *et al.*, 2012), Adriático e, mais a Oriente, o mar Egeu (Warnau *et al.*, 1995; Boudouresque and Verlaque, 2007; Pais *et al.*, 2007; Tomšić *et al.*, 2010).

Os estudos que têm surgido incidem sobre o impacto da apanha no estado ecológico das populações de *P. lividus*, no Litoral Norte de Portugal (Bertocci *et al.*, 2012; Bertocci *et al.*, 2014), ou ainda sobre alguns aspetos particulares inerentes à sua dinâmica populacional (Jacinto and Cruz, 2012; Jacinto *et al.*, 2013; Fernández, 2013; Domínguez *et al.*, 2015), bem como o estudo de alguns aspetos relativos à sua reprodução e distribuição espacial (Gago *et al.*, 2003). No entanto, muito permanece por se conhecer sobre *P. lividus*, nomeadamente no que respeita à sua biologia reprodutiva. Este aspeto torna-se mais relevante, quando se contempla a

crescente importância económica desta espécie, enquanto um recurso natural. Os impactos da sua apanha, ainda com pouca regulamentação, poderão traduzir-se numa sobre-exploração dos stocks das populações de ouriços-do-mar. A solução, para evitar este problema, poderá passar pela eventual produção controlada de *P. lividus* em Aquacultura. O estudo da biologia reprodutiva de *P. lividus* é crucial, para desenvolver as técnicas necessárias à produção desta espécie.

1.1. Apanha do Ouriço-do-mar

No Mediterrâneo, Norte da Ásia, Nova Zelândia e Chile, a apanha de diferentes espécies de ouriços-do-mar como recurso pesqueiro, tem sido realizada desde o início do século XVII, com dramáticas consequências ecológicas em todo o mundo (Andrew *et al.*, 2002). Nestas regiões, as espécies mais exploradas foram *Loxechinus albus* e *Strongylocentrotus* sp. Enquanto no Mediterrâneo, a espécie mais afetada foi *Paracentrotus lividus*, cujas gónadas laranjas-avermelhadas, pela presença considerável de carotenoides, devem a sua qualidade ao elevado conteúdo nutricional (Sartori *et al.*, 2016). A demanda mundial por gónadas (mais conhecidas por “ovas”) tem aumentado significativamente desde o início dos anos 70, atingindo seu máximo em 1995, com desembarques de 113 654 toneladas (valor três vezes maior do que o registrado em 1970). Atualmente sofreu um declínio ligeiro, para 100 000 toneladas (Sartori *et al.*, 2016).

Em Portugal, a apanha do ouriço-do-mar tem essencialmente uma componente familiar/lúdica e sazonal. A apanha estende-se por toda a costa rochosa Portuguesa, mas realiza-se com maior foco na costa Alentejana (Castro, 2004). No Litoral Norte, a apanha do ouriço-do-mar tem uma componente mais económica, uma vez que existem empresas que compram os organismos para exportação (Fernández, 2013). A apanha do ouriço-do-mar é uma atividade de marisqueiros inter ou submareais, geralmente realizada com o auxílio de um bicheiro ou faca (Castro, 2004; Fernández, 2013). Esta apanha ocorre entre os meses de dezembro e abril, período em que as gónadas atingem um maior volume, uma melhor textura e sabor (Fernández, 2013). A maioria das populações que residem nos locais onde esta atividade se pratica, evidenciaram a perda de hábitos/tradição e consequente diminuição da apanha, também devido à legislação atual (Mamede, 2014). Mas ainda resiste a tradição da “Ouriçada” na altura da Páscoa, em que os populares se juntam para apanhar e confeccionar as gónadas dos ouriços-do-mar. Mesmo fora da época festiva, é hábito de algumas famílias, repetirem o convívio aos fins-de-semana e/ou feriados (Castro, 2004; Mamede, 2014). Contudo, após 2015, com o aparecimento do Festival do Ouriço-do-mar, na Ericeira, parece haver uma

tendência (ainda não reportada) para o aumento da apanha de ouriços-do-mar na costa Oeste. Os apanhadores e distribuidores alertam para a diminuição muito acentuada do recurso (observação pessoal).

1.2. Aquacultura de ouriços-do-mar

Com o aumento da população mundial, torna-se cada vez mais difícil atender à demanda por vários recursos pesqueiros. O histórico da pesca dos ouriços-do-mar não difere muito dos demais recursos marinhos costeiros: a sua sobre-exploração o que tem levado a vários os esforços para desenvolver o sector aquícola, de forma a satisfazer e expandir o mercado comercial e tentar evitar a depleção dos *stocks* naturais.

A aquacultura de ouriços-do-mar primeiro surgiu no Japão, em 1968, quando os *stocks* de *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1863) começaram a entrar em declínio (McBride, 2005). Várias aquaculturas produziam pequenos ouriços-do-mar, para unidades cooperativas, que ficavam responsáveis pelos programas de repovoamento. Atualmente são feitos cultivos intensivos em sistemas de jaulas, onde os ouriços-do-mar são alimentados com algas produzidas em cativeiro, até atingirem o tamanho de mercado (McBride, 2005).

Na América do Sul, os ouriços-do-mar também são bastante apreciados, principalmente no Chile. A espécie mais comum é *Loxechinus albus* (Molina, 1782) e a sua produção representa cerca de 50% do mercado mundial. Apenas 10% são consumidos no Chile (Roa, 2003).

Na Europa, os *stocks* de ouriços-do-mar também diminuíram drasticamente, obrigando os países a desenvolver novas técnicas de aquacultura (McBride, 2005). Nas últimas duas décadas, várias espécies de ouriços-do-mar têm sido estudadas com vista a sua produção em aquacultura. Países como a Noruega, Irlanda e Islândia, são os principais propulsores no estudo de *Paracentrotus lividus* (James and Siikavuopio, 2015). Atualmente, a aquacultura de ouriços-do-mar tem surgido em duas vertentes: 1) a produção de larvas e/ou juvenis para repovoamento ou venda a outras empresas; 2) no melhoramento da qualidade e quantidade de gónada (ovas), dos indivíduos capturados no ambiente selvagem (Pearce *et al.*, 2004; James and Siikavuopio, 2015).

De acordo com dados divulgados pela FAO (2012), a produção de *P. lividus*, em Aquacultura na Europa, é de 10 toneladas por ano, enquanto os desembarques em terra registam 108 toneladas por ano. Torna-se evidente a necessidade urgente do desenvolvimento de estratégias rápidas e fiáveis, que visem responder à sua sobre-exploração (Sartori *et al.*, 2016). O desenvolvimento de novas técnicas na aquacultura de ouriços-do-mar torna-se imperativo para a expansão do setor, para

fornecer novos produtos para mercados em crescimento e novas oportunidades de emprego. O equilíbrio adequado entre a identificação da potencialidade do mercado, as prioridades da investigação e a eventual produção e fornecimento de um produto de qualidade superior, são critérios fundamentais para o sucesso da aquacultura de ouriços-do-mar (McBride, 2005).

1.3. Biologia da espécie

Os ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* são organismos que apresentam uma elevada tolerância à pressão fisiológica, resistindo a elevados níveis de salinidade, temperatura, dessecação ou escassez de alimento, durante longos períodos de tempo (Allain, 1975; Le Gall *et al.*, 1989; Fernández, 2013; Hereu, 2005). De outra forma, ser-lhes-ia impossível viver em pequenas poças de maré.

Paracentrotus lividus é considerado adulto, quando atinge os 30 mm de diâmetro de carapaça (Ouréns *et al.*, 2011). Existem relatos de indivíduos desta espécie atingirem tamanhos superiores a 75 mm de diâmetro, nas populações da Irlanda e Galiza (Byrne, 1990; Catoira, 1995). O tamanho do corpo e o processo de crescimento dos ouriços-do-mar estão diretamente relacionados com os processos celulares, que resultam em alterações na massa do esqueleto - implicam uma expansão, calcificação e produção de tecidos (Ebert, 2007; Lawrence *et al.*, 2007). Ainda é muito difícil determinar com precisão e exatidão a idade dos indivíduos, sendo que o normal é tentar avaliá-la com base no diâmetro da sua carapaça. Boudouresque and Verlaque (2007) relataram vários estudos em diferentes locais, em que corresponderam 2 cm de diâmetro de carapaça, a uma média de 2 anos de idade, bem como um indivíduo com 4 cm teria entre 4 e 5 anos de idade. A dificuldade em estabelecer uma relação inequívoca tamanho-idade para uma espécie/população relaciona-se com o facto da velocidade do crescimento dos indivíduos depender de fatores bióticos e abióticos, como: temperatura da água, a qualidade do alimento, a densidade populacional e o desenvolvimento das gónadas (Boudouresque and Verlaque, 2007; Tomsic *et al.*, 2010). No entanto, estudos recentes propõem novos métodos para a determinação da idade, baseados em perfis proteómicos de fluidos celómicos e em bandas de crescimento nos espinhos (Bodnar, 2013; Stadniczeňko *et al.*, 2016). Este último foi recentemente contestado por Narvaez *et al.* (2016), defendendo que as bandas de crescimento não estão estritamente relacionadas com a temperatura e não são consistentes entre classes de tamanho dos ouriços-do-mar, ou tipos de ossículos. Além disso, Narvaez *et al.* (2016) observaram que eram acrescentadas bandas de crescimento em resposta ao *stress* temporário, sem que fosse possível distinguir-las das bandas

naturais de crescimento. Portanto, a relação entre o tamanho e a idade dos ouriços é difícil de estabelecer devido aos efeitos da variabilidade ambiental, da competência interespecífica e da falta de metodologias conclusivas (Grosjean *et al.*, 1996).

A cor dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* pode variar (lilás, branco, verde, roxo, vermelho), mas não está relacionada com o sexo, alimentação predominante, nem com a profundidade (Boudouresque and Verlaque, 2007; Lopes *et al.*, 2012). De uma forma geral, os ouriços-do-mar são comumente conhecidos por apresentarem uma carapaça globosa, formada por placas esqueléticas, unidas por uma matriz de colagénio e interdigitações de calcite, que lhes confere rigidez (Brusca and Brusca, 2003). Além disso, são característicos os espinhos duros, mas móveis, que cobrem o corpo do ouriço-do-mar. Assim como, o aparelho bucal (designado de Lanterna de Aristóteles), com o qual raspam as algas das rochas, para se alimentarem e que é bastante útil para a atividade erosiva do ouriço-do-mar (Martinell *et al.*, 1981). Outra característica que os diferencia de outros animais, é a existência de um sistema vascular hídrico (ou ambulacrário) do qual fazem parte os pés ambulacrários. É um sistema complexo de canais e reservatórios, cheios de fluido, que auxiliam o seu transporte interno e a movimentação e projeção dos pés ambulacrários, com os quais se deslocam e fixam nas rochas, manipulam alimento e recebem alguns estímulos sensoriais (Brusca and Brusca, 2003; Boudouresque and Verlaque, 2007; Binyon, 2013; Carboni, 2013). Outra estrutura estranha, única dos ouriços-do-mar, são os pedicelários. Estes têm forma de pinça, e respondem a estímulos externos, de forma independente do sistema nervoso principal (uma vez que possuem os seus próprios componentes neuromusculares) (Brusca and Brusca, 2003; Burke, *et al.*, 2006). Os espinhos móveis e os pedicelários contêm músculos e outros tecidos que se situam externamente ao tecido esquelético da carapaça (Ferguson, 1970; Brusca and Brusca, 2003; Burke *et al.*, 2006).

Na face oral do ouriço-do-mar encontram-se 5 pares de brânquias dispostas na membrana peristomial, responsáveis pelas trocas gasosas. São suportadas também pelo sistema vascular hídrico, mas são os movimentos da lanterna de Aristóteles que controlam a pressão hidrostática dentro das brânquias. Desta forma é fornecido oxigénio necessário aos músculos utilizados durante a alimentação (Brusca and Brusca, 2003).

O sistema digestivo dos equinodermes é composto por um tubo bastante simples, que se estende desde da lanterna de Aristóteles ao ânus, estando localizada no centro da superfície oral e o ânus na superfície aboral. O esófago estende-se em direção à superfície aboral através do centro da lanterna de Aristóteles, seguido do intestino. Na maioria dos equinodermes, um duto estreito, chamado de sifão, situa-se paralelamente ao trato digestivo e estende-se ao longo do seu comprimento. Ambas as extremidades

do sifão abrem-se no intestino promovendo um desvio para o excesso de água ajudando a concentrar o alimento no tubo digestivo. O intestino estreita-se num reto curto que termina no ânus, no qual são produzidas enzimas que participam na digestão (Brusca and Brusca, 2003).

1.3.1. Hábitos alimentares

Paracentrotus lividus é um consumidor primário na cadeia trófica das zonas litorais. Tem maioritariamente uma dieta herbívora (Fernández *et al.*, 2000; Cacabelos *et al.*, 2010; Agnetta *et al.*, 2012), sendo uma boa percentagem composta por plantas vasculares aquáticas e macroalgas. Algumas espécies de ouriços-do-mar (incluindo *P. lividus*), também se alimentam de detritos que derivam na coluna de água (Kelly *et al.*, 2012). Têm preferência por algas eretas e/ou filamentosas (ex: *Laminaria* sp., *Codium* sp., *Porphyra* sp., etc.) (Benedetti *et al.*, 1998; Abraham, 2007), mas também são capazes de se alimentar de algas vermelhas duras, com incrustação de cálcio, como *Corallina* sp. e *Lithophyllum* sp. (Hereu *et al.*, 2005; Silva, 2012). Por isso, são considerados, entre os invertebrados, um grupo com um papel bastante determinante nas comunidades de macrófitas bentónicas (Fernández, 2013). Mudanças bruscas na sua abundância podem alterar drasticamente a composição de espécies, estrutura e funcionamento destas comunidades (Tomas *et al.*, 2004; Fernández, 2013; Bertocci *et al.*, 2014; Domínguez *et al.*, 2015).

Paracentrotus lividus é uma das espécies que se alimenta maioritariamente à noite (Bernárdez *et al.*, 2000; Boudouresque and Verlaque, 2007; Lawrence *et al.*, 2007). Provavelmente, será uma forma de evitar contacto com os seus potenciais predadores, que apresentam uma maior atividade diurna (sendo que este fator pode variar de acordo com as populações e a sua localização geográfica) (Sala, 1997; Sala *et al.*, 1996; Bernárdez *et al.*, 2000; Boudouresque and Verlaque, 2007; Lawrence *et al.*, 2007; Mamede, 2014).

A resposta dos ouriços-do-mar à presença de alimento é muito complexa e ainda pouco estudada. Os ouriços-do-mar podem ser atraídos pelo alimento, mas ao mesmo tempo, não se serem estimulados a ingeri-lo (Lawrence *et al.*, 1989; Lawrence *et al.*, 2007). Mesmo quando se alimentam, podem não ser capazes de o digerir (Lawrence *et al.*, 1989; Lawrence *et al.*, 2007). A frequência e quantidade de alimento que é ingerida podem ser influenciados pelas características físico-químicas do alimento, pelo estado fisiológico do indivíduo e por fatores abióticos, como a luz solar (Lawrence *et al.*, 2007), o hidrodinamismo do local (Moore and McPherson, 1965; Kawamata, 1998), a temperatura (Lawrence *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2012;

Carboni, 2013) ou predadores (Sala, 1997; Sala *et al.*, 1996; Bernárdez *et al.*, 2000; Boudouresque and Verlaque, 2007; Lawrence *et al.*, 2007; Mamede, 2014). Do ponto de vista fisiológico e nutricional, quando as condições ambientais não se alteram e a disponibilidade de alimento é contínua, os ouriços-do-mar podem não se alimentar de forma constante. Em laboratório, algumas espécies apresentam uma elevada taxa de consumo, depois de passarem por um período de jejum. Contudo, quando alimentados *ad libitum* a taxa de consumo decresce (Lawrence, *et al.*, 2003). Alguns estudos sugerem que *P. lividus* tem preferência por dietas formuladas com base em matérias vegetais (Lawrence *et al.*, 1989; Lawrence *et al.*, 2007).

1.3.2. Reprodução

A maioria das espécies de equinodermes, inclusivamente *Paracentrotus lividus*, são organismos gonocóricos, desprovidos de dimorfismo sexual, que libertam os seus gâmetas na água, onde ocorre fecundação (externa). A única forma de diferenciar os sexos é através da observação da libertação dos gâmetas, ou através da dissecação do animal e observação das suas gónadas (Allain, 1975).

As fêmeas produzem um número elevado de óvulos oligolécitos, pobres em reservas nutritivas, pelo que o seu desenvolvimento embrionário é muito rápido, originando larvas autónomas planctónicas, capazes de capturarem o seu próprio alimento - larva pluteus. À medida que vão crescendo e desenvolvendo, as larvas pluteus sofrem várias metamorfoses, até à transformação final em pequenos juvenis, semelhantes aos adultos na forma. Para que ocorra o recrutamento bentónico dos juvenis, estes necessitam de encontrar um substrato adequado. Caso tal ocorra num habitat propício, estes crescem atingindo o estado adulto, reproduzindo-se e dando continuidade a um novo ciclo (Fig. 1) (Young *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1997; Benedetti-Cecchi *et al.*, 2000; Tomas *et al.*, 2004; Carboni, 2013). O recrutamento de juvenis costuma apresentar grandes variações interanuais (Hereu *et al.*, 2004), dependendo da interação de fatores bióticos e abióticos (Young *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1997; Benedetti-Cecchi *et al.*, 2000; Tomas *et al.*, 2004).

Em laboratório, os indivíduos *P. lividus* com um tamanho médio de 13 a 20 mm de diâmetro podem atingir a maturação em 5 meses, quando expostos a 24 horas de luz (Cellario and Fenaux, 1990). Nos ecossistemas naturais, a maturidade é atingida mais tarde, devido a condições ambientais oscilantes, possivelmente desfavoráveis, e à eventual escassez de alimento (Boudouresque and Verlaque, 2007; Dincer and Cakli, 2007).

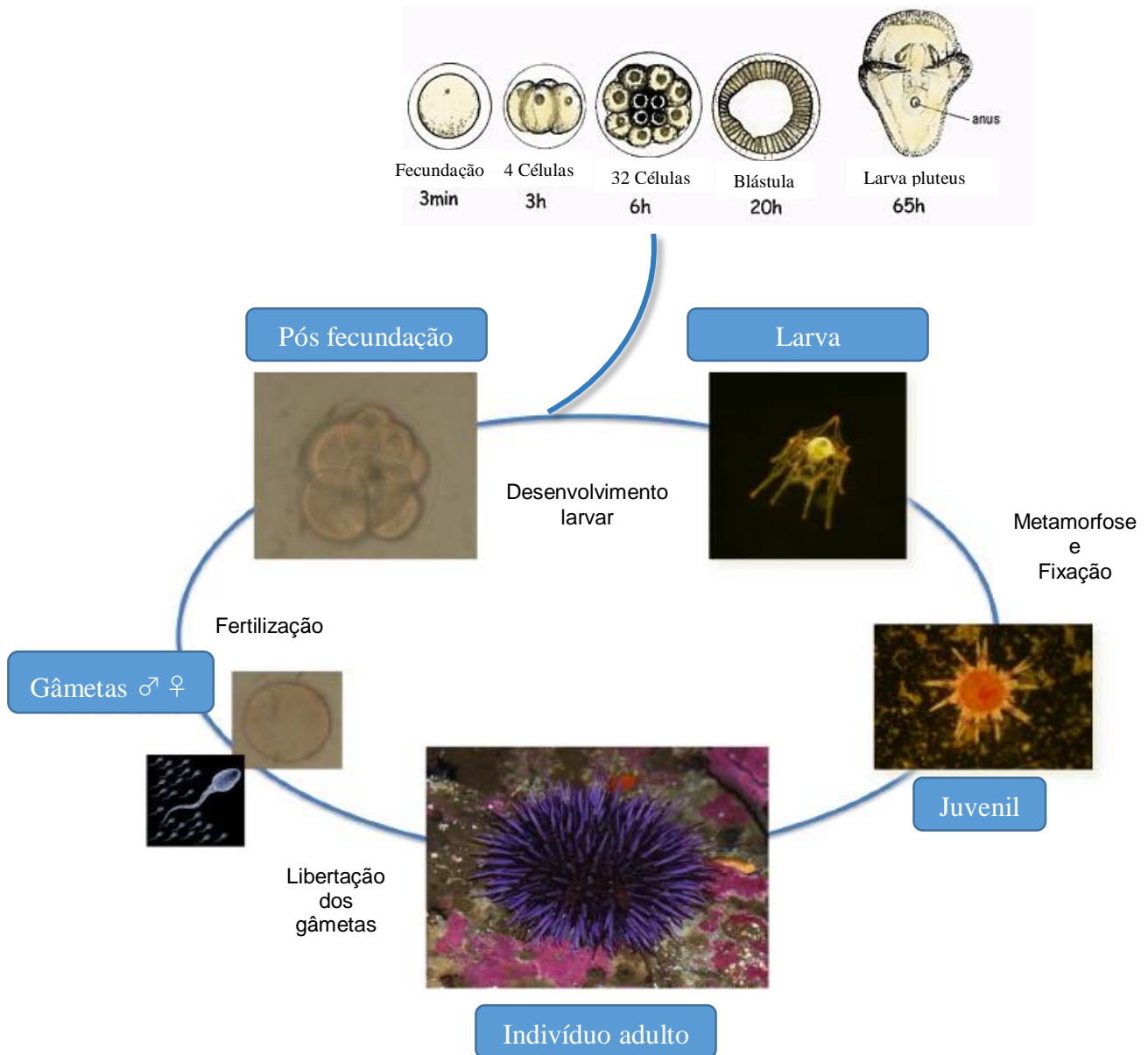


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo de vida do ouriço-do-mar (adaptado de Carboni, 2013).

