



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

Crescimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* no litoral rochoso de Portugal continental e em aquacultura em sistema aberto.

Maria Inês Leal Pessoa

Orientador(es) | David Jacinto

Évora 2023



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

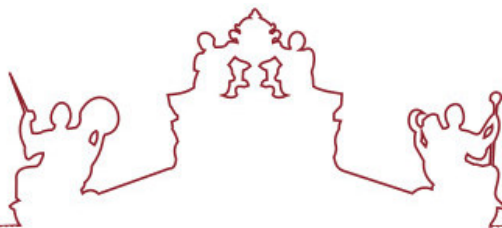
Dissertação

Crescimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* no litoral rochoso de Portugal continental e em aquacultura em sistema aberto.

Maria Inês Leal Pessoa

Orientador(es) | David Jacinto

Évora 2023



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Paulo Sá-Sousa (Universidade de Évora)

Vogais | David Jacinto (Universidade de Évora) (Orientador)
Sílvia Alexandra Pereira Lourenço (Instituto Politécnico de Leiria) (Arguente)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Doutor David Jacinto, pela orientação, apoio, paciência e disponibilidade, não só na elaboração desta dissertação, mas também a nível pessoal.

À Beatriz Ferreira, a parceira de vida. Obrigada por todo apoio, conversas e tabitati, por alinhares comigo em todas as aventuras. Acima de tudo, por nunca me deixares desistir e me fazeres sempre sonhar cada vez mais. Palavras que não chegam para ti.

Ao CIEMAR (Laboratório de Ciências do Mar da Universidade de Évora) e ao Projeto Ouriceira Mar, por todo o apoio imprescindível para a realização deste trabalho.

À Marta Mamede, à Daniela Jesus e à Célia Castelo, por não me deixarem ter medo de arriscar. Obrigada por todas as gargalhas e momentos fantásticos, que nos fazem pensar fora da caixa. Não são de sempre, mas ficam para sempre.

Ao André Costa, pelas conversas e imagens e inspiradoras, pela ajuda e empenho, pelas poucas, mas incríveis viagens de barco e por todos os sorrisos.

Ao Francisco Neves, por todo o apoio quer no trabalho de campo, como laboratorial e por toda ajuda e momentos de partilha.

Ao Francesco Maresca e David Mateus, pela transmissão de tantos ensinamentos e pela integração na equipa de trabalho.

Ao João Castro, pelo altruísmo e prontidão a encontrar tema para a minha dissertação e pela hospitalidade no laboratório do CIEMAR.

À Teresa Silva e Susana Celestino, pelo fantástico trabalho enquanto skippers da embarcação do CIEMAR e pela prontidão em esclarecer dúvidas e ajudar. À Cristina Espírito Santo, pela partilha de conhecimentos e preocupação constante.

Agradeço em especial à minha Lucy, por todo o apoio no trabalho e a nível pessoal, por me fazeres acreditar em mim e nunca me deixares baixar os braços. À minha mãe e ao meu pai, que estão sempre lá em todos os momentos, nem que seja para me fazer ver que amanhã também é dia e podemos errar de vez em quanto que o mundo não vai abaixo. À melhor madrinha deste mundo, por nunca me deixar desamparada e festejar comigo cada conquista. À família do coração, pela adoção e por estarem sempre prontos a construir mil e uma coisas comigo, deixam sempre memórias felizes. E aos restantes familiares, por todo o apoio.

Às minhas besties, que estiveram sempre presentes para desabafos e partilhas, mesmo longe estão perto.

Aos meus fiéis patudos, Pucca e Soja, que me confortaram em todos os momentos e nunca me deixaram sozinha.

Por último, um obrigada a todos os que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização desta dissertação.

Crescimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* no litoral rochoso de Portugal Continental e em aquacultura em sistema aberto

Resumo

O crescimento em ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* varia consoante os fatores bióticos e abióticos do meio. O estudo teve como objetivo a caracterização do processo de crescimento através da sua variação entre habitats (poças-de-maré e canais), épocas do ano (inverno e verão) e dieta fornecida em aquacultura (algas, vegetais, ração peletizada e sem tratamento com e sem calceína). No terreno, os ouriços-do-mar foram marcados com calceína, recapturados após dois a quatro meses e foi feito o registo do diâmetro (mm), peso (g) e do comprimento da mandíbula (mm). Em aquacultura foi testada a influência de quatro tratamentos dietéticos no crescimento de ouriços-do-mar. Os resultados *in situ* sugeriam que não existe variação de crescimento entre habitats, e que este é significativamente superior no verão. Em aquacultura, o crescimento não variou entre tratamentos. Esta dissertação destaca a importância de estudos de crescimento que contribuam para a conservação desta espécie, em Portugal Continental.