Os ouriços-do-mar apresentam cinco gónadas dispostas na parte interna das zonas interambulacrárias da carapaça (Carboni, 2013). Ligado a cada gónada existe um tubo - designado de gonoducto, que se estende até ao poro (gonopóro), situado na placa genital disposta na face aboral do ouriço-do-mar, em torno do periprocto. Em ambos sexos, a parede das gónadas é composta por um saco interno e outro externo, cada um composto por várias camadas. A cavidade celómica genital (GCS) separa os dois sacos.

O saco externo inclui o peritoneu visceral (VP), delimitando o celoma perivisceral, o qual está ligado a uma camada de tecido conjuntivo (CTL) (Carboni, 2013) (Fig. 2). O saco interno é uma cavidade genital hemal (GHS), que possui células mioepiteliais ciliadas na sua face externa, semelhante às aquelas observadas em gónadas de estrelas-do-mar. Enquanto que no lado interno, a cavidade genital hemal suporta o epitélio germinativo (Carboni, 2013).

As células mioepiteliais contraem-se ritmicamente durante a liberação dos gâmetas (Okada *et al.* 1984). A gametogénese ocorre no saco interno da cavidade hemal, com uma capacidade de armazenamento de nutrientes muito limitada. O armazenamento é feito nos fagócitos nutritivos (NP) fornecendo um microambiente estrutural e nutricional às células germinativas, durante toda a gametogénese em ambos os sexos (Walker *et al.*, 2007). Após o início da gametogénese, os fagócitos nutritivos são utilizados para sintetizar novas proteínas e outros nutrientes, para oócitos e espermatozoides (Carboni, 2013). Pensa-se que os fagócitos nutritivos são capazes de reconhecer células gametogénicas em diferentes estádios de desenvolvimento e reagir adequadamente a cada situação. A base para o reconhecimento dos fagócitos nutritivos, em diferentes fases da gametogénese, é desconhecida. Mas envolve, sem dúvida, as características estruturais dos próprios e interações proteína-proteína (Walker *et al.*, 2007).

O tamanho das gónadas não é proporcional ao tamanho da carapaça dos ouriços-do-mar. Além disso, o índice gonadossomático (relação entre o peso da gónada e o peso total do organismo) também não está diretamente associado ao desenvolvimento gametogénico. Por isso, é necessário ter cuidado com as conclusões baseadas nestes indicadores (Boudouresque and Verlaque, 2007). Mesmo dentro de uma mesma população, os indivíduos não mostram o seu ciclo reprodutivo sincronizado e, assim, encontram-se indivíduos maduros durante o ano inteiro (Sánchez-España *et al.*, 2004). O ouriço-do-mar *P. lividus*, quando acondicionado a baixas densidades, apresenta um índice gonadossomático elevado (Guettaf and San Martín, 1995). Temperaturas de 18° a 22°C, juntamente com um fotoperíodo de dias curtos, parecem estimular o desenvolvimento gonadal (Shpigel *et al.*, 2004), independentemente dos padrões de alimentação (Guettaf and San Martín 1995). Em suma, o índice gonadossomático e o desenvolvimento gametogénico estão dependentes de vários fatores, como a disponibilidade de alimento, temperatura e fotoperíodo (Shpigel *et al.*, 2004; Carboni, 2013).

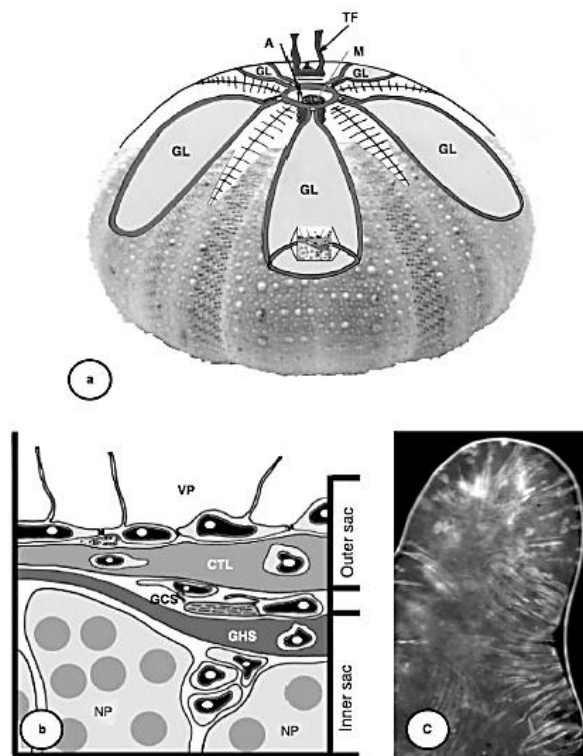


Figura 2 – (A) Representação esquemática do sistema reprodutivo ouriço-do-mar em vista lateral e aboral; (B) Representação esquemática dos tecidos da parede da gónada; (C) Uma gónada de ouriço-do-mar, onde se vêem os músculos do saco interno da cavidade genital hemal (GHS) I, na face virada para o lúmen da cavidade (tiras brancas). A - ânus; CTL - camada de tecido conjuntivo; GL - lúmen das gónadas; H – placa madrepórica; NP - fagócitos nutritivos; GCS – cavidade celômica genital; GHS - cavidade genital hemal; TF- pés ambulacrários; VP - peritoneu visceral (adaptado de Carboni, 2013).

Spirlet *et al.* (2000), mostraram que a temperatura é mais influente, do que o fotoperíodo, no ciclo reprodutivo e no crescimento do *Paracentrotus lividus* em cativeiro. No entanto, o estudo decorreu apenas 45 dias, sendo recomendados 120 dias para obtenção de resultados fiáveis (Shpigel *et al.*, 2004). Recentemente foram descobertos órgãos fotorreceptores no tubo dos pés ambulacrários dos ouriços-do-mar, provando a sua habilidade em reagir à luz (Raible *et al.*, 2006). Esta descoberta corrobora a hipótese do fotoperíodo ser um forte fator influenciador da gametogénese (Lesser *et al.* 2011). As alterações sazonais de parâmetros ambientais (como o fotoperíodo, a temperatura e a salinidade) influenciam a reprodução dentro e entre populações, sendo que as condições nutricionais dos indivíduos também afetam a gametogénese (Dincer and Cakli, 2007; Wasson and Watts, 2007). Os fatores ambientais (como os fatores nutricionais) vão afetar a fisiologia e a morfologia das gónadas, significando que os fatores exógenos transformam-se em fatores endógenos, regulando a reprodução do ouriço-do-mar adulto (Wasson and Watts, 2007). Em virtude da crescente contaminação ambiental, a nível mundial, um grupo diverso de compostos sintéticos têm vindo a ser

descobertos como desreguladores endócrinos. Estes compostos (produtos químicos industriais, herbicidas e pesticidas), normalmente entram no ambiente marinho através de efluentes de estações de tratamentos de esgotos e/ou efluentes domésticos, industriais e agrícolas. Eles imitam ou antagonizam os efeitos dos mensageiros químicos endógenos, causando desequilíbrios no ciclo reprodutivo dos ouriços-do-mar e de outros organismos (Langston *et al.*, 2005).

1.3.2.1. Gametogénese

A gametogénese pode ser monitorizada através da histologia das gónadas e ser classificada com base nas proporções de dois grupos de células: células germinativas e fagócitos nutritivos (NP) (Byrne, 1990; Spirlet *et al.*, 1998a). O desenvolvimento dos gâmetas é semelhante para ambos os sexos. No início da gametogénese os fagócitos nutritivos centralizam-se no lúmen e absorvem material resultante da lise de gâmetas remanescentes do último ciclo gametogénico. Assim que os fagócitos nutritivos restabeleçam as suas reservas energéticas, estão aptos para fornecer os nutrientes necessários aos primeiros gâmetas (pré-vitelinos). Inicialmente, os gâmetas surgem ao longo da parede do ovário/testículo (parede ascinal), rodeados pelos fagócitos nutritivos. À medida que vão crescendo e se tornam maduros, deslocam-se da parede ascinal para o centro do lúmen das gónadas. Quando os gâmetas atingem o seu expoente máximo de maturação, o lúmen das gónadas fica completamente preenchido, os fagócitos nutritivos começam a diminuir em quantidade e dispõem-se numa camada muito fina ao longo da parede ascinal. Nesta fase, os ouriços-do-mar encontram-se preparados para dar início à postura. À medida que os gâmetas são libertados, surgem espaços no lúmen entre os gâmetas. A postura raramente ocorre até à exaustão, ou seja, até que as gónadas fiquem completamente despromovidas de gâmetas. Sendo que, no final da postura os fagócitos nutritivos (NP) começam a aumentar em número, dando origem a uma malha eosinofílica que rodeia os gâmetas remanescentes e os absorverem, resgatando o material nutritivo (Byrne, 1990; Spirlet *et al.*, 1998a).

Ao longo das diferentes fases da gametogénese, as necessidades nutricionais dos ouriços-do-mar alteram-se. Os lípidos são importantes componentes estruturais das membranas celulares e subcelulares, mas mais importante ainda, são reservas energéticas vitais para o ciclo reprodutivo (Arafa *et al.*, 2012). Compreendem os ácidos gordos e são essenciais durante a gametogénese. No início da gametogénese, a necessidade nutricional é maior, uma vez que são necessárias maiores quantidades de nutrientes e energia para o crescimento e maturação dos gâmetas. No final da gametogénese, a carência nutricional diminui. Os ácidos gordos são muito importantes,

agindo como uma fonte energética para os espermatozoides obterem energia para a natação, através da oxidação de ácidos gordos, ou para os oócitos, como uma importante fonte para o desenvolvimento e sobrevivência larvar (Martinez-Pita *et al.*, 2010).

1.3.2.2. Postura

Normalmente, os machos e as fêmeas agregam-se em poças, ou perto de macroalgas, para realizarem a postura, em simultâneo. Podem ocorrer em grupos de 10 a 20 indivíduos. Os eventos de postura nunca envolvem todos os indivíduos da população. No entanto, os gâmetas libertados podem servir de estímulo para que outros indivíduos adultos deem início à postura (Boudouresque and Verlaque, 2007).

A reprodução de *P. lividus* pode ocorrer uma ou duas vezes por ano. As épocas de reprodução podem sofrer pequenos desvios temporais, de ano para ano, dependendo das condições ambientais (Boudouresque and Verlaque, 2007). Quando ocorrem duas épocas de postura, geralmente a primeira ocorre quando a temperatura sobe, até um ponto crítico, e a segunda, quando a temperatura baixa consideravelmente (Bayed *et al.*, 2005; Boudouresque and Verlaque, 2007).

Apesar da variabilidade geográfica, individual e anual, a reprodução pode ocorrer durante todo o ano, mas em números pouco expressivos. Isto pode representar uma estratégia de sobrevivência da população, uma vez que a mortalidade das larvas atinge valores muito elevados durante todo o seu desenvolvimento (Boudouresque and Verlaque, 2007).

1.4. Objetivos do estudo

É imperativo compreender a biologia das populações selvagens, para se poder fazer uma abordagem científica mais assertiva. O uso da aquacultura surge como uma possível resolução para os problemas de sobre-exploração existentes. A caracterização biológica do ciclo reprodutivo de uma espécie/população permite-nos apurar quais os meses em que cada fase do ciclo gametogénico ocorre com mais frequência. A aquacultura de *Paracentrotus lividus* poderá ser uma solução à exploração dos recursos naturais, assim como, uma ferramenta na gestão e melhoramento dos mesmos, através de projetos de repovoamento da espécie.

Neste estudo, pretende aprofundar-se os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, contribuindo assim para o desenvolvimento da sua produção em cativeiro. O conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie, na costa de Peniche, permitirá desenvolver técnicas de cultivo de *P. lividus*, tais como o acondicionamento de reprodutores e a otimização das posturas, do cultivo larvar e do crescimento dos juvenis. Por outro lado, o presente trabalho visa permitir novos avanços no desenvolvimento de gónadas produzidas em cativeiro, destacando-se a avaliação do efeito da alimentação artificial na qualidade nutricional das mesmas, em termos lipídicos. Em suma, pode enumerar-se como principais objetivos específicos deste estudo, os seguintes:

- realizar o estudo da biologia reprodutiva de *P. lividus*, durante 12 meses, na costa de Peniche (Litoral Oeste de Portugal);
 - analisar histologicamente as gónadas de *P. lividus* para descrição, identificação e estabelecimento da época de ocorrência dos vários estádios de gametogénese;
 - avaliar o índice gonadossomático dos indivíduos e a proporção sexual daquela população;
- estudar o efeito de três dietas alimentares distintas em *P. lividus* nomeadamente:
 - no tamanho dos indivíduos (diâmetro da carapaça e peso húmido individual);
 - no índice gonadossomático;
 - no desenvolvimento das gónadas, com identificação dos estádios de gametogénese;
 - na caracterização e quantificação de lípidos totais e ácidos gordos, quer das dietas fornecidas, quer nas gónadas dos indivíduos alimentados com as mesmas.

2. Materiais e métodos

2.1. Caracterização da Biologia reprodutiva de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

2.1.1. Recolha de espécimes

Foram recolhidos 30 ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* por mês, durante um período de 12 meses consecutivos, de julho 2015 a junho 2016. O local de recolha foi a Praia do Abalo (39°22'12.69"N; 009°23'7.07"W), em Peniche, Portugal. Os indivíduos foram recolhidos manualmente e ao acaso, em várias poças de maré intermareais.

Depois de recolhidos, os indivíduos foram transportados para o laboratório de Aquacultura do MARE - Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, do Instituto Politécnico de Leiria, dentro de recipientes de 5 L, com água salgada.

2.1.2. Recolha de dados biométricos

No laboratório, as espécimes foram pesados individualmente (P – peso húmido), numa balança analítica (AE ADAM PGL 3002, *Milton Keynes*, Inglaterra), e mediu-se o diâmetro da sua carapaça (DC), com auxílio de uma craveira. As gónadas foram retiradas e pesadas (PG), para cálculo do índice gonadossomático (IG) (Giese, 1959; Fenaux, 1968; Sánchez-España *et al.*, 2004; James and Siikavuopio 2011; Marsh *et al.*, 2013), de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice gonadossomático} = \left(\frac{\text{peso da gónada}}{\text{peso total do indivíduo}} \right) \times 100$$

Dos 30 indivíduos recolhidos mensalmente, 10 foram analisados histologicamente. Para isso, retirou-se uma gónada para ser fixada e preservada em formol tamponado a 4 %, para posterior análise histológica (James and Siikavuopio 2011). As outras quatro gónadas foram conservadas em tubos individuais, a - 80 °C, para futura análise bioquímica.

2.1.3. Histologia

As gónadas, depois de fixadas em formol tamponado a 4 %, durante 24h, foram inseridas numa solução de etanol a 70 % (24 h). Depois procedeu-se à desidratação e inclusão em parafina, num processador de tecidos (Leica TP 1020, *Nussloch*, Alemanha). Os cortes das gónadas realizaram-se no micrótopo Accu-Cut^(M) SRMTM Sakura (*Alphen aan den Rijn*, Holanda), com uma espessura de 5 µm. Os cortes foram secos e preservados numa estufa a 37°C (*Binder, Tuttlingen*, Alemanha), durante 24 horas, até serem submetidos à técnica de coloração Hematoxilina-Eosina. Após a coloração, finalizaram-se as preparações definitivas das gónadas, com o meio de montagem Coverquick 2000 Path® (*São Francisco*, EUA), deixando-as secar durante 72 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as preparações dos tecidos gonadais de *Paracentrotus lividus* foram observadas ao microscópio ótico composto (Leica DM 2000 LED, *Wetzlar*, Alemanha) e fotografados (Leica HC 170 HD, *Wetzlar*, Alemanha). Desta forma, foi possível avaliar o sexo dos indivíduos, a proporção sexual, caracterizar os diferentes estádios da gametogénese e medir o diâmetro dos oócitos (5 medições por indivíduo em 10 indivíduos por mês). Os estádios gametogénicos foram interpretados com base em *Byrne (1990)* e *Spirlet et al., (1998a)*. A proporção sexual foi avaliada da seguinte forma:

$$\text{Proporção sexual} = \frac{\text{número de machos}}{\text{número de fêmeas}}$$

2.1.4. Dados Ambientais

Os dados da temperatura média mensal da água do mar foram gentilmente cedidos pelo Instituto Hidrográfico. Os dados relativos ao fotoperíodo provém de dados oficialmente publicados pelo Centro Nacional de Previsão Ambiental, pertencente ao Serviço Meteorológico Nacional dos estados Unidos da América (www.wunderground.com).

2.2. Efeito de três dietas no desenvolvimento das gónadas de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

2.2.1. Aquisição e acondicionamento dos organismos

Foram recolhidos 117 ouriços-do-mar na Praia do Abalo (39°22'12.69"N; 009°23'7.07"W), em Peniche (Portugal), com aproximadamente 4 cm de diâmetro da carapaça. Os indivíduos foram levados para o laboratório de Aquacultura do MARE - Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, do Instituto Politécnico de Leiria, em recipientes de 5 L, com água salgada. Chegados ao laboratório os ouriços-do-mar foram pesados individualmente (*P* – peso húmido), numa balança analítica (AE ADAM PGL 3002, *Milton Keynes*, Inglaterra), e mediu-se o diâmetro da sua carapaça (*DC*), com auxílio de uma craveira. Os organismos foram acondicionados em 3 sistemas de recirculação de água, cada um composto por três aquários de vidro, com 60 L de capacidade. Distribuíram-se 13 ouriços em cada aquário, perfazendo 39 indivíduos por sistema. A água dos sistemas era direcionada para um sistema de filtração de 96 L, com um filtro biológico (biobolas), um filtro mecânico (lã de vidro), bomba de recirculação de água (Hailea Hx-6530, 1750 L h⁻¹, *Guangdong*, China), escumador de proteínas (Bubble-magus SP1000, 300 h⁻¹, *Guangdong*, China) e refrigerador (FRIMAR ® F500, Fernando Ribeiro Lda, *Barcarena*, Portugal).

2.2.2. Período de jejum

Uma vez que os ouriços-do-mar não apresentam um ciclo gametogénico sincronizado, foi necessário sujeitar os indivíduos experimentais a um período de jejum, durante 30 dias, a uma temperatura de 16 °C, salinidade 37,0 e pH ≈ 8 (Spirlet *et al.*, 1998b; Yokota *et al.*, 2002; Fabbrocini *et al.*, 2012; Sartori and Gaion, 2015). O objetivo do jejum, baseia-se na capacidade que os ouriços-do-mar têm em utilizar as reservas que contém nos fagócitos nutritivos, obrigando-os a absorver as gónadas e a ficarem sincronizados (Spirlet *et al.*, 1998ab; Yokota *et al.*, 2002; Fabbrocini *et al.*, 2012; Sartori and Gaion, 2015).

No final do jejum, fez-se uma amostragem de 3 indivíduos por aquário para se avaliar os dados biométricos (diâmetro da carapaça, peso húmido individual, peso das gónadas) e o índice gonadossomático. Além disso, foram também retiradas as gónadas, para análise histológica (James and Siikavuopio 2011; Fabbrocini *et al.*, 2012).

2.2.3. Ensaio experimental

Administraram-se 3 dietas distintas a ouriços-do-mar, durante 80 dias (14 de dezembro de 2015 – 7 de março de 2016), com o intuito de avaliar o efeito das mesmas no desenvolvimento das gónadas de *P. lividus*. Cada dieta foi administrada a um grupo de 10 ouriços, num dos aquários, de cada sistema de recirculação de água. Ou seja, um total de 30 ouriços-do-mar para cada dieta. Durante o ensaio, a temperatura da água foi estabelecida para 20 ± 1 °C (Fernandez *et al.*, 1998; Spirlet *et al.*, 1998b; Spirlet *et al.*, 2000; Spirlet *et al.*, 2001; Shpigel *et al.*, 2004; Schlosser *et al.*, 2005). Os parâmetros da qualidade da água foram avaliados diariamente, sendo que o pH foi mantido a 8 (Schlosser *et al.*, 2005) e salinidade a 37 ± 1 (Yokota *et al.*, 2002; Schlosser *et al.*, 2005; Tomšić *et al.*, 2015).

2.2.3.1. Dietas

A dieta A foi composta apenas pela macroalga verde *Codium tomentosum*, fornecida fresca e inteira. Esta macroalga foi apanhada na mesma localização da recolha dos ouriços-do-mar. A dieta B foi preparada através de uma mistura de algas (macroalga verde *Codium tomentosum* (20%), macroalga vermelha *Coralina* sp. (17%)), vegetais (repolho *Brassica oleracea* var. *capitata* (30%), cenoura *Daucus carota* (30%)) e agar (3%) (agar biológico em flocos – Cem por cento ®). A dieta C foi formada por milho (*Zea mays*) (56 %) e espinafres-da-Nova-Zelândia (*Tetragonia tetragonoides*) (44 %) frescos e inteiros. A dieta C foi escolhida como dieta de referência com base em estudos realizados anteriormente (Basuyaux and Blin, 1998; Spirlet *et al.*, 2001; Schlosser *et al.*, 2005; Fabbrocini *et al.*, 2012; Fabbrocini *et al.*, 2015; Silva, 2012; Satori *et al.*, 2016).

Os indivíduos foram alimentados todos os dias *ad libitum* (Basuyaux and Blin, 1998; Spirlet *et al.*, 2001; Silva, 2012). Apesar disso, efetuou-se um registo diário das quantidades administradas e ingeridas, para no final se calcular a taxa de ingestão alimentar (FI), em gramas (Siikavuopio *et al.*, 2012):

$$\text{Taxa de ingestão alimentar} = \left(\frac{\text{alimento fornecido}}{\text{alimento não consumido}} \right) \times 100$$

Todos os dias, o alimento inicial era pesado e no dia seguinte, o que restava em cada aquário, também.

2.2.4. Recolha de dados biométricos

No final do ensaio, todos os ouriços-do-mar foram: 1) pesados (P – peso húmido individual) numa balança analítica (AE ADAM PGL 3002, *Milton Keynes*, Inglaterra); 2) medidos com uma craveira para determinar diâmetro da carapaça (DC); 3) sacrificados e as suas gónadas foram retiradas e pesadas (PG), para análises histológicas e bioquímicas, além do cálculo do índice gonadossomático (IG) (2.1.2. Recolha de dados biométricos).

Para posterior análise histológica, retirou-se uma gónada, que foi colocada em formol tamponado a 4%, (James and Siikavuopio, 2011). As restantes 4 gónadas, de cada indivíduo, foram conservadas individualmente, a $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior análise bioquímica.

2.2.5. Histologia

As gónadas de todos os ouriços-do-mar foram analisadas e avaliadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente em “2.1.3. Histologia”.

2.2.6. Análises bioquímicas

Determinação da gordura total – extração de lípidos

A determinação da gordura total presente nas gónadas foi realizada com base no protocolo de Bligh and Dyer (1959). Utilizaram-se as gónadas de 6 indivíduos, aleatórios, de cada dieta. Depois de pesar as amostras em microtúbulos, adicionou-se 500 μl de clorofórmio (CHCl_3 , Prolabo ® VWR, *Lyndhurst*, África do Sul), 500 μl de metanol (CH_3OH , HiPerSolv. CHROMANORN, Prolabo ® VWR, *Fontanay-Sous-Bois*, France) e 250 μl água ultrapura (18,02 $\text{M}\Omega$, HiPerSolv. CHROMANORN, Prolabo ® VWR, *Fontanay-Sous-Bois*, France). Efetuou-se uma centrifugação a 1000 g, durante 5 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5810 R, *Billerica*, EUA). O sobrenadante foi rejeitado e apenas foi retirado o precipitado das amostras. A seguir, foi preparada a curva padrão, para a determinação da quantidade de lípidos, através da preparação de uma solução *stock* de concentração inicial conhecida, de tripalmitina ($\text{C}_{51}\text{H}_{98}\text{O}_6$, Alfa Aesar, *Karlsruhe*, Alemanha) em clorofórmio ($3,2\text{ mg mL}^{-1}$). A partir daqui, os padrões foram tratados da mesma forma que as amostras. Foi adicionado 500 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 95%, Chem-Lab, *Zedelgem*, Bélgica) e posteriormente, as amostras e padrão foram colocados numa estufa a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Memmert oven, *Schwabach*, Alemanha),

por 15 minutos. Por fim, acrescentou-se 1,5 mL de água ultrapura e dividiu-se cada amostra em 4 x 300 µl, para uma microplaca. De seguida, esta foi colocada num leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader Biotek® *Winooski*, EUA) e lida a sua absorvância a 375 nm (Marsh and Weinstein, 1966).

Quantificação e caracterização de ácidos gordos

A quantificação de ácidos gordos foi feita segundo Lepage and Roy (1986). Depois de homogeneizar as amostras (Ystral® D-79282, *Ballrechten-dottingen*, Alemanha), as mesmas foram pesadas em tubos de Falcon, numa balança analítica (Sartorius, *Göttingen*, Alemanha). De seguida, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol (CH₃OH) + cloreto de acetilo (CH₃COCl, Merk, *Darmstadt*, Alemanha) (20:1) a cada amostra e estas foram colocadas num banho, a 80 °C, durante 60 minutos. Depois das amostras estarem arrefecidas, foi adicionado 1 mL de água ultrapura (18,02 MΩ, HiPerSolv. CHROMANORN, Prolabo® VWR, *Fontanay-Sous-Bois*, France) e 2 mL de heptano (C₇H₁₆, Fisher Scientific, *Bishop Meadow Road*, Inglaterra). Por fim, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810 R, *Billerica*, EUA) a 1500 g, durante 5 minutos, para depois ser possível recolher o sobrenadante. Este foi analisado por Cromatografia Gasosa (GC) (Finnigan TraceGC ultra *Massachusetts*, EUA), de acordo com Masood *et al.* (2005). A caracterização dos ácidos gordos foi depois feita com auxílio de dois padrões comerciais (Polyunsaturated Fatty Acid Mix No. 3 *analytical standard from menhaden fish oil* [PUFA n-3], Supelco®, *Bellefonte*, EUA; Supelco 37 component FAME mix, Sigma-Aldrich®, *St. Louis*, EUA).

2.3. Análise de dados

A apresentação gráfica dos resultados foi executada mediante a utilização do programa *Microsoft Office Excel* (versão 2010) e o tratamento estatístico dos dados foi realizado com auxílio do programa *SigmaStat 4.0*.

Sempre que aplicável, os valores foram apresentados sob a forma de média \pm desvio-padrão e na análise estatística dos dados, utilizou-se o nível de significância $\alpha = 0,05$.

Na avaliação da biologia reprodutiva de *Paracentrotus lividus*, comparou-se o diâmetro da carapaça, peso húmido individual, índice gonadossomático, peso das gónadas e diâmetro dos oócitos entre os 12 meses de amostragem com recurso a ANOVA de um factor ($F_{\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupo}} = \text{valor do teste; valor de significância } p$), caso se cumprissem os pressupostos de distribuição normal e homogeneidade de variância dos dados. Caso contrário, procedeu-se à execução de testes não paramétricos *Kruskal-Wallis* ($H_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor; valor de significância } p$) (Zar, 2010). Quando se verificaram diferenças significativas entre grupos de dados, procedeu-se a testes *post-hoc* de comparação múltipla para identificar quais os grupos que eram distintos dos restantes, nomeadamente: teste de *Tukey* e teste de *Dunn* quando o tamanho da amostra foi desigual (Zar, 2010). Os mesmos procedimentos foram adotados para os dados biométricos de *P. lividus*, na avaliação de 3 dietas no desenvolvimento das suas gónadas (peso diâmetro de carapaça, húmido individual, índice gonadossomático, peso das gónadas, diâmetros dos oócitos), bem como na análise bioquímica de lípidos totais e ácidos gordos das 3 dietas e nas gónadas de *P. lividus*.

Procedeu-se ainda à tentativa de correlacionar (correlação de Pearson $r = \text{valor; valor de significância } p$) o índice gonadossomático de *P. lividus* com a temperatura média mensal da água do mar e fotoperíodo (média do número de horas de luz diárias, para cada mês), na região de Peniche, durante o período de amostragem (Pérez *et al.* 2010). Os valores de $p < 0,05$ tendem a aumentar juntos. Para os pares com coeficientes de correlação negativos e valores de $p < 0,05$, uma variável tende a diminuir enquanto a outra aumenta. Para pares com valores de $p > 0,05$, não há relação significativa entre as duas variáveis. Da mesma forma, avaliou-se a variação da proporção sexual de *P. lividus* ao longo do tempo, através da execução de um teste chi-quadrado ($\chi^2_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor; valor de significância } p$), para a componente da biologia reprodutiva da espécie, em Peniche (Pérez *et al.* 2010; Zar, 2010).

Utilizou-se ainda um teste t para amostras emparelhadas ($t_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor}$; valor de significância p), de forma avaliar a condição física dos ouriços-do-mar, através do diâmetro da carapaça e peso húmido individual, antes e após o período de jejum.

3. Resultados

3.1. Caracterização da Biologia reprodutiva de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

3.1.1. Dados biométricos

Os ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* apresentaram diâmetros de carapaça significativamente diferentes, ao longo dos 12 meses de amostragem (*Kruskal-Wallis* $H_{11} = 115,435$; $p < 0,001$). Os maiores valores foram registados em julho/2015 ($4,30 \pm 0,4$ cm). Seguiram-se os meses fevereiro/2016 e setembro/2015, com valores semelhantes (teste de *Dunn*; $p > 0,05$) (Fig. 3). Os menores diâmetros foram observados nos meses de novembro/2015 ($3,27 \pm 0,23$ cm) e maio/2016 ($3,14 \pm 0,38$ cm). Ainda que, nos meses de dezembro/2015 ($3,41 \pm 0,27$ cm), janeiro/2016 ($3,60 \pm 0,37$ cm) e abril/2016 ($3,59 \pm 0,36$ cm) apresentassem valores aproximados, sem diferenças estatisticamente significativas (testes de *Dunn*; $p > 0,05$).

O peso húmido dos indivíduos variou ao longo dos meses (*Kruskal-Wallis* $H_{11} = 168,679$; $p = < 0,05$;). O mês de julho/2015 diferenciou-se dos restantes, à exceção de agosto e setembro (teste de *Dunn*; $p > 0,05$;), apresentando pesos mais elevados ($53,18 \pm 12,72$ g) (Fig. 3). Dezembro/2015 foi o mês que apresentou pesos mais baixos ($17,99 \pm 3,4$ g), não se diferenciando significativamente de janeiro/2016 ($20,33 \pm 4,7$ g), nem de abril ($21,26 \pm 6,1$ g) e maio ($18,63 \pm 5,9$ g) (teste de *Dunn*; $p > 0,05$).

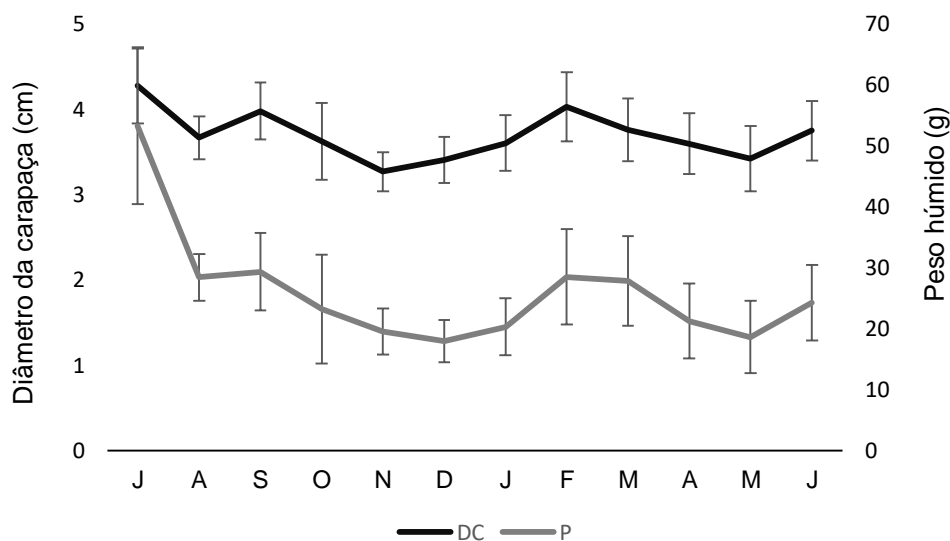


Figura 3 – Variação do diâmetro da carapaça (DC) e peso húmido (P) de *Paracentrotus lividus*, na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.

Os valores de índice gonadosomático (*IG*) mostraram ser diferentes ao longo do tempo (*Kruskal-Wallis* $H_{11} = 104,299$; $p < 0,05$) (Fig. 4). Em abril/2016 registaram-se os valores mais altos de índice gonadosomático (*IG*) ($12,87 \pm 6,43$ %), mas apenas mostraram ser significativamente diferentes dos de julho/2015 (testes de *Dunn* $< 0,05$). Julho/2015 foi o mês com valores mais baixos de *IG* ($4,18 \pm 1,3$ %), assemelhando-se apenas aos meses de setembro/2015 ($5,99 \pm 2,1$ %) e janeiro/2016 ($6,49 \pm 3,5$ %) (testes de *Dunn*; $p > 0,05$).

Os valores referentes ao peso das gónadas (*PG*) também mostraram ser estatisticamente diferentes ao longo dos meses (*Kruskal-Wallis* $H_{11} = 74,690$; $p < 0,05$) (Fig. 4). Os indivíduos tiveram gónadas mais pesadas (*PG*) no mês de fevereiro/2016 ($3,24 \pm 1,62$ g). Os valores mais baixos de *PG* foram registados no mês de junho/2016 ($1,17 \pm 0,4$ g), sendo estatisticamente diferentes dos meses agosto/2015, fevereiro, março e abril/2016 (teste de *Dunn*; $p < 0,05$.)

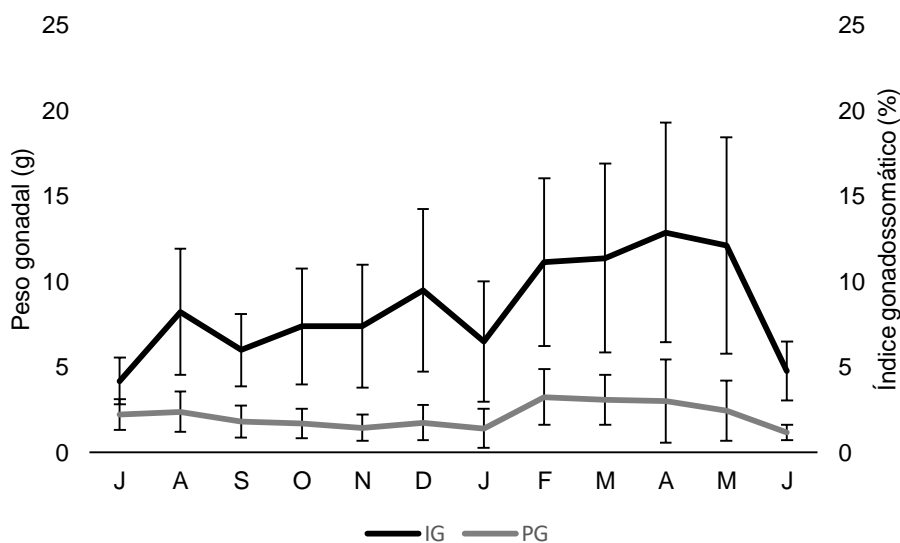


Figura 4 – Variação do peso gonadal (*PG*) e do índice gonadosomático (*IG*) de *Paracentrotus lividus*, na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.

A variação da temperatura média da água do mar seguiu o mesmo padrão de variação do número médio de horas de luz diárias, na região de Peniche (Fig.5). A temperatura mais baixa foi registada no mês de março (13°C; 12 horas de luz) e a mais alta no mês de agosto (19°C; 13 horas de luz). Verificou-se uma forte relação negativa entre o índice gonadossomático (*IG*) e a temperatura (*T*) (correlação de Pearson $r = -0,743$; $p < 0,05$). No entanto, estabeleceu-se uma correlação entre o índice gonadossomático e o fotoperíodo não foi significativa (correlação de Pearson $r = -0,114$; $p > 0,05$).

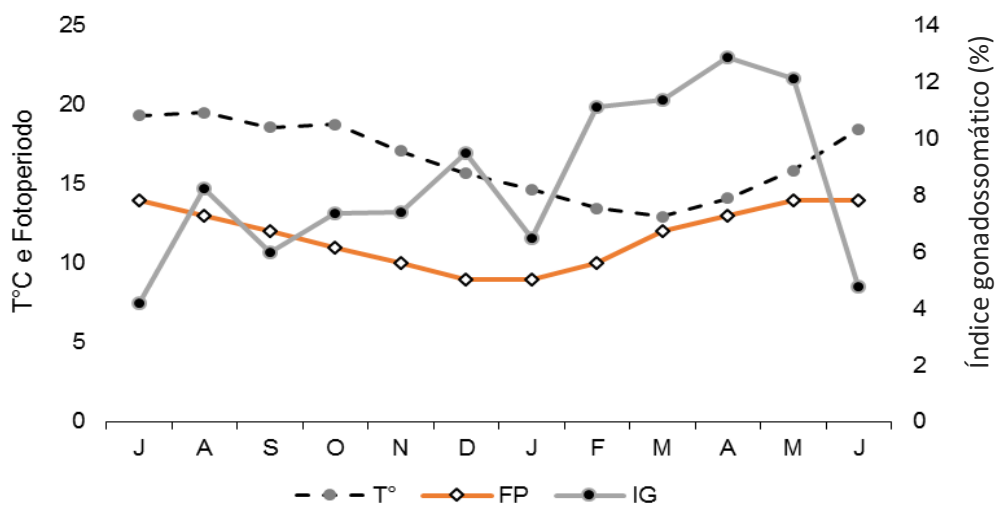


Figura 5 – Variação da temperatura média mensal da água do mar (*T*), do fotoperíodo em número médio de horas de luz diárias por mês (*FP*) e do índice gonadossomático (*IG*) de *Paracentrotus lividus*, na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.

Os valores do diâmetro dos oócitos nas gónadas de *P. lividus* fêmeas (*DO*) mostraram diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo de amostragem (ANOVA de um fator: $F_{11,98} = 36,1$; $p < 0,05$). O menor diâmetro de oócitos (*DO*) foi observado em dezembro/2015 ($25,45 \pm 4,22 \mu\text{m}$), sendo significativamente diferente de todos os meses, à exceção de novembro/2015 ($33,26 \pm 9,5 \mu\text{m}$) (teste de *Tukey*; $p > 0,05$) (Fig. 6). A partir de dezembro/2015, observou-se o crescimento dos oócitos, atingindo os valores mais altos em maio ($69,79 \pm 8,12 \mu\text{m}$). Seguiram-se os meses de junho/2016, março/2016, abril/2016, bem como julho/2015, que não mostraram diferenças significativas quando comparados ao mês de maio (teste de *Tukey*; $p > 0,05$), ao contrário dos restantes meses (Fig.6).

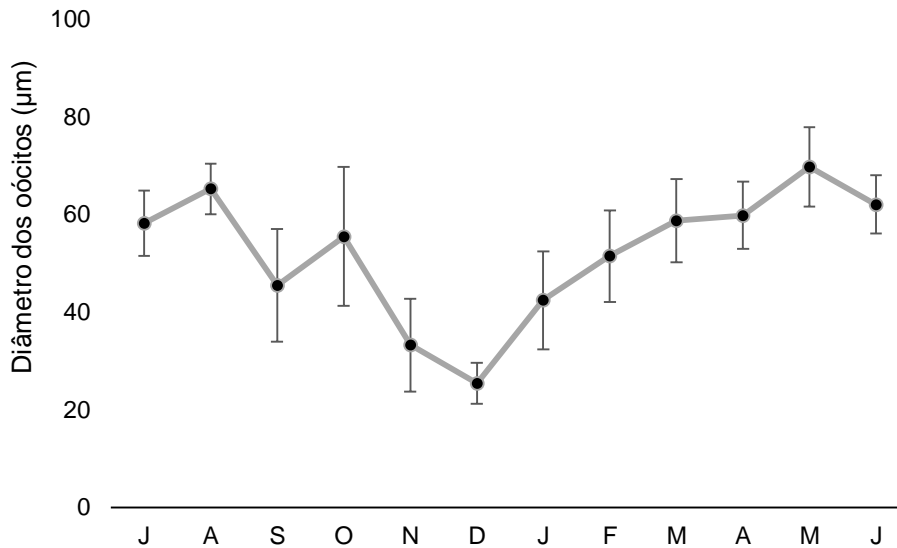


Figura 6 – Variação do diâmetro dos oócitos (DO) nas gónadas de *Paracentrotus lividus* fêmeas, na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.

A proporção sexual não apresentou flutuações significativas ($\chi^2_{(11)} = 4,603$; $p > 0,05$), embora tenham existido casos pontuais de desvio à proporção 1:1. No entanto, em setembro/2015 registou-se o menor número de machos para fêmeas (1:3) e no mês de outubro/2015 o maior número (2:1) (Fig.7).

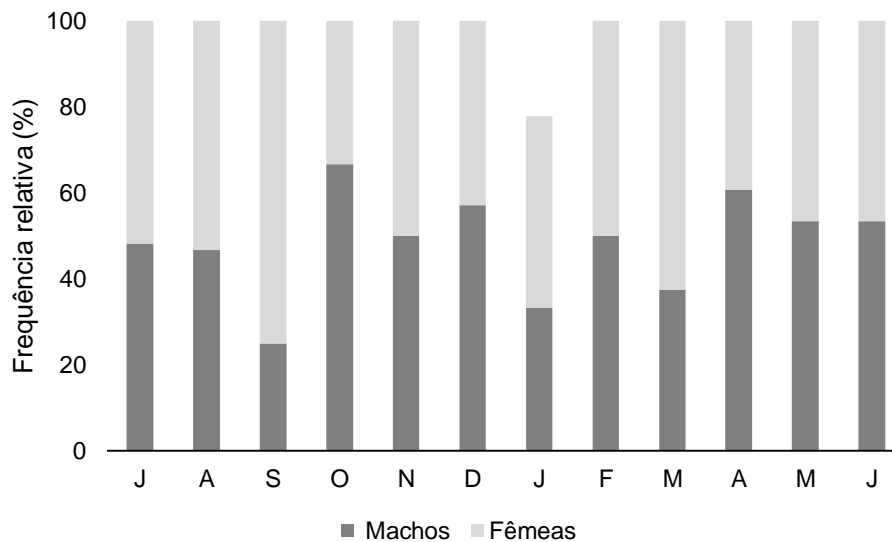


Figura 7 – Frequência relativa de machos e fêmeas de *Paracentrotus lividus*, durante 12 meses de amostragem na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016.