Palavras-chave: Ouriço-do-mar; Crescimento; Aquacultura; Dieta; Calceína

Growth of the sea urchin *Paracentrotus lividus* on the rocky coast of the Alentejo, Portugal, and in open system aquaculture.

Abstract

The growth in sea urchins *Paracentrotus lividus* varies according to the biotic and abiotic factors of the environment. This study aimed to characterize the growth process, through its variation between habitats (tide pools and channels), seasons (winter and summer) and diet provided in aquaculture (algae, vegetables, pelleted feed and without treatment, with and without calcein). In the field, sea urchins were calcein-labelled, recaptured after two to four months and its diameter (mm), weight (g) and length of the mandible (mm) were registered. In aquaculture, the influence of four dietary treatments on the growth of sea urchins was tested. The in situ results suggested that there is no variation in growth between habitats, and that growth is significantly higher in summer. In aquaculture, growth did not vary between treatments. This dissertation highlights the importance of carrying out growth studies that contribute to the conservation of this species in mainland Portugal.

Keywords: Sea urchin; Growth; Aquaculture; Diet; Calcein

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	<i>Paracentrotus lividus</i>	1
1.2.	Crescimento	3
1.4.	Objetivos	11
2.	Materiais e métodos	12
2.1.	Área de estudo	12
2.2.	Experiência piloto	13
2.3.	Experiência de crescimento <i>in situ</i>	15
2.4.	Experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura)	17
3.	Resultados	23
3.1.	Experiência piloto	23
3.2.	Experiência de crescimento <i>in situ</i>	24
3.3.	Experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura)	27
4.	Discussão	30
4.1.	Experiência piloto	30
4.2.	Experiência de crescimento <i>in situ</i>	31
4.3.	Experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura)	34
5.	Conclusão	37
6.	Referências bibliográficas	40

Índice de figuras

Figura 1 - Anatomia do ouriço-do-mar.....	1
Figura 2 - Habitats de ocorrência de ouriços-do-mar, <i>Paracentrotus lividus</i>	2
Figura 3 - Ouriço-do-mar marcado com contas.	6
Figura 4 - Etiquetas de âncora T-bar.....	6
Figura 5 - Inserção de uma T-bar, na região aboral.	6
Figura 6 - Etiquetas com fios codificados, CWT.	6
Figura 7 - Etiquetas transponder integradas passivas, PIT.	6
Figura 8 - Injeção com fluorocromo, na região oral.	6
Figura 9 - Gónadas de ouriço-do-mar, <i>Paracentrotus lividus</i>	7
Figura 10 - Área de estudo. A : localização da área de estudo em Portugal Continental; B : Cabo Raso, em Cascais, onde decorreu a experiência piloto; C : Cabo de Sines e Porto de Sines, em Sines, onde decorreram a experiência in situ e a experiência em ambiente artificial, respetivamente. Realizado no software QGis.	12
Figura 11 - Relação entre o diâmetro da carapaça (mm) e o peso total (g) dos ouriços-do-mar, <i>P. lividus</i> , estabelecida através dos dados do projeto "Ouriceira Mar" (Jacinto et al., 2021). 13	13
Figura 12 – Observação da marca de calceína presente na mandíbula da lanterna de Aristóteles, à lupa de epifluorescência, e medição do comprimento máximo inicial da mandíbula (Mi), aquando da marcação, e do comprimento máximo final da mandíbula (Mf), após a recaptura.	14
Figura 13 - Relação entre o comprimento da mandíbula (mm) e o diâmetro da carapaça (mm) dos ouriços-do-mar, <i>P. lividus</i> , estabelecida através dos dados do projeto "Ouriceira Mar" (Jacinto et al., 2021).....	15
Figura 14 - Quadrado (35x35 cm), que delimita o território a amostrar.....	16
Figura 15 - Representação esquemática do método de marcação química, através de injeção com calceína (100 mg/L), pela membrana periestomal.	16
Figura 16 - Marcação química, com injeção de calceína (100 mg/L), <i>in situ</i>	16
Figura 17 - Representação esquemática da jangada de aquacultura (CIEMAR), localizada no Porto de Sines.	18
Figura 18 - Jangada de aquacultura (CIEMAR), localizada no Porto de Sines.	18
Figura 19 - Representação esquemática da distribuição das jaulas, com os respetivos tratamentos, na jangada de aquacultura.	19
Figura 20 - Colocação das jaulas, com amarrações, na jangada de aquacultura.	19
Figura 21 - Jaula utilizada na experiência de crescimento em ambiente artificial.	20
Figura 22 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> , por classe dimensional, em cada um dos habitats estudados na experiência piloto.....	24