3.1.2. Histologia

Embora a caracterização do ciclo gametogénico tenha sido feita com base em Byrne (1990) e Spirlet *et al.* (1998a), neste estudo é sugerido uma ordem da caracterização gametogénica diferente da descrita por estes autores. Byrne (1990) e Spirlet *et al.* (1998a) identificaram o estágio I, como recuperação, fase em que ocorre a reabsorção de gâmetas que não foram libertados e o aumento de fagócitos nutritivos, assim como, o surgimento dos primeiros gâmetas. Neste trabalho foi feita a distinção entre a fase de reabsorção (denominando-se por estágio VII) e a fase em que se observa o aumento do tamanho dos fagócitos nutritivos, assim como, o surgimento dos primeiros gâmetas (pré-vitelinos) (denominando-se por estágio I). Além disso, foi encontrada uma característica nunca descrita, que contempla a fase de pós-postura (estádio VI). A nova organização das fases gametogénicas e a identificação de uma nova característica facilita a compreensão do desenvolvimento gametogénico. Neste sentido, os estádios identificados foram os seguintes:

- Estádio I – Fase inicial: Os fagócitos nutritivos (NP) aumentam de tamanho e dispõem-se no lúmen da gónada; surgimento dos primeiros gâmetas (pré-vitelinos) junto à parede ascinal do ovário/testículo (Fig. 8 – A para fêmeas e Fig. 9 – A para machos).
- Estádio II – Crescimento: os gâmetas pré-vitelinos aumentam o seu tamanho à medida que absorvem os nutrientes fornecidos pelos fagócitos nutritivos (NP) e continuam a encontrar-se ao longo da parede ascinal do ovário/testículo (Fig.8 – B para fêmeas e Fig.9 – B para machos).
- Estádio III – Fase pré-maturação: encontram-se gâmetas em todas as fases de desenvolvimento. Os gâmetas pré-vitelinos são rodeados pelos fagócitos nutritivos, enquanto os que já se encontram maduros se deslocam da parede ascinal do ovário/testículo para o lúmen da gónada (Fig.8 – C para fêmeas e Fig.9 – C para machos).
- Estádio IV – Maturação: os gâmetas encontram-se maduros e ocupam todo o lúmen da gónada. O número de fagócitos nutritivos (NP) é muito reduzido, traduzindo-se numa camada muito fina ao longo da parede ascinal, onde ainda se podem encontrar alguns gâmetas em crescimento (Fig.8 – D para fêmeas e Fig.9 – E para machos).

- Estádio V – Postura: nas fêmeas encontram-se espaços entre os oócitos não libertados. Nos machos, o aspeto é semelhante ao estágio anterior com a diferença de se encontrarem espaços no lúmen e espermatozoides em menor concentração (Fig.8 – E para fêmeas e Fig.9 – F para machos).

- Estádio VI – Pós-postura: nas fêmeas o ovário perde a sua estrutura interna levando a uma desorganização, onde se podem ver oócitos maduros e oócitos pré-vitelinos, que se soltaram da parede ascinal. Pode ser uma fase que facilmente se confunde com uma postura prematura com a diferença de se observarem espaços vazios entre os oócitos pós-postura. Ao passo que, numa postura prematura existe material nutritivo entre os oócitos. Nos machos observam-se espaços criados pela ausência de espermatozoides (Fig.8 – G para fêmeas e Fig.9 – G para machos).

- Estádio VII – Reabsorção: a estrutura interna dos ovários/testículos começa a reorganizar-se. Nas fêmeas, os oócitos não libertados acumulam-se no lúmen e são rodeados por uma malha eosinofílica de fagócitos nutritivos. Estes irão promover a lise dos oócitos e absorver o material nutritivo. O conceito é o mesmo para os machos. Em ambos os sexos observa-se a diminuição da espessura da parede ascinal (Fig.8 – H para fêmeas e Fig.9 – H para machos).

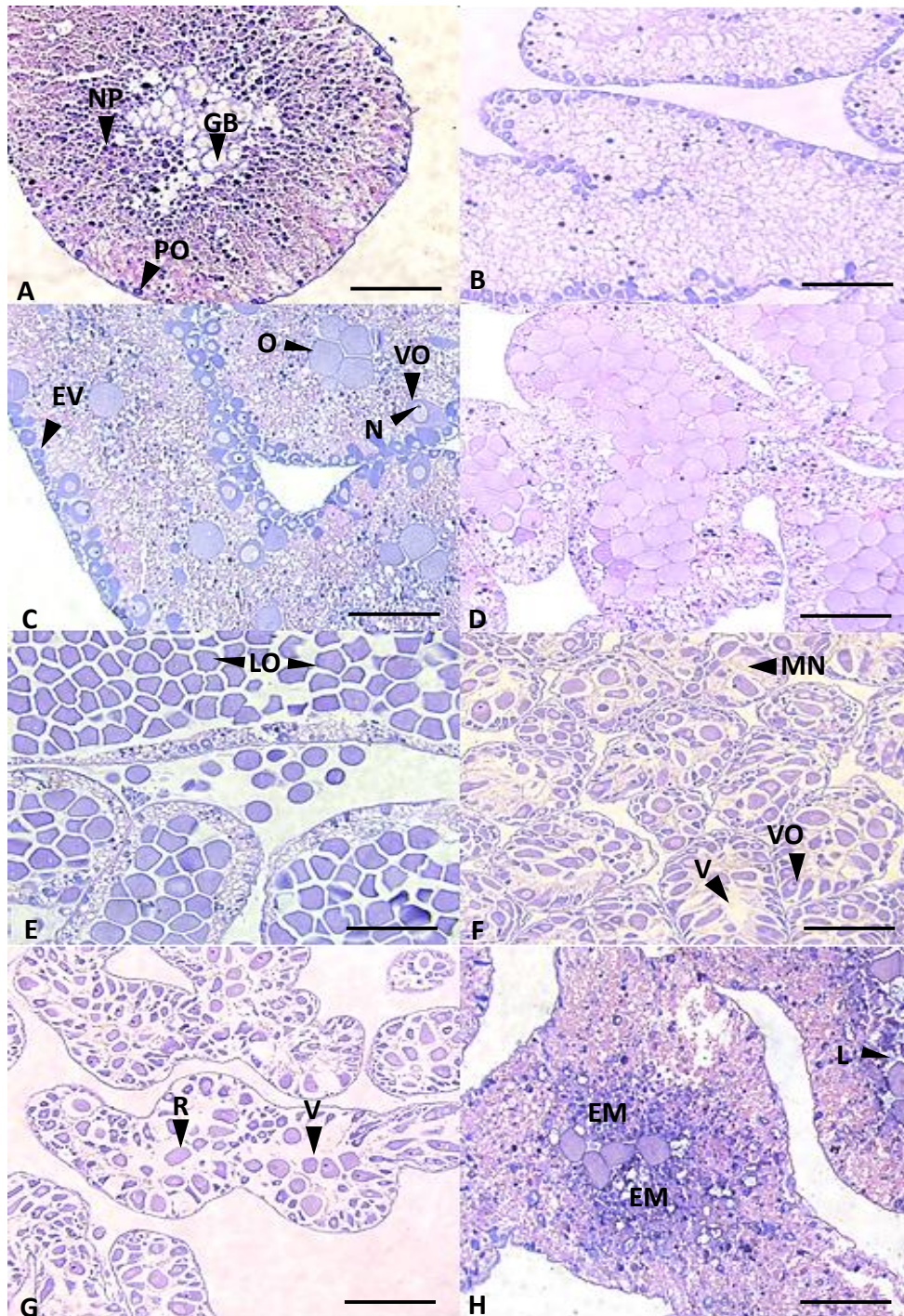


Figura 8 – Ciclo gametogénico feminino da espécie *Paracentrotus lividus*. Análise histológica: (A) Transição do Estádio VII para o Estádio I: secção transversal da gónada, onde são visíveis glóbulos (GB) derivados da lise de oócitos não libertados; NP - fagócitos nutritivos; PO - oócitos pré-vitelinos na parede ascinal; (B) Estádio II: crescimento dos oócitos e dos ovários; (C) Estádio III: ovário pré-maturo com oócitos em todas as fases de desenvolvimento, com oócitos vitelinos recentes (EV); oócitos vitelinos (VO), que se desprendem da parede ascinal (N: núcleo), à medida que se tornam maduros (O). (D) Estádio IV: ovário repleto de óvulos maduros e uma quantidade muito reduzida de fagócitos nutritivos. (E) Estádio V: ovário com óvulos soltos (LO), escassez de material nutritivo e surgimento de espaços vazios, indicam o início da postura. (F) Postura parcial de um ovário ainda no Estádio III, com oócitos em diferentes estádios de desenvolvimento e fagócitos nutritivos (NP); a maioria dos oócitos vitelogénicos (VO) acabaram por maturar e mover-se para o lúmen da gónada; MN – material nutritivo; V - vazio. (G) os ovários na fase de pós-postura perdem alguma estrutura interna, ficam despromovidos de material

nutritivo (V: espaços vazios) e os óvulos que não foram libertados, desorganizam-se no interior da gónada, sendo reabsorvidos mais tarde (R). (H) Estádio VII: todos os oócitos vitelinos e maduros que não foram libertados serão reabsorvidos; os fagócitos nutritivos são projetados para o lúmen da gónada, formando uma malha eosinofílica (EM) de forma a envolver os óvulos e submetê-los a lise (L); o ovário começa a reorganizar-se. (Coloração Hematoxilina-Eosina, barra = 200 μ m).

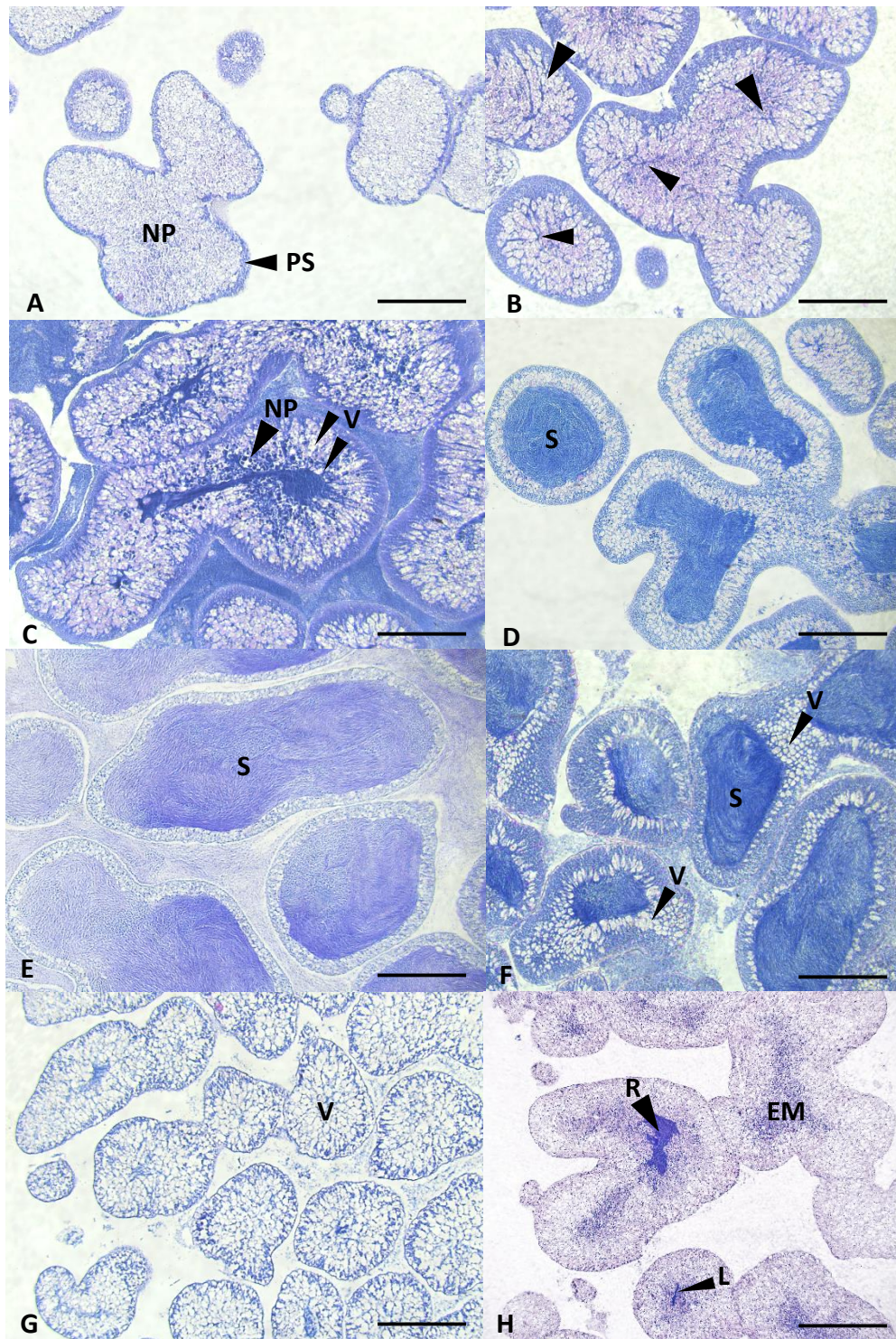


Figura 9 - Ciclo gametogénico masculino de *Paracentrotus lividus*. Análise histológica: (A) Estádio I: secção transversal dos testículos em fase inicial, contendo espermatócitos primários (PS) ao longo da parede ascinal e uma elevada quantidade de fagócitos nutritivos (NP) começam a surgir. (B) Estádio II: colunas de espermatócitos são projetados para o centro (setas). (C) Postura parcial dos testículos ainda em Estádio III, com fagócitos nutritivos no centro; V: espaços vazios deixados pelos espermatozoides libertados. (D) Estádio III: testículo preenchido com espermatozoides maduros e em grande parte desprovido de tecido nutritivo. (E) Estádio IV: testículos maduros, preenchidos com espermatozoides maduros prontos a serem libertados. (F) Estádio V: testículos no início da postura com espaços deixados pelos espermatozoides libertados (V). (G) Estádio VI: pós-postura, testículos desprovidos de conteúdo; V: vazios

deixados pelo espermatozoides libertados. (H) Estádio VII: os espermatozoides não libertados serão reabsorvidos; os fagócitos nutritivos são projetados para o lúmen da gónada, formando uma malha eosinofílica (EM), em redor dos espermatozoides remanescentes. (Coloração Hematoxilina-Eosina. A, B,D,E, F, G e H barra = 500 µm; C barra = 200 µm).

3.1.2.1. Gametogénese

No mês de julho/2015, os indivíduos encontravam-se maioritariamente no final da época reprodutiva (com gónadas maioritariamente nos estádios V e VI) (Fig.10). O estágio V (postura) foi mais incidente nos meses de junho/2016, julho e agosto/2015. Sendo que, em julho/2015, o estágio VI (pós-postura) foi o que mais se observou (Fig.10). Nos meses seguintes (setembro, outubro e novembro/2015), o estágio predominante foi o VII (reabsorção), em que ocorre a reabsorção de gâmetas remanescentes. Nesta altura, os ouriços-do-mar preparam-se para fechar o seu ciclo reprodutivo e dar início a um novo. No entanto, observou-se um segundo evento de postura no mês de novembro/2015, com 8,3 % dos indivíduos na fase de postura (V). No mês de dezembro/2015, a grande maioria dos indivíduos encontravam-se no estágio I (fase inicial) e II (crescimento). Nos meses de janeiro a março/2016, o estágio III (fase pré-maturação) foi o mais observado, seguindo-se nos meses consecutivos (abril e maio) o estágio IV (maturação) (Fig.10).

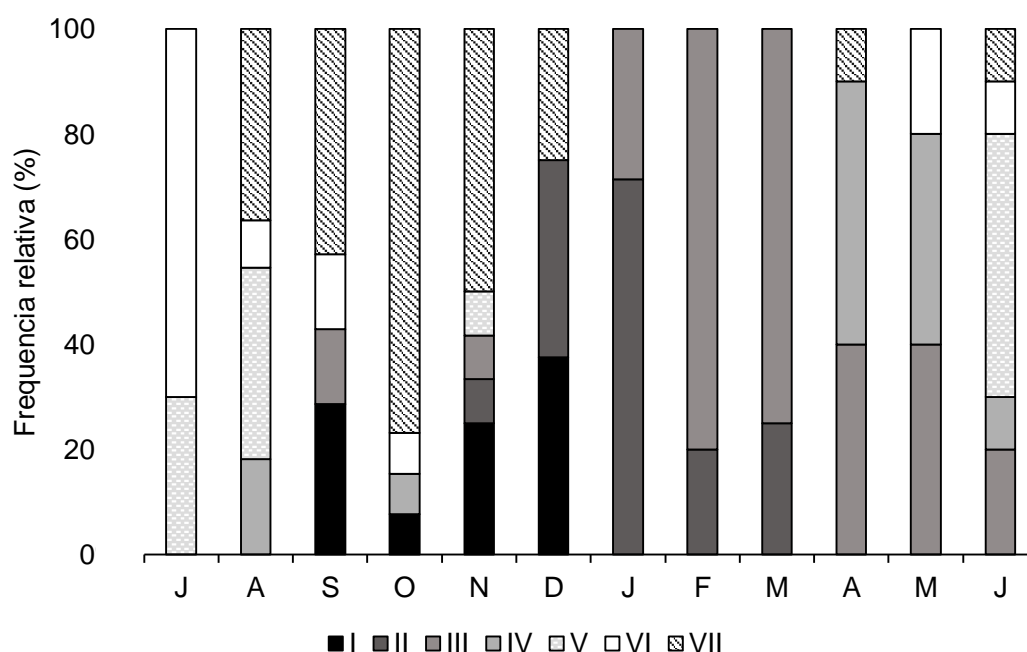


Figura 10 – Frequência relativa dos estádios gametogénicos ao longo dos 12 meses de amostragem na praia do Abalo (Peniche, Portugal), de julho 2015 a junho 2016. I – Inicial; II – Crescimento; III – Prematuro; IV – Maturados; V – Postura; VI – Pós-postura; VII – Reabsorção.

3.2. Efeito de três dietas no desenvolvimento das gónadas de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

3.2.1. Dados biométricos

3.2.1.1. Jejum

No decorrer do jejum, não se registou qualquer mortalidade dos ouriços-do-mar. Após o período de jejum, foi possível observar que os indivíduos perderam peso (Jejum $P_{inicial}$ = 27,93 ± 8,25 g; Jejum P_{final} = 27,05 ± 7,7 g) mas não de forma significativa ($t_{232} = 0,841$; $p > 0,05$). Ainda assim, alguns indivíduos apresentaram elevado peso gonadal (PG) (1,5 ± 1 g) e valores de 5,9 ± 3,5 de índice gonadossomático (IG). O diâmetro de carapaça diminuiu significativamente após o período de jejum (Jejum $DC_{inicial}$ = 4,08 ± 0,46 cm; Jejum DC_{final} = 3,95 ± 0,42 cm); ($t_{232} = 2,167$; $p < 0,05$)

3.2.1.2. Ensaio

No início do ensaio, verificou-se que não existiam diferenças significativas no diâmetro da carapaça (DC) (A – 4,09 ± 0,34 cm; B – 4,05 ± 0,41 cm; C – 4,00 ± 0,40 cm; *Kruskal-Wallis* $H_2 = 1,747$; $p > 0,05$), assim como no peso húmido individual (P) dos ouriços-do-mar que foram submetidos a diferentes dietas alimentares (A - 27,78 ± 6,06 g; B - 27,69 ± 8,72 g; C - 26,72 ± 8,17 g; ANOVA de um fator $F_{2,87} = 0,175$; $p > 0,05$).

No decorrer no ensaio não houve mortalidade.

No final do ensaio, o diâmetro da carapaça (DC) não apresentou diferenças significativas entre as diferentes dietas (ANOVA de um fator $F_{2,89} = 0,827$; $p > 0,05$), assim como o peso médio individual (P) (ANOVA de um fator $F_{2,89} = 0,265$; $p > 0,05$).

O peso gonadal no final do ensaio (PG), apresentou diferenças significativas (teste de *Kruskal-Wallis* $H_2 = 31,248$; $p < 0,05$; testes de *Tukey* $p_{(Dieta A vs. B)} > 0,05$; $p_{(A vs. C)} < 0,05$; $p_{(C vs. B)} < 0,05$) entre os ouriços-do-mar alimentados com a dieta C (2,84 ± 1,72 g), quando comparados com as dietas A (1,13 ± 0,71 g) e B (1,14 ± 0,79 g) (Fig.11 - A).

Estatisticamente, verificaram-se também diferenças significativas nos valores do índice gonadossomático (IG) entre os indivíduos alimentados com as diferentes dietas (teste de *Kruskal-Wallis* $H_2 = 33,811$; $p < 0,05$; testes de *Tukey* $p_{(Dieta A vs. B)} > 0,05$; $p_{(A vs. C)} < 0,05$; $p_{(C vs. B)} < 0,05$). A diferença mais notória foi observada nos indivíduos

alimentados com a dieta C ($9,97 \pm 6,4$ %), apresentando um índice gonadossomático superior aos da dieta A ($4,86 \pm 3,26$ %) e aos da dieta B ($3,80 \pm 2,37$ %) (Fig.11 - B).

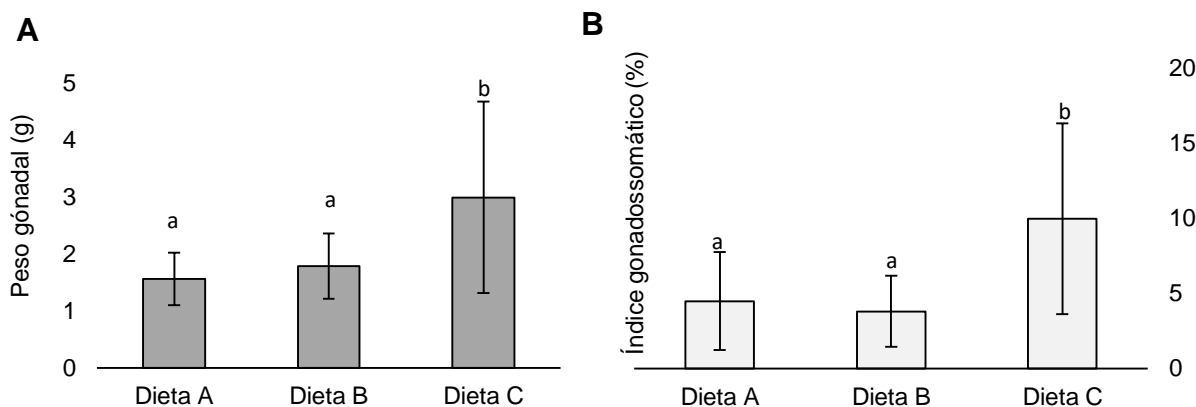


Figura 11 – (A) Peso gonadal (PG) e (B) índice gonadossomático (IG) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* sujeitos a diferentes dietas. Dieta A – *Codium tomentosum*; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. As letras a e b representam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

3.2.1.3. Taxa de ingestão alimentar

A dieta B demonstrou ser bem aceite pelos indivíduos, tendo sido a mais consumida ao longo do ensaio ($2860,4 \pm 413$ g) (Fig.12). No entanto, verificou-se que a ração libertava algumas partículas, mas nunca se desfez por completo, demonstrando ser adequada para usar em ambiente aquáticos. Apesar disso, a qualidade da água nunca ficou comprometida. A segunda dieta mais consumida foi a dieta A (1747 ± 325 g), composta pela macroalga verde *Codium tomentosum*. A menos consumida pelos ouriços-do-mar foi a dieta C, com apenas $780,1 \pm 15$ g de alimento ingerido, mas foi a que teve melhor desempenho no aumento do peso gonadal (PG). As quantidades de alimento consumido foram estatisticamente diferentes umas das outras (*Kruskal-Wallis* $H_2 = 152,223$; $p < 0,05$; *Tukey* $p_{(A \text{ vs. B})} < 0,05$; $p_{(A \text{ vs. C})} < 0,05$; $p_{(C \text{ vs. B})} < 0,05$).

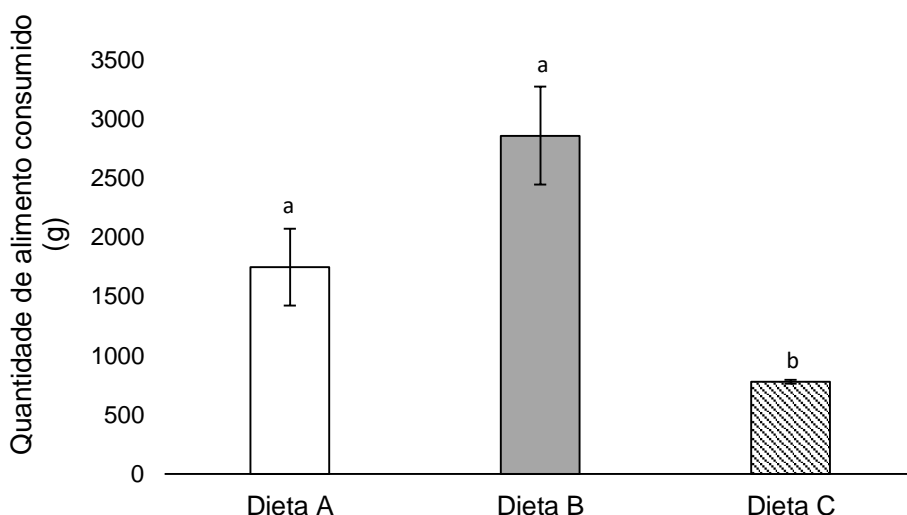


Figura 12 – Quantidade média de alimento ingerido até ao final do ensaio, de cada dieta fornecida aos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Dieta A – *Codium tomentosum*; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. Letras a e b indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.2.2. Histologia

No final do jejum, 60 % dos indivíduos encontravam-se no estágio I (fase inicial) e os restantes (40 %), no estágio VII (reabsorção).

De um modo geral, observaram-se vários estádios de desenvolvimento gametogénico nos ouriços-do-mar alimentados com as 3 dietas distintas (Fig.13). No entanto, alguns estádios expressaram-se de forma significativa em determinadas dietas. Os indivíduos alimentados com a dieta A (*Codium* sp.) encontravam-se maioritariamente no estágio II (crescimento) (23 %), IV (maturação) (23 %) e V (postura) (19 %). Na dieta B, cerca de 33 % dos ouriços-do-mar estavam no estágio VII (reabsorção) e 19 % dos indivíduos estavam no estágio IV (maturação). Na dieta C verificou-se uma maior percentagem de indivíduos no estágio I (fase inicial) (25 %) e no estágio III (pré-maturação) (25 %).

Relativamente ao tamanho dos oócitos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no decorrer do ensaio com as três dietas (teste de *Kruskal-Wallis* $H_2 = 2,435$; $p > 0,05$), sendo que na dieta A mediam $41,83 \pm 21,85 \mu\text{m}$; na dieta B mediam $50,20 \pm 19,83 \mu\text{m}$ e na dieta C mediam $44,99 \pm 21,21 \mu\text{m}$.

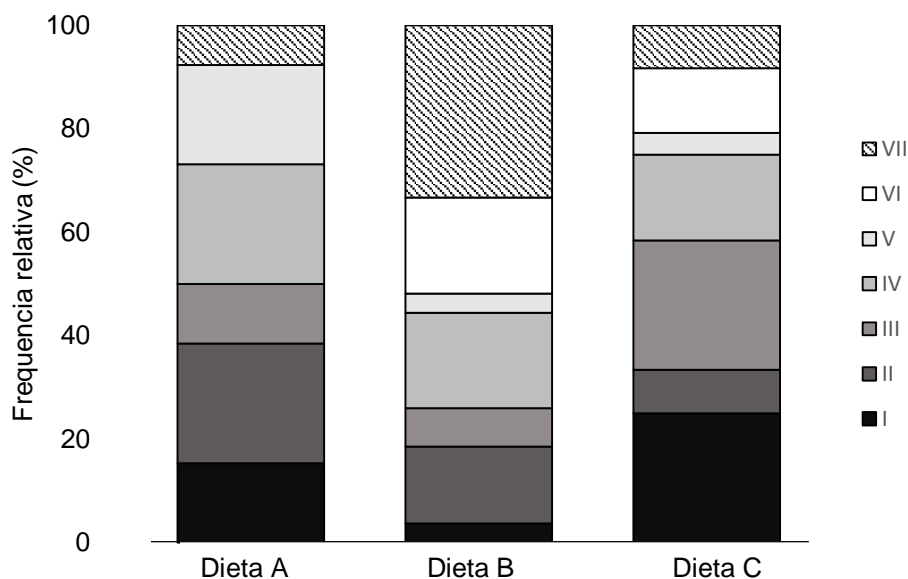


Figura 13 – Frequência relativa dos estádios gametogénicos identificados nos indivíduos *Paracentrotus lividus*, alimentados com diferentes dietas. Dieta A – *Codium tomentosum*; Dieta B – *Mix* de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. I – fase inicial; II – crescimento; III – pré-maturação; IV – Maturação; V – Postura; VI – pós-postura; VII – reabsorção.

3.2.3. Análises bioquímicas

3.2.3.1. Lípidos totais e ácidos gordos nas dietas

A dieta C continha níveis elevados de lípidos ($17,38 \pm 2,1 \text{ mg g}^{-1}$), seguindo-se a dieta A ($9,26 \pm 4,7 \text{ mg g}^{-1}$) e, com menor quantidade, a dieta B ($1,65 \pm 1,4 \text{ mg g}^{-1}$) (Fig.14). O teor lipídico mostrou ser estatisticamente diferente quando comparado entre as três dietas (teste de *Kruskal-Wallis* $H_2 = 28,039$; $p < 0,05$; testes de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. B})} < 0,05$; $p_{(A \text{ vs. C})} < 0,05$; $p_{(C \text{ vs. B})} < 0,05$).

Relativamente aos ácidos gordos, as três dietas eram ricas em ácido palmítico (C16:0) (dieta A – $8,44 \pm 0,8 \%$; dieta B – $8,24 \pm 2,3 \%$; C - $5,4 \pm 1,1 \%$) não apresentando diferenças significativas entre elas (ANOVA de um fator $F_{2,6} = 0,361$; $p > 0,05$). O ácido esteárico (C18:0) foi encontrado em maior quantidade na dieta A ($12,68 \pm 1,6 \%$) e na dieta B ($12,79 \pm 4,7 \%$), tendo sido a dieta C a que se diferenciou, estatisticamente, pela menor quantidade deste componente ($4,62 \pm 1,8 \%$; ANOVA de um fator $F_{2,6} = 6,926$; $p < 0,05$; testes de *Tukey* $p_{(C \text{ vs. B})} < 0,05$). A dieta C também mostrou ser mais rica em ácido oleico (C18:1n9; $6,25 \pm 1,2 \%$, ANOVA de um fator $F_{2,6} = 37,648$; $p < 0,05$) relativamente às dietas A ($1,3 \pm 0,1 \%$; teste de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. C})} < 0,05$) e B ($1,6 \pm 0,6 \%$; teste de *Tukey*; $p_{(C \text{ vs. B})} < 0,05$). Assim como, em ácido linoleico (C18:2n6; $8,41 \pm 0,6 \%$;

ANOVA de um fator $F_{2,6} = 251,569$; $p < 0,05$), diferenciando-se estatisticamente das dietas A ($0,3 \pm 0,01$ %; teste de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. } C)} < 0,05$) e B ($0,9 \pm 0,6$ %; teste de *Tukey* $p_{(C \text{ vs. } B)} < 0,05$). Bioquimicamente a dieta A e B mostraram ser caracterizadas pelos mesmos ácidos gordos, mas em quantidades diferentes, sendo distinguidas principalmente pela quantidade de EPA (Ácido eicosapentaenóico - C20:5n3) (A – 0 %; B - $0,04 \pm 0,03$ %) embora sem suporte estatístico (ANOVA de um fator $F_{2,6} = 1,669$; $p > 0,05$). A dieta C mostrou ser estatisticamente diferente das restantes, pela elevada quantidade de ácido α -linolénico (C18:3n3; $2,05 \pm 0,4$ %; ANOVA de um fator $F_{2,6} = 63,170$; $p < 0,05$) relativamente à dieta A ($0,3 \pm 0,1$ %; teste de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. } C)} < 0,05$) e dieta B ($0,2 \pm 0,08$ %; teste de *Tukey* $p_{(C \text{ vs. } B)} < 0,05$). Da mesma forma para o ácido linoleico (C18:2n6; $8,41 \pm 0,6$ %; $F_{2,6} = 25,352$; $p < 0,05$) relativamente à dieta A ($0,3 \pm 0,01$ %; teste de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. } C)} < 0,05$) e dieta B ($0,9 \pm 0,6$ %; teste de *Tukey* $p_{(C \text{ vs. } B)} < 0,05$) (Tabela 1).

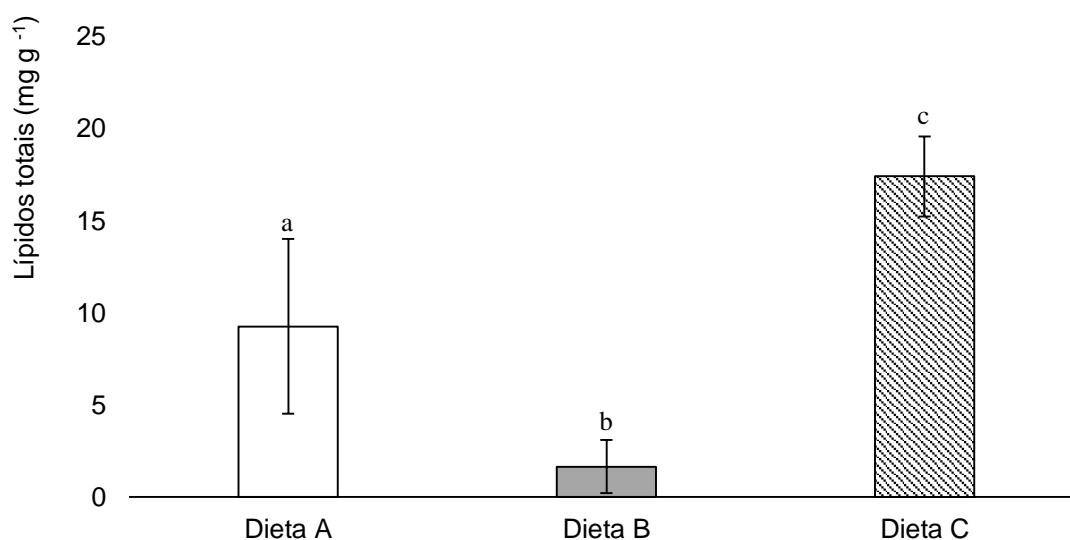


Figura 14 – Quantidade de lípidos presentes nas diferentes dietas (mg g⁻¹) fornecidas aos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. Dieta A – *Codium tomentosum*; Dieta B – Mix de algas e vegetais; Dieta C – Milho e espinafres. Letras a, b e c representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Identificação e quantificação de ácidos gordos presentes nas diferentes dietas (média \pm desvio-padrão, percentagem), fornecidas aos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (A – *Codium tomentosum*; B – Mix de algas e vegetais; C – Milho e espinafres).

	Codium sp.	Mix	Milho e Espinafre	p-value
Saturados (SFA)				
C14:0	0,6 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,2 ^a	0,2 \pm 0,1 ^b	0,008
C16:0	8,4 \pm 0,8	8,2 \pm 2,3	5,4 \pm 1,1	0,058
C18:0	12,7 \pm 1,6 ^a	12,8 \pm 4,8 ^a	4,6 \pm 1,8 ^b	0,028
C20:0	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,04	0,756
MUFA				
C16:1n-7	0,04 \pm 0	0,09 \pm 0	0,2 \pm 0,2	0,349
C18:1n-9	1,3 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,6 ^a	6,2 \pm 1,2 ^b	<0,001
C20:1n-9	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	0,1 \pm 0,01 ^b	<0,001
ω6 - PUFA				
C18:2n-6	0,3 \pm 0,01 ^a	0,9 \pm 0,6 ^a	8,4 \pm 0,6 ^b	<0,001
C22:5n-6	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	1 \pm 0,02 ^b	<0,001
ω3 - PUFA				
C18:3n-3	0,3 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,08 ^a	2,1 \pm 0,4 ^b	<0,001
C18:4n-3	0,4 \pm 0	0,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0	0,707
C20:3n-3	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	0,1 \pm 0 ^b	<0,001
(EPA) C20:5n-3	0 \pm 0	0,04 \pm 0,03	0,06 \pm 0,04	0,265
ΣSFA	22,1 \pm 2,4 ^a	22,1 \pm 7,1 ^a	10,5 \pm 2,8 ^a	0,012
ΣMUFA	1,3 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,6 ^a	6,5 \pm 1,2 ^b	<0,001
ΣPUFA	1,0 \pm 0,1 ^a	1,5 \pm 0,6 ^a	11,3 \pm 0,5 ^b	<0,001
$\Sigma\omega$3	0,6 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,2 ^a	2,3 \pm 0,5 ^b	<0,001
$\Sigma\omega$6	0,3 \pm 0,01 ^a	1,0 \pm 0,7 ^a	9,1 \pm 0,1 ^b	<0,001
ω3/ω6	2,0 \pm 0,3 ^a	0,8 \pm 0,4 ^b	0,2 \pm 0,1 ^b	<0,001
EPA/DHA	0	0	0	-

a e b representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Lípidos totais e ácidos gordos nas gónadas de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Em relação à quantidade de lípidos presente nas gónadas, os indivíduos alimentados com a dieta C apresentaram valores significativamente mais elevados ($46,97 \pm 25,99 \text{ mg g}^{-1}$), seguindo-se a dieta B ($27,34 \pm 7,37 \text{ mg g}^{-1}$). A dieta A apresentou valores significativamente mais baixos, quando comparado com a dieta B e C ($21,39 \pm 2,78 \text{ mg g}^{-1}$) (teste de *Kruskal-Wallis* $H_2 = 25,851$; $p < 0,05$; testes de *Dunn's* $p_{(A \text{ vs. B})} < 0,05$; $p_{(A \text{ vs. C})} < 0,05$) (Fig.15).

Independentemente do tipo de dieta, o ácido palmítico (C16:0) foi o ácido gordo encontrado em maior quantidade (dieta A – $25,9 \pm 5,5\%$; dieta B – $22,8 \pm 4,0\%$; dieta C – $22,6 \pm 1,4\%$), seguindo-se o ácido esteárico (C:18) nos indivíduos da dieta A ($19,7 \pm 8,8\%$) e B ($19,9 \pm 11,1\%$) (Tabela 2). Os indivíduos alimentados com a dieta C foram os que se destacaram mais, pelos elevados níveis de ácido linoleico (C18:2n6; $21,2 \pm 3,7 \%$), apresentando diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de um fator $F_{2,15} = 95,439$; $p < 0,05$) quando comparados com os valores da dieta A ($2,1 \pm 0,8 \%$; teste de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. C})} < 0,05$) e da dieta B ($4,3 \pm 1,8 \%$; teste de *Tukey* $p_{(C \text{ vs. B})} < 0,05$). O ácido oleico (C18:1n9) também foi encontrado em maior quantidade nos indivíduos alimentados com a dieta C ($11,4 \pm 3,1 \%$; ANOVA de um fator $F_{2,15} = 85,893$; $p < 0,05$), apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparados com os valores da dieta A ($3,2 \pm 1,1 \%$; teste de *Tukey* $p_{(A \text{ vs. C})} < 0,05$) e os da dieta B ($3,6 \pm 1 \%$; teste de *Tukey* $p_{(C \text{ vs. B})} < 0,05$). A dieta B traduziu-se numa elevada quantidade de ácido eicosatrienóico (C20:3n3; $9,7 \pm 3,0 \%$), diferenciando-se das restantes (dieta A – $7,6 \pm 4,4 \%$; dieta B – $9,7 \pm 3 \%$), apesar de não serem observadas diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de um fator $F_{2,15} = 0,833$; $p > 0,05$). Os indivíduos da dieta A foram os que apresentaram maior quantidade de EPA (C20:5n3; $9,8 \pm 5,6 \%$) comparativamente aos restantes (dieta B - $7,4 \pm 6,5 \%$; dieta C $3,6 \pm 2,5 \%$), embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre eles (ANOVA de um fator $F_{2,15} = 1,872$; $p > 0,05$). De modo geral, e sem que houvessem diferenças significativas, os indivíduos mostraram ser ricos em SFA (ácidos gordos saturados, “saturated fatty acids” em inglês) (dieta A – $53,9 \pm 13,6 \%$; dieta B – $50,1 \pm 14,3 \%$; dieta C – $40,2 \pm 3,3 \%$; ANOVA de um fator $F_{2,15} = 2,255$; $p > 0,05$) e PUFA (ácidos gordos polinsaturados, “polyunsaturated fatty acids” em inglês) (teste de *Kruskal-Wallis* $H_2 = 1,450$; $p > 0,05$), embora a dieta C proporcionasse níveis mais elevados de PUFA (dieta A – $27,9 \pm 11,6 \%$; dieta B – $31,0 \pm 10,2 \%$; dieta C – $37,1 \pm 3,0 \%$) (Tabela 2).