Figura 23 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> , por estação do ano e por classe dimensional, em cada um dos habitats estudados na experiência de crescimento <i>in situ</i>	26
Figura 24 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> em canal, por estação do ano, na experiência de crescimento <i>in situ</i>	26
Figura 25 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> em poças-de-maré, por estação do ano, na experiência de crescimento <i>in situ</i>	26
Figura 26 - Diâmetro real final (mm) de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> sem tratamento, marcados com calceína (ST) e sem marcação (STSC), na experiência de crescimento em ambiente artificial.	28
Figura 27 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> , por réplica, em cada um dos tratamentos estudados na experiência de crescimento em ambiente artificial.	29

Índice de tabelas

Tabela 1 - Volume (ml) ideal de solução de calceína (100mg/L), para marcar cada classe dimensional de <i>P. lividus</i> . Os indivíduos têm diâmetro da carapaça (Dt) em C1 de [10, 20[mm, em C2 de [20, 30[mm, em C3 de [30, 40[mm, em C4 de [40, 50[mm), em C5 de [50, 60[mm, em C6 de [60, 70[mm, em C7 de [70, 80[mm, em C8 de [80, 90[mm e em C9de [90, 100[mm.	13
Tabela 2 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> marcados, por réplica, em cada habitat estudado na experiência piloto.	23
Tabela 3 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> marcados, por estação do ano e réplica, em cada habitat estudado na experiência de crescimento in situ.	25
Tabela 4 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> marcados, por estação do ano e réplica, em cada habitat estudado na experiência de crescimento in situ.	25
Tabela 5 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar <i>P. lividus</i> marcados, por réplica, em cada um dos tratamentos estudado na experiência de crescimento em ambiente artificial.....	27
Tabela 6 - Teste PERMANOVA ao efeito do tratamento (fator fixo com 5 níveis: Algas, Pellets, Sem Tratamento, Vegetais e Campo) no crescimento mensal médio (mm) do ouriço-do-mar <i>P. lividus</i> . Fator aleatórios réplica (Re) aninhado ao fator tratamento (Tr) n=4. Análise com base no coeficiente de similaridade de distância Euclidiana de dados não transformados. Valores obtidos usando 9999 permutações aleatórias. Legenda: g.l. – graus de liberdade; MQ – média dos quadrados. Diferenças significativas assinaladas a negrito ($p<0,05$).	29

1. Introdução

1.1. *Paracentrotus lividus*

O ouriço-do-mar roxo, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), é uma espécie de equinoderme da família Parachinidae (Kroh & Mooi, 2021). Os ouriços-do-mar são constituídos por tecidos moles e estruturas duras (Figura 1). Os tecidos moles, que se encontram no interior da carapaça, englobam essencialmente as cinco gónadas, o trato digestivo, intestinal e respiratório (Sugni et al., 2013). As estruturas duras que constituem o esqueleto, em forma globular no *P. lividus*, englobam os ossículos unidos por colagénio que formam a carapaça, os espinhos (curtos e com coloração variada em *P. lividus*, como verde, violeta, esbranquiçada, acastanhada) e a lanterna de Aristóteles (Padilla et al., 2014; Boudouresque & Verlaque, 2020). Esta última, é composta pelo aparelho mastigatório, que contém cinco mandíbulas e dentes, tendo como finalidade a trituração de alimentos e construção de tocas (ouriceiras) (Sugni et al., 2013). Para se fixar e deslocar no substrato, *P. lividus* apresenta um sistema hidrovascular (ou ambulacrário) que, por meio da circulação de água por poros, permite a retração ou expansão dos pés-tubulares ambulacrais (em forma de cilindro basal) (Santos et al., 2005).

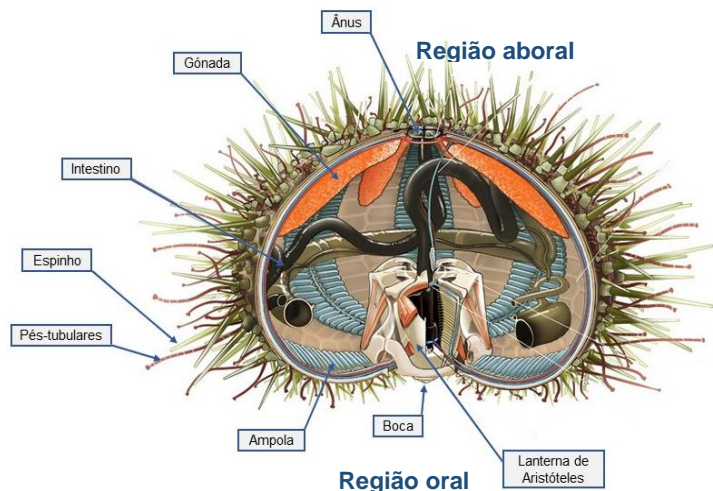


Figura 1 - Anatomia do ouriço-do-mar.
(Fonte: Abiogenesis)