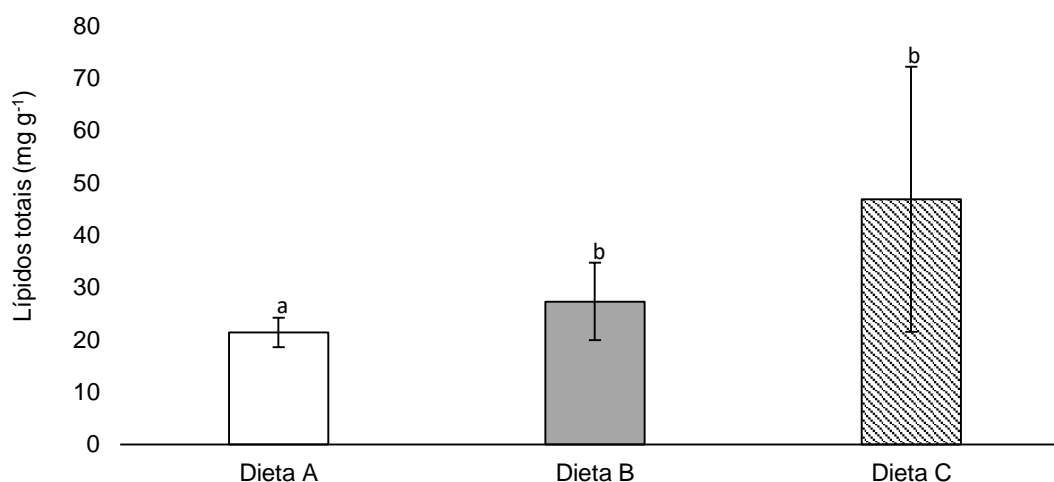


Figura 15 – Quantidade de lípidos presentes nas gónadas dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, alimentados com diferentes dietas (A – *Codium tomentosum*; B – Mix de algas e vegetais; C – Milho e espinafres) (mg g⁻¹). Letras a e b representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Identificação e quantificação de ácidos gordos presentes nas gónadas dos ouriços-do-mar, alimentados com diferentes dietas (A – *Codium tomentosum*; B – Mix de algas e vegetais; C – Milho e espinafres).

	A	B	C	p-value
Saturados (SFA)				
C14:0	7 ± 1,6	6,3 ± 2	5,5 ± 1,2	0,346
C16:0	25,9 ± 5,5	22,8 ± 4	22,6 ± 1,4	0,361
C18:0	19,7 ± 8,8	19,9 ± 11,1	11,4 ± 3,1	0,217
C20:0	1,2 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,3 ^{ab}	0,7 ± 0,3 ^b	0,026
MUFA				
C16:1n-7	1,2 ± 0,8	0,9 ± 0,6	2 ± 0,6	0,776
C18:1n-9	3,2 ± 1,1 ^a	3,6 ± 1 ^a	11,4 ± 1,3 ^b	<0,001
C18:1n-7	2,2 ± 1,3	2 ± 0,9	1,7 ± 0,5	0,776
C20:1n-9	7,4 ± 3,8	4,6 ± 1,5	5,6 ± 0,7	0,214
C22:1n-9	4,2 ± 1,4	7,8 ± 6,3	2 ± 0,6	0,077
ω-6 PUFA				
C18:2n-6	2,1 ± 0,8 ^a	4,3 ± 1,8 ^a	21,2 ± 3,7 ^b	<0,001
C20:2n-6	0,6 ± 0,6	1,3 ± 2,5	0,3 ± 0,1	0,574
(ARA) C20:4n-6	2 ± 0,6 ^a	1,4 ± 0,5 ^{ab}	0,7 ± 0,3 ^b	0,003
ω-3 PUFA				
C18:3n-3	2,5 ± 1,3	1,9 ± 1,1	2,8 ± 0,7	0,393
C18:4n-3	2,7 ± 2,3	4,6 ± 2,8	1 ± 0,5	0,057
C20:3n-3	7,6 ± 4,4	9,7 ± 3	7,4 ± 1,1	0,454
(EPA) C20:5n-3	9,8 ± 5,6	7,4 ± 6,5	3,6 ± 2,5	0,188
(DHA) C22:6n-3	0,5 ± 1	0,5 ± 0,5	0,1 ± 0,1	0,460
ΣSFA	53,9 ± 13,6	50,1 ± 14,3	40,2 ± 3,3	0,139
ΣMUFA	18,2 ± 5,3	18,9 ± 7,1	22,6 ± 0,8	0,310
ΣPUFA	27,9 ± 11,6	31,0 ± 10,2	37,1 ± 3,0	0,240
Σω3	23,2 ± 11,5	24,1 ± 10,5	14,9 ± 3,9	0,198
Σω6	4,7 ± 1,3 ^a	6,9 ± 4,7 ^a	22,2 ± 3,7 ^b	<0,001
ω3/ω6	5,2 ± 2,9 ^a	4,9 ± 4,2 ^b	0,7 ± 0,3 ^b	0,032

a e b representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Caracterização da Biologia reprodutiva de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

A temperatura mostrou ser um fator preponderante no desenvolvimento gametogénico de *Paracentrotus lividus*. Esta relação já foi descrita para outras populações de ouriço-do-mar, tais como: *Paracentrotus lividus* na França e na Irlanda, e *Loxechinus albus* na Argentina (Byrne, 1990; Pearse and Cameron, 1991; Spirlet *et al.*, 1998a; Pérez *et al.*, 2010). Quando as temperaturas começam a diminuir, os valores do índice gonadossomático tendem a aumentar. Spirlet *et al.* (1998a) registaram um valor máximo do índice gonadossomático no início da primavera (março/1994), seguindo-se por um declínio acentuado, ao mesmo tempo que a temperatura aumentava. Byrne (1990) observou duas populações de *Paracentrotus lividus* na Irlanda, durante dois anos (1986 – 1988) e observou o mesmo padrão. González-Irusta *et al.* (2010) verificaram o mesmo em 2004-2005, numa população de *Paracentrotus lividus* no norte de Espanha.

Além da temperatura, o fotoperíodo também influencia o desenvolvimento gametogénico. É no Inverno, à medida que as temperaturas e o número de horas decrescem, que os indivíduos dão início ao ciclo gametogénico. A relação entre o fotoperíodo e o desenvolvimento gametogénico foi provada em estudos anteriores, com outras espécies além de *Paracentrotus lividus*, como *Strongylocentrotus purpuratus* (Pearse *et al.*, 1986), *Strongylocentrotus droebachiensis* (Walker and Lesser, 1998) *Loxechinus albus* (Pérez *et al.*, 2010). Spirlet *et al.* (2000) e Shpigel *et al.* (2004) verificaram, em laboratório, que a temperaturas acima dos 20°C, combinadas com dias curtos, promoviam o crescimento gonadal do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Arafa *et al.* (2012), no Golfo da Tunísia, verificaram também que *P. lividus* no seu meio natural, tendia a aumentar o peso das suas gónadas nos meses mais frios e com dias mais curtos. González-Irusta *et al.* (2010) observaram que a população de *P. lividus* se encontrava maioritariamente na fase III, de pré-maturação (68%), no mês de fevereiro. Pensa-se que será o elevado número de fagócitos nutritivos que confere uma estrutura mais firme às gónadas, tornando-as mais densas (Walker *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 1998). Sun and Chiang (2015) defendem ainda, que é o aumento em número dos fagócitos nutritivos que conferem melhor sabor às gónadas. No entanto, na altura da maturação, o elevado número de óvulos que as gónadas possuem, torna-as muito frágeis, com falta de firmeza e com sabor desagradável. Os populares, nestas alturas, referem-se aos ouriços-do-mar como

estando “leitosos”, por estes se encontrarem maduros ou em fase de postura. Neste estudo, verificou-se um decréscimo no peso das gónadas nos meses de setembro, outubro e novembro/2016. Este decréscimo estará relacionado com a ausência de fagócitos nutritivos e de gâmetas, uma vez que os indivíduos se encontravam maioritariamente nos estádios de postura (V), pós-postura (VI) e reabsorção (VII). Dezembro foi o mês com menos horas de luz (9 h) e o mês com a maior percentagem de *P. lividus* na fase inicial de desenvolvimento gametogénico (estádio I – 37,5 %). Observou-se que o peso das gónadas aumentou a partir de janeiro/2016 ($1,40 \pm 1,14$ g), atingindo o seu valor máximo em fevereiro/2016 ($3,24 \pm 1,62$ g), onde os fagócitos nutritivos se encontravam no seu auge, para fornecer os nutrientes necessários para a maturação dos gâmetas. Ou seja, na transição do estágio III de pré-maturação (80%) para estágio IV de maturação, tal como verificaram Arafa *et al.* (2012). No presente estudo, os valores mais baixos de índice gonadosomático foram observados nos meses em que se registaram temperaturas mais altas (junho/2016 e julho/2015), indo de encontro com Spirlet *et al.* (1998a), que também registaram os valores mais baixos de índice gonadosomático em junho e também as temperaturas mais altas. Este acontecimento, justifica-se com o facto da época reprodução se iniciar também com o aumento da temperatura e do fotoperíodo (Arafa *et al.*, 2012). Sendo que em julho/2016, cerca de 70 % dos indivíduos se encontravam em fase pós-postura (estádio VI).

González-Irusta *et al.* (2010) observaram que a população de *Paracentrotus lividus* no norte de Espanha, nos meses de setembro, outubro e novembro de 2004, se encontrava na fase de reabsorção (reposição das reservas nutricionais), que se dá logo a seguir à fase da postura. A postura de *P. lividus* pode ocorrer uma ou duas vezes por ano. Geralmente, não costuma envolver todos os indivíduos da população. Ainda assim, os gâmetas libertados podem servir de estímulo para que outros indivíduos adultos iniciem o processo de postura (Boudouresque and Verlaque, 2007). Os eventos podem não se repetir na mesma altura todos os anos. Na Irlanda foi encontrada uma diferença interanual entre as épocas de postura frequente, chegando às quatro semanas de diferença entre anos (Boudouresque and Verlaque, 2007). Quando ocorrem duas épocas de postura, geralmente a primeira ocorre quando a temperatura sobe até um ponto crítico. A segunda sucede-se quando a temperatura diminui acentuadamente (Bayed *et al.*, 2005; Boudouresque and Verlaque, 2007). Ainda assim, Arafa *et al.*, (2012) apenas identificaram uma época de postura de *Paracentrotus lividus* no Golfo da Tunísia, mas existem estudos em que foram encontradas uma ou duas épocas de postura no mesmo local (Régis, 1979; Fernandez, 1998). Tal reforça o fato

de ser algo imprevisível e altamente subordinado pelos fatores ambientais. Neste trabalho foi possível identificar duas épocas de postura à semelhança dos restantes autores mencionados (Tabela 3).

Tabela 3 – Épocas de postura de *Paracentrotus lividus* em diferentes locais.

Local do estudo	Ano do estudo	Nº de épocas de postura	Datas da postura	Referência
Baía de Bantry, Irlanda	1972	2	janeiro – março e agosto e setembro	Crapp and Willis, 1975
Ballynahown, Irlanda	1986-1988	1	maio - julho	Byrne, 1990
Glinsk, Irlanda	1986-1988	1	julho - junho	Byrne, 1990
Norte da Bretanha, França	1968	1	março - setembro	Allain, 1975
Marselha, France	?	2	junho e setembro - novembro	Régis (1979)
Villefranche, França	1984-1988	2	abril – maio e setembro - outubro	Pedrotti, 1993
Córsega, França	1991-1992	2	março – junho e setembro - outubro	Fernandez, 1998
Bretanha, França	1993 - 1995	1	maio - agosto	Spirlet <i>et al.</i> , 1998a
Galiza, Espanha	1988-1993	1	abril - Julho	Catoira, 1995
Torregorda, Espanha	2003	1	abril – julho	Martinez-Pita <i>et al.</i> , 2010
Cantábrico, Espanha	2008	2	março – abril e julho - setembro	González-Irusta <i>et al.</i> , 2010
Casablanca, Marrocos	1999-2000	1	março - junho	Bayed <i>et al.</i> , 2005
Baía de Bistrina, Croácia	2002 - 2003	1	março - julho	Tomšić <i>et al.</i> , 2010
Ilha deTavolara, Itália	2013- 2014	2	junho – julho e outubro	Siliani <i>et al.</i> , 2016
Península de Sínis, Itália	2013- 2014	1	março - abril	Siliani <i>et al.</i> , 2016

A postura (estádio V) foi mais incidente nos meses de junho/2016 (50 %), julho/2015 (30 %) e agosto/2015 (36 %). O Verão foi considerado como sendo a primeira época de postura do ano. Em setembro e outubro/2015, não foram encontrados nenhuns indivíduos na fase de postura (V) e não se verificaram grandes flutuações de

temperatura. No entanto, verificou-se que, no mês de novembro/2015, 8,3 % dos indivíduos estavam na fase de postura (V). Tal reforçou a ideia de que, o decréscimo acentuado da temperatura nesse mês (Fig.6) desencadeou uma segunda postura.

Byrne (1990) encontrou oócitos entre os 10-50 μm , nos estádios iniciais de desenvolvimento gametogénico (I e II), e tamanhos máximos até aos 90 μm , desde da prematuração (estádio III) à postura (estádio V). Pérez et al. (2010) observaram diâmetros de oócitos superiores a 90 μm , durante o estágio de maturação (IV), para os ouriços-do-mar *Loxechinus albus*. O diâmetro dos oócitos tende a aumentar com o desenvolvimento do ciclo gametogénico. No mês de dezembro/2015, verificou-se que os indivíduos *P. lividus* encontravam-se maioritariamente nos estádios iniciais (estádio I – fase inicial e estágio II - crescimento). Estas observações foram de encontro com os valores observados do diâmetro dos oócitos ($25,45 \pm 4,22 \mu\text{m}$). Nos estádios iniciais, os ovários encontravam-se repletos de fagócitos nutritivos e, ao longo do tempo, começou a observar-se o aparecimento de oócitos pré-vitelogéneos de dimensões muito reduzidas. Estes foram depois aumentando de tamanho. A partir de dezembro/2015, notou-se que houve um crescimento progressivo do número e diâmetro dos oócitos, atingindo o valor mais alto em maio/2016 ($69,79 \pm 8,13 \mu\text{m}$). Este diâmetro mais elevado, encontrado no mês de maio, coincidiu com a altura em que foram encontradas elevadas percentagens de indivíduos matos (estádio IV = 40 %). Os diâmetros dos oócitos, da população em estudo, mostraram ser inferiores aos encontrados por Byrne (1990) e Pérez et al. (2010). Ainda assim, enquadram-se nos valores obtidos por aqueles autores, especialmente nas fases iniciais, estádios I e II (Byrne, 1990; Pérez et al., 2010).

A caracterização do ciclo gametogénico foi feita com base em Byrne (1990) e Spirlet et al. (1998a). Mas, houve a necessidade de fazer algumas alterações e ajustes. Analisando a caracterização histológica feita por ambos autores, encontraram-se algumas discrepâncias entre eles. Assim sendo, decidiu-se reajustar a caracterização das diferentes fases com base nas descrições de ambos os trabalhos. Em suma, isolou-se a fase de reabsorção (estádio VII), que Byrne contemplava na fase de recuperação (estádio I). Além disso, assumiu-se que os estádios II (fase vazia) e os estádios III (fase de recuperação), da forma como estão descritos por Spirlet et al. (1998a), não necessitariam de ser considerados separadamente. No que diz respeito à ordem da identificação dos diferentes estádios, Byrne (1990) e Spirlet et al. (1998a) seguiram o mesmo raciocínio. No presente estudo, considerou-se que a ordem dos estádios deveria ser iniciada com surgimento dos primeiros gâmetas e finalizada com a fase em que ocorre a absorção dos mesmos. À medida que se foram observando os cortes histológicos, reparou-se uma nova característica, ainda não descrita por outros autores,

que poderá ser contemplada na fase pós-postura. Os ovários e os testículos passam por transformações variadas, depois da postura até ao início do novo ciclo. Resolveu-se caracterizá-las e identificá-las, para uma melhor compreensão do desenvolvimento gametogénico. A pós-postura caracteriza-se essencialmente pela perda de material nutritivo e da organização estrutural interna. Nas fêmeas, o estágio de pós-postura pode ser difícil de identificar, podendo até se confundir com uma postura prematura. Os oócitos desprendem-se da parede e ficam soltos, juntamente com óvulos maduros, mostrando uma destruturação interna da gónada. Apenas se consegue distinguir de uma postura prematura, pela ausência de material nutritivo, na pós-postura. Nos machos, esta fase é mais fácil de ser identificada, uma vez que apenas se observam os espaços vazios, deixados pelos espermatozoides libertados, deixando o testículo com um aspeto rendilhado. Além do mais, Byrne (1990) intitulou como sendo estágio I, a fase em que ocorre a reabsorção dos gâmetas não libertados na postura. Ao passo que, no presente estudo, se considerou essa característica como sendo a última etapa - estágio VII (reabsorção). Consequentemente, o estágio I foi descrito como a fase em que surgem os primeiros gâmetas imaturos. O facto de haver diferentes fases, com características diferentes, mas que eram consideradas o mesmo estágio, tornava mais complicado o entendimento do funcionamento do ciclo gametogénico. O objetivo da adição de mais um estágio foi simplificar a caracterização do ciclo, de forma a melhor identificar cada fase e ter a perceção mais abrangente da morfologia das gónadas de *P. lividus*. Desta forma, o presente estudo pretendeu contribuir para uma melhor compreensão e caracterização do ciclo gametogénico de *P. lividus*. A descrição dos vários estádios através da Histologia das gónadas é algo que ainda não é inteiramente definida de forma consensual, uma vez que se encontram diferentes designações, de acordo com os vários autores (Byrne, 1990; Spirlet *et al.*, 1998ab; Sánchez-España *et al.*, 2004). A inclusão de novas descrições da morfologia das gónadas de *P. lividus*, em diferentes estádios, com base em observações próprias e descritas por outros autores, poderá contribuir para uma perceção mais concisa do ciclo gametogénico desta espécie.

O ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* tanto pode permanecer numa pequena área, durante alguns meses, como pode ter comportamentos migratórios diários de 2,60 a 4,80 metros (Shepherd and Boudouresque, 1979; Dance, 1987). Estes espécimes podem atingir os 40 cm h-1, sendo que, indivíduos com diâmetros de carapaça maiores movimentam-se mais depressa (Dance, 1987; Hereu, 2005; Boudouresque and Verlaque, 2007). Barnes and Crook (2001) observaram que *P. lividus* apresentava movimentos migratórios diários, em pequena escala, em relação à zona intermareal, relacionados com a sua alimentação. Outros defendem que os

comportamentos migratórios também podem estar relacionados com o recrutamento dos juvenis e com a presença de predadores, obrigando os ouriços-do-mar a procurarem refúgio (Hereu, 2005; Ouréns *et al.*, 2013). No entanto, Azzolina (1987, 1988), Tomas *et al.* (2004) e Fernandez *et al.* (2001) registaram movimentos migratórios sazonais (que podem durar meses) de longa distancia (100 m), também associados à disponibilidade de alimento. Com base nestes estudos anteriores, concluiu-se que *P. lividus* não tem um comportamento migratório regular, o qual depende essencialmente da densidade e disponibilidade de alimento (Palacín *et al.*, 1997). Outro fator, que pode estar envolvido nos comportamentos migratórios, é o estado gametogénico em que os indivíduos se encontravam e, conseqüentemente, com as necessidades nutritivas do estágio em questão (Agatsuma *et al.*, 1997). Efetivamente, em agosto/2015 observou-se empiricamente que os indivíduos tinham como preferência zonas menos profundas, encontrando-se nas poças intermareais, em partes superiores da zona intermareal. Apesar de não fazer parte dos objetivos deste estudo e, embora não se tenham recorrido a metodologias adequadas, notou-se uma deslocação dos ouriços-do-mar, em direção ao andar supralitoral, em comparação aos outros meses. Verificou-se também uma maior abundância de *Laminaria* sp. e de outras macroalgas, que fazem parte da alimentação destes animais. Este fenómeno de migração poderá ter sido relacionado com a maior disponibilidade destes alimentos. Conseqüentemente, crê-se que a população tenha migrado para águas menos profundas para concretizar a sua reprodução e aproveitar a disponibilidade de alimento, de forma a obter reservas energéticas, para recuperar do desgaste da postura e preparar-se para dar início a um novo ciclo gametogénico.

Em suma, pode referir-se que a população de *P. lividus* na região Oeste de Portugal concretizou duas épocas de reprodução durante o ano de julho/2015 a junho/2016. Aparentemente, alguns dos seus indivíduos executam movimentos migratórios, de acordo com os seus padrões de postura e/ou de disponibilidade de alimento. Além disso, o desenvolvimento e crescimento das suas gónadas evidenciaram ser positivamente influenciados pelo aumento do fotoperíodo, encontrando-se maturadas nos meses em que se registaram temperaturas mais elevadas (no Verão), e novamente quando a temperatura diminui consideravelmente (novembro/2015).

4.2. Efeito de três dietas no desenvolvimento das gónadas de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

Quando sujeitos a escassez de alimento, os ouriços-do-mar utilizam as reservas que contêm nos fagócitos nutritivos das suas gónadas. O jejum, combinado com as baixas temperaturas, faz com que haja absorção destes órgãos, reiniciando o ciclo gametogénico (Spirlet *et al.*, 1998b; Yokota *et al.*, 2002; Fabbrocini *et al.*, 2012; Sartori and Gaion, 2015). Desta forma, quando os organismos se encontram na transição do estágio final da gametogénese (reabsorção) para o inicial (estádio I), o seu desenvolvimento gametogénico pode ser manipulado, a partir desse ponto. Além disso, o jejum não provoca necessariamente a diminuição do volume das gónadas, mas sim a recolocação das reservas (Kaneko *et al.*, 1981; Guillou *et al.*, 2000). Em todo o caso, há que ter em conta a possibilidade de ouriços-do-mar sofrerem um decréscimo no seu diâmetro da carapaça quando sujeitos a períodos de jejum (Régis, 1979; Lawrence and Lane 1982; Levitan 1988;). Do ponto de vista comercial, poderá vir a ser um procedimento chave para a aquacultura, permitindo que o ciclo gametogénico seja manipulado, de acordo com aquilo que se pretende num cultivo (Spirlet *et al.*, 2001; Yokota *et al.*, 2002; Fabbrocini *et al.*, 2012; Silva, 2012; Sartori *et al.*, 2015; Fabbrocini *et al.*, 2015). Uma vez que a aquacultura de ouriços-do-mar poderá contemplar essencialmente duas vertentes: repovoamento e acabamento das gónadas; será possível manipular os organismos para se obterem os melhores resultados, em cada uma dessas vertentes. No presente estudo, o jejum não provocou obrigatoriamente a diminuição do volume das gónadas, levando-as apenas a atingir os estádios VII (reabsorção) e I (fase inicial), estando de acordo com as observações de Kaneko *et al.* (1981) e Guillou *et al.* (2000). O período de jejum mostrou ser um procedimento essencial para estabelecer a sincronização gametogénica dos ouriços-do-mar *P. lividus*. No entanto, verificou-se que os ouriços-do-mar decresceram, após 30 dias de privação de alimento. Além disso, concluiu-se que os ouriços-do-mar não recuperaram o tamanho original, durante os 80 dias de ensaio. Este facto, possivelmente deveu-se aos ouriços-do-mar terem canalizado as suas energias para o crescimento das gónadas e desenvolvimento gametogénico, ao invés de despenderem energia no seu crescimento somático (Kaneko *et al.*, 1981; Guillou *et al.*, 2000). Outros estudos revelaram que as rações nem sempre proporcionam crescimento somático (Fernandez and Galtagirone, 1994). Guillou *et al.* (2000) verificaram que a espécie *Sphaerechinus granularis* canalizava a sua energia para a reprodução, quando se encontrava no estágio de maturação (estádio

IV). Enquanto que, nos estádios seguintes à postura (estádio VI – pós-postura e estágio VII – reabsorção), esta espécie centrava as suas energias para o crescimento somático, ou para o armazenamento de energia nas células somáticas das gónadas. Ou seja, é necessário determinar o estágio de maturação gametogénica dos indivíduos, para iniciar os corretos procedimentos, com vista aos diferentes objetivos de produção: crescimento somático versus crescimento e maturação das gónadas

O milho tem sido alvo de vários estudos na alimentação de ouriços-do-mar (Basuyaux and Blin, 1998; Spirlet *et al.*, 2001; Schlosser *et al.*, 2005; Fabbrocini *et al.*, 2012; Fabbrocini *et al.*, 2015; Silva, 2012; Satori *et al.*, 2016) e os resultados obtidos vão de encontro com os deste estudo. A dieta à base de milho e espinafres (C), apesar de ter sido a menos consumida, foi a que mostrou melhor performance no aumento do peso das gónadas e do índice gonadossomático.

O agar é utilizado há muito como espessante alimentar. Fabroccini *et al.* (2012, 2015) mostraram que o agar tem características promissoras como gelificante/agente ligante, na formulação de dietas para o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os biocomponentes do agar são bem aceites pelos ouriços-do-mar e as “pellets” da ração absorvem uma quantidade mínima de água, além de libertarem poucos resíduos para o sistema. Este último fator depende da percentagem de agar que é utilizada, sendo que no presente estudo foi usada a mesma percentagem (3%) que Fabroccini *et al.*, (2012). Ainda assim, verificou-se uma maior necessidade de limpar os sistemas onde foi fornecida a dieta B, uma vez que a quantidade de produtos de excreção dos ouriços-do-mar era maior, comparativamente aos sistemas da dieta A e C. Contudo, a qualidade da água não foi comprometida. Numa publicação muito recente e posterior à finalização prática do presente ensaio experimental, Fabroccini *et al.* (2015) testaram rações com diferentes percentagens de agar, verificando que a mais eficaz seria a de 6% de agar. A característica mais interessante do uso do agar é que retarda a progressão do ciclo gametogénico e facilita a sincronização das gónadas (Fabroccini *et al.*, 2012; Fabroccini *et al.*, 2015). No presente estudo, os ouriços-do-mar alimentados com a dieta contendo agar (dieta B), encontravam-se maioritariamente no estágio de reabsorção (VII), indo de encontro com os resultados dos estudos anteriores (Fabroccini *et al.*, 2012; Fabroccini *et al.*, 2015). Estes resultados fazem parte dos pontos-chave para o sucesso da aquacultura de *P. lividus*, uma vez que os ouriços-do-mar devem estar despromovidos de gâmetas maturados, para serem consumidos. Outros estudos mostram dados e conclusões muito diferentes. A razão para tal poderá residir no tipo de ingredientes, na forma de fazer as “pellets” (Peare *et al.*, 2002; Ruscoe *et al.*, 2005; Fabroccini *et al.*, 2012; Fabroccini *et al.*, 2015) e no tipo de agar que se utiliza (se em pó, flocos, para uso alimentar ou industrial).

À semelhança de estudos anteriores (Basuyaux and Blin, 1998; Spirlet *et al.*, 2001; Schlosser *et al.*, 2005; Fabbrocini *et al.*, 2012; Fabbrocini *et al.*, 2015; Silva, 2012; Satori *et al.*, 2016), a dieta C (milho e espinafres) foi a que induziu valores de índice gonadossomático mais elevados em *P. lividus*. Ainda que neste estudo não tenham sido quantificadas as proteínas de cada dieta, e das gónadas dos indivíduos a quem foram fornecidas, estas também devem ser tomadas em consideração, uma vez que têm a sua contribuição no crescimento em volume das gónadas (Cook *et al.*, 2007). O milho, apesar de apresentar baixos níveis de proteína, é rico em polissacarídeos, que em conjunto com um alimento com um elevado teor proteico poderá ser facilmente absorvido. Basuyaux *et al.* (1998) afirmaram que as proteínas solúveis são facilmente absorvidas, como os polissacarídeos solúveis. Isto justifica, assim, o facto de aqueles autores terem obtido melhores resultados com a mistura do milho, com a macroalga *Palmaria palmata* e *Laminaria digitata*, do que com cada um destes elementos em separado. Assim sendo, poderá ser uma boa aposta desenvolver futuramente uma ração comercial baseada na mistura de milho, espinafres e macroalgas.

De acordo com Boudouresque and Verlaque (2007), a taxa de consumo de *P. lividus* depende da disponibilidade de alimento e do tipo de alimento. Esta taxa será mais elevada, quando o alimento for nutricionalmente pobre, e baixa, quando o alimento fornecido for nutricionalmente rico (Frantzis and Grémare 1992; Haya and Régis 1995; Fernandez and Boudouresque, 2000). Sabe-se que os parâmetros bioquímicos das gónadas são influenciados especificamente pelos estádios de desenvolvimento gametogénico em que se encontram. Todavia, deve ter-se em conta que se tratam, não só de um órgão reprodutor, mas também de um local de armazenamento de reservas energéticas e nutricionais (Russell, 1998; Hughes *et al.*, 2006; Siliani *et al.*, 2015). Mai *et al.* (1996) e Arafa *et al.* (2012) demonstraram, nos seus trabalhos, a importância dos ácidos gordos provenientes de macroalgas, durante o desenvolvimento gametogénico. Os ouriços-do-mar alimentados com a dieta C (milho e espinafres) foram os que mostraram uma maior quantidade de ácidos gordos PUFA, mas foi a dieta A (*Codium tomentosum*) que proporcionou níveis mais altos de EPA (C20:5n3). Tendo em conta que a dieta A era a que menos continha EPA na sua composição, pensa-se que a macroalga (*Codium sp.*) se tornou uma fonte indireta deste ácido gordo para o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. De acordo com alguns estudos (Tocher, 2003; Carboni *et al.*, 2013), os ouriços-do-mar são capazes de converter PUFA's de cadeia curta em PUFA's de cadeia longa (LC-PUFA). Por exemplo, o ácido α -linolénico (C18:3n3) pode ser convertido em ácido estearidónico (C18:4n3), através da enzima $\Delta 6$ -dessaturase. Posteriormente, o ácido estearidónico (C18:4n3) sofre um processo de alongação, convertendo-se em ácido eicosatetraenóico (C20:4n3), que a enzima

$\Delta 5$ -dessaturase converte em EPA. Carboni, *et al.* (2013) encontrou, no seu estudo, uma correlação entre o *input* de ácido α -linolénico (C18:3n3) através da alimentação e as quantidades de EPA encontradas nas gónadas de *P. lividus*. O presente estudo foi de encontro ao encontrado por estes autores. A dieta C (milho e espinafres) era a mais rica em ácido α -linolénico (C18:3n3), mas no final não se expressou em níveis muito elevados de EPA nas gónadas. Isto, porque a dieta A (*Codium tomentosum*) era a que mais continha ácido estearidónico (C18:4n3), em relação às restantes dietas. Neste sentido, os indivíduos alimentados com a dieta C (milho e espinafres) tiveram de despende de mais energia para converter o ácido α -linolénico (C18:3n3) em EPA, do que os alimentados com a dieta A (*Codium tomentosum*), que apenas teriam de sintetizar o ácido estearidónico (C18:4n3). Arafa *et al.* (2012) verificaram que os PUFA são significativamente afetados pela temperatura, uma vez que os ouriços-do-mar *P. lividus* apresentaram elevados valores daqueles ácidos gordos, nos meses mais frios (altura em que *P. lividus* se encontrava nas fases iniciais da gametogénese). Os valores de PUFA, nas gónadas de *P. lividus*, tenderam a decrescer com o aumento da temperatura ao longo dos meses (enquanto *P. lividus* maturava e se reproduzia). Os ouriços-do-mar alimentados com a dieta C (milho e espinafres) encontravam-se, na sua grande maioria, nos estádios iniciais (I a III). Também, foram os que apresentaram níveis mais altos de PUFA, nas suas gónadas. Este facto traduz-se numa vantagem para a engorda de *Paracentrotus lividus*, uma vez que a dieta C consegue aumentar o volume das gónadas e ao mesmo tempo garantir que os ouriços-do-mar não madurem.

Sabe-se que os fatores ambientais e processos fisiológicos afetam a absorção dos lípidos, assim como o seu armazenamento, mais do que a dieta em si (Dincer and Cakli, 2007; Martinez-Pita *et al.*, 2010; Arafa *et al.*, 2012; Siliani *et al.*, 2015). Estudos prévios avaliaram a variação dos níveis de lípidos nas gónadas dos ouriços-do-mar, ao longo do tempo. Mas os resultados têm contrastado uns com os outros (Dincer and Cakli, 2007; Martinez-Pita *et al.*, 2010; Arafa *et al.*, 2012), tornando difícil obter conclusões inequívocas. No entanto, sabe-se que, com o avanço do estado de maturação, as gónadas ficam repletas de espermatozoides e oócitos, conferindo uma característica peculiar na composição dos lípidos no tecido gonadal (Siliani *et al.*, 2015). Martinez-Pita *et al.* (2010) sugerem que, os níveis elevados de lípidos, durante os estádios de crescimento dos gâmetas, e o seu decréscimo, durante a maturação dos mesmos, indica-nos que os lípidos são usados também como fonte de energia. Possivelmente por este motivo, os indivíduos alimentados com a dieta C (milho e espinafres) foram os que se apresentavam, na sua maioria, nos estádios iniciais (I a III). Mas, foram também os que apresentaram níveis mais altos de lípidos. O elevado desvio-padrão na quantificação dos lípidos das gónadas de *P. lividus*, alimentados com

a dieta C (milho e espinafre), resultou provavelmente da presença de indivíduos que estavam na fase II (crescimento) e III (pré-maturação), onde as gónadas contêm níveis elevados de reservas (Hughes *et al.*, 2006; Siliani *et al.*, 2015).

Em suma, os factos apontam para a hipótese de após um período de jejum, ser possível manipular o desenvolvimento gametogénico de *P. lividus*, em cativeiro, através do alimento (Yokota *et al.*, 2002; Fabbrocini *et al.*, 2012; Fabbrocini *et al.*, 2015; Sartori *et al.*, 2015). O milho e o espinafre mostraram ter um ótimo desempenho no aumento do volume das gónadas, proporcionaram os estágios pretendidos para o consumo dos ouriços-do-mar, além de ter sido a dieta menos consumida. Além disso, verificou-se que as macroalgas são essenciais para enriquecer as dietas formuladas, devido à sua composição bioquímica (Basuyaux *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 2002). O agar mostrou ser um ingrediente chave no retardamento da maturação dos ouriços-do-mar e um ótimo agente gelificante/ligante dos ingredientes da dieta. Poderá ser uma boa aposta desenvolver futuramente uma ração comercial de alta qualidade e baixo custo, baseada na mistura de milho e espinafres, em conjunto com algas e vegetais, homogeneizados e incorporados em agar, (Basuyaux *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 2002; Fabbrocini *et al.*, 2012; Silva, 2012; Sartori *et al.*, 2015).

5. Considerações finais

Este estudo permitiu conhecer o comportamento reprodutivo da população de *Paracentrotus lividus* na zona Oeste de Portugal, em Peniche. Desta forma, foi possível perceber quais as alturas mais adequadas para a captura deste recurso, com vista ao seu consumo imediato, assim como para o acondicionamento de reprodutores, ou para se realizar o acabamento das gónadas, em cativeiro. Assim sendo, concluiu-se que a melhor altura para capturar os ouriços-do-mar, para consumo das gónadas, é nos meses em que a temperatura média da água começa a aumentar. No período em que este estudo foi realizado, correspondeu aos meses de janeiro, fevereiro e março/2016. Em todo o caso, é necessário ter em conta que o período de captura poderá variar ligeiramente, em função dos fatores ambientais (temperatura e fotoperíodo), que poderão diferir de ano para ano. A população em estudo apresentou duas épocas de postura: a primeira de junho a agosto e a segunda em novembro. Nestes meses é desaconselhável a captura de ouriços-do-mar.

Além disso, verificou-se que o uso de novas fontes alimentares, nas rações para ouriços-do-mar, parecem ser bastante promissoras, quer a nível biológico, como a nível económico. Quer a ração formulada em laboratório (Dieta B), quer o uso de vegetais terrestres frescos (Dieta C) mostraram ser bem aceites pelos organismos, não se tendo registado nenhuma mortalidade ao longo da experiência. Tendo em conta os resultados obtidos, neste e noutros trabalhos (com o uso de milho e espinafres), a introdução de vegetais pode ser a alternativa auspiciosa. Contudo, será necessário encontrar os ingredientes que melhor respondam às necessidades nutricionais dos organismos. Para chegar à ração adequada, será necessário compreender as necessidades nutritivas das diferentes fases do ciclo reprodutivo dos ouriços-do-mar, de forma a conseguir manipulá-las em cativeiro, de acordo com o objetivo desejado.

Futuramente, a investigação passará possivelmente mais pela avaliação do uso de espessantes/agentes ligantes na formulação de dietas húmidas ou extrudidas. Assim como, pela avaliação das características sensoriais das gónadas (cor, paladar e textura) dos indivíduos alimentados com uma dieta específica e, conseqüentemente, a sua aceitabilidade por parte dos consumidores.

Além disso, a investigação do estado das populações naturais será importante e determinante, para apostar nos ouriços-do-mar como um recurso pesqueiro ou de Aquacultura, com relevância económica. Para isso serão necessários mais estudos no âmbito da distribuição espacial, dinâmica populacional, padrões de migração, crescimento, biologia reprodutiva, produção secundária, dieta alimentar e relações tróficas, ao longo das diferentes estações do ano, entre outros. A criação de novos

projetos científicos direcionados para esta espécie, poderá contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas, quer para fins comerciais, quer em termos de repovoamento, para recuperar o bom estado das populações de ouriços-do-mar, se assim for necessário.

Referências bibliográficas

- Abraham, E. R., (2007). Sea-urchin feeding fronts. *Ecological Complexity*,4, 161-168.
- Addis, P., Moccia, D. and Secci, M. (2015). Effect of two different habitats on spine and gonad colour in the purple sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Ecology*, 36(2), 178-184.
- Agatsuma, Y. and Kawai, T., 1997. Seasonal migration of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus* in Oshoro Bay of southwestern Hokkaido, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 63, 557–562
- Agnetta, D., Bonaviri, C., Badalamenti, F., Scianna, C., Vizzini, S. and Gianguzza, P. (2012). Functional traits of two co-occurring sea urchins across a barren / forest patch system. *Journal of Sea Research*, 76, 170–177.
- 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. and Abreu, A. D. (2001). Algal cover and sea urchin spatial distribution at Madeira Island (NE Atlantic). *Scientia Marina*, 65(4), 383-392.
- Andrew, N. L., Agatsuma, Y., Ballesteros, E., Bazhin, A. G., Creaser, E. P., Barnes, D. K. A., Botsford, L. W., Bradbury, A., Campbel, A., Dixon, J. D., Einarsson, S., Gerring, P.K., Hebert, K., Hunter, M., Hur, S.B., Johnson, C. R., Juinio-Menez, 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. and Xiaoqi, Z. (2002). Status and management of world sea urchin fisheries. *Oceanography and Marine Biology-An Annual Review*, 40, 343–425.
- Arafa, S., Chouaibi, M., Sadok, S. and 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*. doi:10.1100/2012/815935.
- Azzolina, J. F. (1987). Evolution à long terme des populations de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* dans la baie de Port-Cros (Var, France). In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. *GIS Posidonie Publication, Marseille*, 257–269.
- Azzolina, J. F. (1988). Contribution à l'étude de la dynamique des populations de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lmck.) : croissance, recrutement, mortalité, migrations. Thèse Doctoral, Université Aix-Marseille 2.
- Barnes, D. and Crook, A. (2001). Quantifying behavioural determinants of the coastal European sea-urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine biology*, 138(6), 1205-1212.

- Bayed, A., Benrha, A. and Guillou, M. (2005). The *Paracentrotus lividus* populations from the northern Moroccan Atlantic coast: growth, reproduction and health condition. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85, 999–1007.
- 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(3), 233-247.
- Benedetti-Cecchi, L., Bulleri, F. and Cinelli, F. (2000). The interplay of physical and biological factors in maintaining mid-shore and low-shore assemblages on rocky coasts in the north-west Mediterranean. *Oecologia*. 123, 406–417.
- Benedetti-Cecchi, L., Bulleri, F. and 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.
- Bernárdez, C., Freire, J. and González-Gurriarán, E. (2000). Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (north-west Spain). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80, 95–102.
- Bertocci, I., Dominguez, R., Freitas, C. and 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.
- Bertocci, I., Domínguez, R., Machado, I., Freitas, C., Domínguez Godino, J., Sousa-Pinto, I., Gonçalves, M. and Gaspar, M. (2014). Multiple effects of harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. *Fisheries Research*, 150, 60-65.
- Binyon, J. (2013). Physiology of water vascular system and the neural control of locomotion, in *Physiology of Echinoderms: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology Zoology* (Vol. 49). Elsevier. 124-146.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Bodnar, A. (2013). Proteomic profiles reveal age-related changes in coelomic fluid of sea urchin species with different life spans. *Experimental Gerontology*, 48(5), 525-530.
- Boudouresque, C. F. and Verlaque, M. (2007). Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 37, 243-285.
- Brusca, R. C. and Brusca, G. J. (2003). Phylum Echinodermata. In *Invertebrates*. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts, 836-871
- Burke, R. D., Angerer, L. M., Elphick, M. R., Humphrey, G. W., Yaguchi, S., Kiyama, T., Liang, S., Mu, X., Agca, C., Klein, W. H., Brandhorst, B. P., Rowe, M., Wilson, K., Churcher, A. M., Taylor, J. S., Chen, N., Murray, G., Wang, D., Mellott, D., Olinski, R., Hallböök, F., Thorndyke, M. C. and Brandhorst, B. P. (2006). A genomic view of the sea urchin nervous system. *Developmental Biology*, 300 (1), 434-460.

- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104, 275-289.
- Burke, E., Olabarria, C., Incera, M. and Troncoso, J. S. (2010). Do grazers prefer invasive seaweeds? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 393, 182–187.
- Carboni, S. (2013). Research and development of hatchery techniques to optimise juvenile production of the edible Sea Urchin, *Paracentrotus lividus*. Doctoral thesis, University of Stirling, United Kingdom.
- Carboni, S., Hughes, A. D., Attack, T., Tocher, D. R., and 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(2), 376-382.
- Castro, J. J. (2004). Predação humana no litoral rochoso alentejano: caracterização, impacte ecológico e conservação. *Tese de Doutoramento. Universidade de Évora, Portugal*.
- Catoira, J. L. (1995). Spatial and temporal evolution of the gonad index of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in Galicia, Spain. *Echinoderm Research*, 295.
- Cellario, C. and Fenaux, L. (1990). *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): parameters of growth observed two years following metamorphosis. *Aquaculture*, 84: 173–188.
- Cook, E. J. and Kelly, M. S. (2007) Effect of variation in the protein value of the red macroalga *Palmaria palmata* on the feeding, growth and gonad composition of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquaculture*, 270, 207–217.
- Crapp, G. B., and Willis, M. E. (1975). Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck), with notes on the reproductive cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20(2), 157-178.
- Dance, C. (1987). Patterns of activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the bay of Port-Cros (Var, France, Mediterranean). *Marine Ecology*, 8(2), 131-142.
- 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.
- Domínguez, R., Godino, J. D., Freitas, C., Machado, I. and Bertocci, I. (2015). Habitat traits and patterns of abundance of the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), at multiple scales along the north Portuguese coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, (155), 47-55.
- Ebert, T. A. (2007). Growth and survival of post-settlement sea urchins. In *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, Second Edition, John M. Lawrence (Eds.), 95-134. Amsterdam.

- Fabbrocini, A., Volpe, M. G., Di Stasio, M., D'Adamo, R., Maurizio, D., Coccia, E. and Paolucci, M. (2012). Agar-based pellets as feed for sea urchins (*Paracentrotus lividus*): rheological behaviour, digestive enzymes and gonad growth. *Aquaculture Research*, 43(3), 321-331.
- Fabbrocini, A., Volpe, M. G., Coccia, E., D'Adamo, R., and Paolucci, M. (2015). Agar-based Biocomposites slow down Progression in the Reproductive Cycle Facilitating Synchronization of the Gonads of Reared Specimens of *Paracentrotus lividus*. *International Journal of Aquaculture and Fishery Sciences*, 1 (2): 035-041. DOI: 10.17352/2455, 8400(035), 5-25.
- FAO (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, Rome. ISBN 978-92-5-107225-7
- Fenaux, L. (1968). Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *A. lirula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (Echinides) à Villefranche-sur-Mer. *Vie Milieu*, 19 1-52.
- Ferguson, J. C. (1970). An autoradiographic study of the translocation and utilization of amino acids by starfish. *The Biological Bulletin*, 138(1), 14-25.
- Fernandez, C. (1998) Seasonal changes in the biochemical composition of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a Lagoonal Environment. *Marine Ecology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–11, 1998.
- Fernandez, C. and Galtagirone, 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., Feral, J.P., Roux, M. (Eds.), *Echinoderms through Time*, Balkema Publishers, Rotterdam, 655–660.
- 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., and Pergent, G. (1998). Effect of different formulated diets and rearing conditions on growth parameters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Shellfish Research*, 17, 1571-1582.
- Fernandez, C., Caltagirone, A. and Johnson, M. (2001). Demographic structure suggests migration of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a coastal lagoon. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81: 361–362
- Fernandez, C. and Boudouresque, C. F. (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., and Mouillot, D. (2006). Effect of an exceptional rainfall event on the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) stock and seagrass distribution in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68 (1), 259-270.

- Fernandez, C., Pasqualini, V., Johnson, M., Ferrat, L., Caltagirone, A. and Boudouresque, C.F. (2003) Stock evaluation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a lagonal environment. In: Féral, J.P., David, B. (ed.) *Echinoderm research 2001*. Lisse: AA Balkema, 319–323.
- 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.
- Frantzis, A. and Grémare, A. (1992). Ingestion, absorption and growth rates of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different macrophytes. *Marine Ecology Progress Series*, 95: 169–183.
- Gago, J., Range, P. and Luís, O. (2003). Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. In: Féral JP, David B (eds) *Echinoderm research 2001*. AA Balkema, Lisse, 269–276.
- Gianguzza, P., Bonaviri, C. and Guidetti, P. (2009). Crushing predation of the spiny star *Marthasterias glacialis* upon the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 156.
- Giese, A. C., (1959). Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annual Review of Physiology*, 21, 547-576.
- Girard, D., Clemente, S., Toledo-Guedes, K., Brito, A., and Hernández, J. C. (2012). A mass mortality of subtropical intertidal populations of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: analysis of potential links with environmental conditions. *Marine Ecology*, 33(3), 377-385.
- González-Irusta, J. M., Goñi de Cerio, P. and Canteras, J. C. (2010). Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (northern Spain): environmental effects. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90 (4), 699-709.
- Grosjean, P., Spirlet, C. and 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.
- Guettaf, M. and San Martín, G. A. (1995). Etude de la variabilité de l'indice gonadique de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinidae) en Méditerranée nord-occidentale. *Vie Milieu* 45 (2): 129–137.
- Guidetti, P., Terlizzi, A., and Boero, F. (2004). Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fisheries Research*, 66(2), 287-297.
- Guillou, M., Lumingas, L. J. L. and Michel, C. (2000). The effect of feeding or starvation on resource allocation to body components during the reproductive cycle of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 245, 183–196.

- Hasegawa, S., Ura, K., Tanaka, H., Ojima, T. and Takagi, Y. (2012). Purification and biochemical characterization of a cellulase from the digestive organs of the short-spined sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fisheries Science*, 78 (5), 1107-1115.
- Haya, D., (1990). Biología y ecología de *Paracentrotus lividus* en la zona intertidal. *Tesis doctoral Universidad de Oviedo*, Espanha.
- Haya, D. and Régis, M. B. (1995). Comportement trophique de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea) soumis à six régimes alimentaires dans des conditions expérimentales. *Mésogée* 54: 35–42.
- 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.
- Hereu, B., Zabala, M, Linares, C. and Sala, E. (2004). Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Marine Biology*. 144, 1011-1018.
- Hughes, A. D., Kelly, M. S., Barnes, D. K., Catarino, A. I., and Black, K. D. (2006). The dual functions of sea urchin gonads are reflected in the temporal variations of their biochemistry. *Marine Biology*, 148(4), 789-798.
- Jacinto, D. and Cruz, T. (2012). *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) attachment force and burrowing behavior in rocky shores of SW Portugal. *Zoosymposia*. (7), 231–240.
- Jacinto, D., Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., and 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*, DOI 10.1007/s00227-013-2166-z.
- James, P. and Siikavuopio, S. I. (2011). A guide to the sea urchin reproductive cycle and staging sea urchin gonad samples. *Nofima*. ISBN, 978-82.
- James, P. and 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.
- Kaneko, I., Ikeda, Y. and Ozaki, H. (1981). Biometrical relations between body weight and organ weights in freshly sampled and starved sea urchin *Strongylocentrotus pulcherrimus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Kawamata, S. (1998). Effect of wave-induced oscillatory flow on grazing by a subtidal sea urchin *Strongylocentrotus nudus* (A. Agassiz). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 224: 31–48.
- Kelly, J. R., Krumhansl, K. A. and Scheibling, R. E. (2012). Drift algal subsidies to sea urchins in low-productivity habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 452, 145-157.

- Killian, C. E., Metzler, R. A., Gong, Y. U. T., Olson, I. C., Aizenberg, J., Politi, Y., Wilt, F. H., Scholl, A., Young, A., Doran, A., Kunz, M., Tamura, N., Coppersmith, S. N. and Gilbert, P. U. P. A. (2009). Mechanism of calcite co-orientation in the sea urchin tooth. *Journal of the American Chemical Society*, 131(51), 18404-18409.
- Lawrence, A. L., Watts, S. A. and Lawrence, J. M. (2007). Feeding, digestion, and digestibility. In: Lawrence, J.M. (ed.) *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. Elsevier Press, 135-158.
- 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., Plank, L. F. and Lawrence, A. L. (2003). The effect of consumption frequency on consumption of food, absorption efficiency, and gonad production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134A: 69–75
- Lawrence, J., Régis, M. B., Delmas, P., Gras, G. and Klinger, T. (1989). The effect of quality of food on feeding and digestion in *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 15: 137–144.
- Langston, W. J, Burt, G. R, Chesman, B. S. and Vane, C. H. (2005) Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 1–31
- Le Gall, P., Bucaille, D. and Dutot, P. (1989) Résistance aux variations de salinité chez *Paracentrotus* et *Psammechinus*. *Vie Mar HS*, 10, 83–84.
- Lepage, G., Roy, C.C., (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research* 27:114-120.
- 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.
- Levitan, 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.
- Lopes, E. M. and Ventura, C. R. (2012). Morphology and gametic compatibility of color morphs of *Paracentrotus gaimardi* (Echinodermata: Echinoidea). *Invertebrate Biology*, 131(3), 224-234.
- Mai, K., Mercer, J. P., and Donlon, J. (1996). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. V. The role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition. *Aquaculture*, 139(1), 77-89.

- Marsh, A. G., Powell, M. L. and Watts, S.A. (2013). Biochemical and Energy Requirements of Gonad Development. In: Lawrence, J.M. (ed.) *Sea urchins: Biology and Ecology*. Elsevier Press, 45-54.
- Marsh, J. B. and Weinstein, D. B., (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research* 7:574-576.
- Mamede, N. M. G. (2014). Relações ecológicas entre ouriços-do-mar e os seus predadores e presas no sudoeste de Portugal Continental. Dissertação de mestrado da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora.
- Martinell, J. 1981. Actividad erosiva de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) en el litoral gerundense. *Oecologia Aquatica*. 5, 219-225.
- Martinez-Pita, I., Garcia, F.J. and Pita, M. L., 2010. The effect of seasonality on gonad fatty acids of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata:Echinoidea). *Journal of Shellfish Research*. 29(2), 517-525. doi: 10.2983/035.029.0231.
- Masood, A., Stark, K. D. and Salem, N., (2005). A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *Journal of Lipid Research* 46:2299-2305
- McBride, S. C. (2005) Sea urchin aquaculture. In: American Fisheries Society Symposium. American Fisheries Society, 179.
- McPherson, B. F. (1968). Feeding and digestion in the tropical sea urchin *Eucidaris tribuloides*. *Biology Bulletin*, 135: 308–320.
- Narvaez, C. A., Johnson, L. E. and Sainte-Marie, B. (2016). Growth bands are an unreliable indicator of sea urchin age: evidence from the laboratory and the literature. *Limnology and Oceanography: Methods*. 14(8), 527-541.
- Okada, Y., Iwata, K. S. and Yanagihara, M. (1984). Synchronized rhythmic contractions among five gonadal lobes in the shedding sea urchin: coordinative function of the aboral nerve ring. *Biology Bulletin*, 166: 228–236.
- Ouréns, R., Fernández, L. and Freire, J. (2011). Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 158, 793 – 804.
- Ouréns, R., Flores, L., Fernández, L. and Freire, J. (2013). Habitat and density dependent growth of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in Galicia (NW Spain). *Journal of Sea Research*, 76, 50–60.
- Pais, A., Chessa, L. A., Serra, S., Ruiu, A., Meloni, G. and Donno, Y. (2007). The impact of commercial and recreational harvesting for *Paracentrotus lividus* on shallow rocky reef sea urchin communities in North-western Sardinia, Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(3), 589-597.
- Pais, A., Serra, S., Meloni, G., Saba, S. and Ceccherelli, G. (2012). Harvesting effects on *Paracentrotus lividus* population structure: a case study from northwestern Sardinia, Italy, before and after the fishing season. *Journal of Coastal Research*, 28: 570-575.

- Palacín, C., Giribet, G. and Turon, X. (1997) Patch recolonization through migration by the echinoid *Paracentrotus lividus* in communities with high algal cover and low echinoid densities. *Cahiers de Biologie Marine Journal*, 38: 267–271.
- Pearce, C. M., Daggett, T. L., and Robinson, S. M. (2004). Effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 233 (1), 337-367.
- Pearce, C. M., Daggett, T. L. and Robinson, S. M. C. (2002). Effect of binder type and concentration of prepared feed stability and gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 205,301-323.
- Pearse, J. S., Pearse, V. B. and Davis, K. K. (1986) Photoperiod regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology*, 237, 107–118.
- Pearse, J. S. and Cameron, R. A. (1991). Echinodermata: Echinoidea. In: Giese, A. C., Pearse, J. S., Pearse, V. B. (eds) *Reproduction of Marine Invertebrates Volume VI Echinoderms and Lophophorates*. 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 the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73(03), 513-530.
- Pérez, A. F., Boy, C., Morriconi, E. and Calvo, J. (2010). Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Polar Biology*, 33(3), 271-280.
- 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.
- 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.
- Roa, G. (2003) Historical Development of the sea urchin industry in Chile. In *Sea Urchin 2003: abstracts from International Conference on Fisheries and Aquaculture*. Puerto Varas, Chile, 25–27, 13.
- Ruscoe I. M., Jones C. M., Jones P. L. and Caley P. (2005). The effects of various binders and moisture content on pellet stability of research diet for freshwater crayfish. *Aquaculture Nutrition*, 11,87-93.
- Sala, E. (1997). Fish predators and scavengers of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in protected areas of the north-west Mediterranean Sea. *Marine Biology* 129: 531–539
- Sala, E. and Zabala, M. (1996). Fish predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 140: 71– 81.

- Sánchez-España, A. I., Martínez-Pita, I. and García, F. J. (2004). Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia*, 519 (1-3), 61-72.
- 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, (6)1214– 1221.
- Sartori, D., Pellegrini, D., Macchia, S., and 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.
- Siliani, S., Melis, R., Loi, B., Guala, I., Baroli, M., Sanna, R., Uzzau, S., Roggio, Addis, M. F. and Anedda, R. (2016). Influence of seasonal and environmental patterns on the lipid content and fatty acid profiles in gonads of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* from Sardinia. *Marine Environmental Research*, 113, 124-133.
- Silva, P. M. L. D. (2012). Crescimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* em viveiro na zona costeira da Ericeira, Portugal. Tese de mestrado, Biologia (Ecologia Marinha) da Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Portugal.
- Shepherd, S. A. and Boudouresque, C. F. (1979). A preliminary note on the movement of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Travel Science Parc Nation Port-Cros* 5: 155–158
- Schlosser, S. C., Lupatsch, I., Lawrence, J. M., Lawrence, A. L., and 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 (10), 972-982.
- Shpigel, M., McBride, S. C., Marciano, S. and Lupatsch, I. (2004). The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 232: 342–355
- Spirlet, C, Grosjean P. and Jangoux M (1998)a. Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of maturity index. *Invertebrate Reproduction Development* 34: 69-81.
- Spirlet, C., Grosjean, P. and Jangoux, M. (1998)b. 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. and 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. and Jangoux, M. (2001). Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquaculture Nutrition*, 7(2), 91-100.

- Stadniczeňko, S. G., Pedersen, M. F., Christie, H., Fredriksen, S., and Norderhaug, K. M. (2016). Are skeletal ossicles in echinoids unreliable chronometers? Reply to Russell and Narváez comment on "Population dynamics of *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology*, 163(7), 1-2.
- Sun, J., and Chiang, F. S. (2015). Use and Exploitation of Sea Urchins. *Echinoderm Aquaculture*, 25-45.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 11, 107–184.
- Tomas, F., Romero, J. and Turon, X. (2004). Settlement and recruitment of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in two contrasting habitats in the Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 282, 173-184.
- Tomšić, S., Conides, A., Dupčić Radić, I. and Glamuzina, B. (2010). Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). *Acta Adriat*, 51(1), 67 – 77.
- Tomšić, S., Conides, A. J., and Aničić, I. (2015). Growth and gonad changes in stony sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) Fed artificially formulated feed and benthic macrophyte diet. *Nase More*, 62(2), 85-90.
- Walker, C. W., and Lesser, M. P. (1998). Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Marine Biology*, 132(4), 663-676.
- Walker, C. W., Unuma, T. and Lesser, M. P. (2007). Gametogenesis and Reproduction of Sea Urchins. In: Lawrence, J.M. (ed.), *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, Elsevier Science, 11-33.
- Walker, C. W, McGinn, N. A., Harrington, L. M. and Lesser, M. P. (1998) New perspectives on sea urchin gametogenesis and their relevance to aquaculture. *Journal of Shellfish Research*, 17: 1507–1514.
- Walker, C. W., Harrington, L. M., Lesser, M. P. and Fagerberg, W. R. (2005) Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. *Biology Bulletin*, 209: 31–48
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Bouquegneau, J. M., Jangoux, M., and Dubois, P. (1995). Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *Science of the Total Environment*, 171(1), 95-99.
- Wasson, K. M. and Watts, S. A. (2007). Endocrine regulation of sea urchin reproduction. In: Lawrence, J.M. (ed.) *Edible Sea urchins: Biology and Ecology*. Elsevier Press, 55-67.
- Yokota, Y., Matranga, V. and Smolenicka, Z. (2002). The sea urchin from basic biology to aquaculture. A.A. *Balkema*, Lisse, 231

- Young, C. M. and Chia, F. S. (1987) Abundance and distribution of pelagic larvae as influenced by predation, behaviour, and hydrographic factors. In: Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B. (ed.) *Reproduction of marine invertebrates IX. General aspects: seeking unity in diversity*. Palo Alto, CA: *Blackwell Scientific Publications*, 385-463.
- Young, C. M., Tyler, P. A. and Fenaux, L. (1997) Potential for deep-sea invasion by Mediterranean shallow water echinoids: pressure and temperature as stage-specific dispersal barriers. *Marine Ecology Progress Series*, 154, 197–209.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis*. 5th edn. *Practice Hall, New Jersey*, 226-244.

Anexos

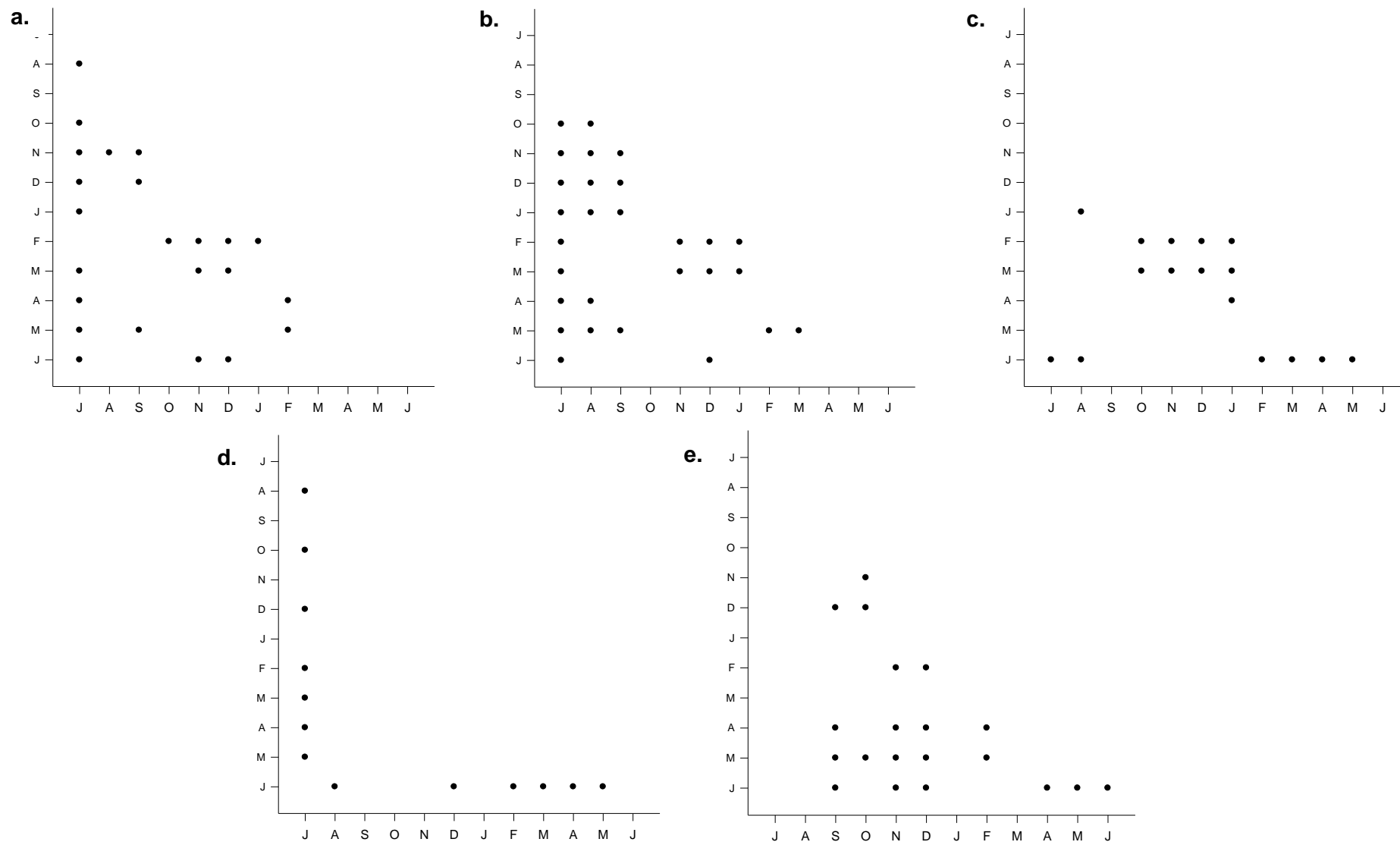


Figura 1 – Diferenças estatisticamente significativas nos 12 meses de amostragem (julho de 2015 a junho de 2016) do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, capturados na praia do Abalo (Peniche, Portugal), relativamente a: **a.** diâmetro da carapaça (cm); **b.** peso médio individual (g); **c.** peso das gónadas; **d.** índice gonadosomático; **e.** diâmetro dos oócitos (µm) .

Tabela 1 – Variação dos parâmetros físico-químicos da água dos sistemas de cultivo de *Paracentrotus lividus*, durante o período de ensaio experimental de avaliação dos efeitos de 3 dietas no desenvolvimento das gónadas.

	T° C	O₂ (ppm)	O₂(%)	Salinidade	pH	Amónia	Nitritos
A	20,45	5,94	82,42	37,00	8,01	0,02	0
B	20,48	5,95	82,06	37,01	8,01	0,02	0
C	20,45	5,96	81,82	37,05	8,01	0,02	0
Média	20,46	5,95	82,10	37,02	8,01	0,02	0
DP	0,02	0,01	0,30	0,03	0,00	0,00	0