A distribuição atual desta espécie abrange todo o mar Mediterrâneo e a costa este do Atlântico Norte, ocorrendo em locais onde, no inverno, a temperatura da água varie entre os 10 °C e os 15 °C, e, no verão, ronde os entre 18 °C e os 25 °C (Lawrence, 2013; Boudouresque & Verlaque, 2020). *P. lividus* é uma espécie bentónica (que vive associado ao substrato em ambiente marinho) comum no litoral rochoso, distribuindo-se em habitats de intertidal (poças-de-maré e canais) e no subtidal pouco profundo (até 20 metros (m) de profundidade) (Figura 2) (Jacinto et al., 2013; Lawrence, 2013; Boudouresque & Verlaque, 2020).

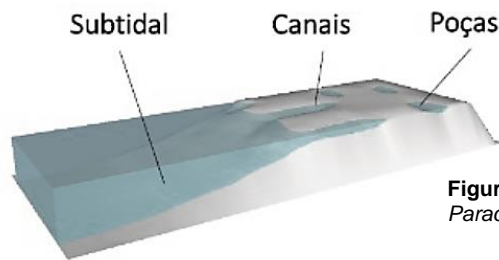


Figura 2 - Habitats de ocorrência de ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus*. (Fonte: Jacinto et al., 2021)

A densidade e abundância de indivíduos desta espécie é variável entre habitats, tendo sido observada a existência de um maior número de indivíduos de menores dimensões em poças-de-maré (aproximadamente 200 indivíduos por metro quadrado (m^2)), enquanto que em canais e no subtidal pouco profundo (entre 5 e 8 m de profundidade) se pode verificar que a densidade de indivíduos é menor (aproximadamente 30 indivíduos por m^2), sendo estes de maiores dimensões (Jacinto & Cruz, 2012; Jacinto et al., 2013; Jacinto et al., 2021). Também, podem ocorrer em agregações localizadas, onde a densidade é mais elevada (1600 indivíduos por m^2), justificadas como estratégia de defesa contra predadores, um comportamento alimentar ou de desova (Boudouresque & Verlaque, 2020).

P. lividus pode ser considerado um engenheiro do ecossistema, visto que em habitats pouco profundos (poças-de-maré e canais) com maior exposição à atividade das ondas (Witman & Dayton, 2001), existe a necessidade da criação de tocas (bioerosão), onde vivem temporária ou permanentemente (Boudouresque & Verlaque, 2020). Estas tocas, construídas por ação dos dentes (responsáveis pela escavação das tocas) e espinhos (modificação contínua da toca, de acordo com o tamanho do indivíduo) (Trudgill et al., 1987), servem, também, para proteção contra predadores (Boudouresque & Verlaque, 2020).

Esta espécie de ouriço-do-mar é essencialmente herbívora, considerada oportunista generalista, com alimentação seletiva (Boudouresque & Verlaque, 2020). Esta designação surge do facto de ser uma espécie com grande capacidade de se adaptar às alterações do ecossistema (e.g. condições ambientais, disponibilidade de alimento, predação) (Lawrence, 2013; Boudouresque & Verlaque, 2020). A seletividade advém da capacidade adaptativa de *P. lividus*, podendo alterar a “preferência” alimentar (acabando por se alimentar de alimentos menos preferidos) de acordo com a época do ano ou com abundância de alimento que tem à disposição, não tendo ainda sido demonstrado com que padrão esta seletividade acontece (Gago et al., 2003; Boudouresque & Verlaque, 2020). Este comportamento de forrageio promove o equilíbrio na estrutura e densidade de populações de algas e comunidade vegetal (Bulleri et al., 1999; Hereu et al., 2005; Boudouresque & Verlaque, 2020). Desta forma, é possível realçar a importância ecológica destes animais para o funcionamento geral do ecossistema, na organização e funcionalidade de comunidades bentónicas e ao nível de produtores primários (distribuição de macrófitos – e.g. macroalgas) (Fernandez et al., 2001; Boudouresque & Verlaque, 2020).

1.2. Crescimento

Em termos morfológicos, o crescimento em ouriços-do-mar representa o aumento da massa (medida em gramas (g)) e do diâmetro (medido em milímetros (mm)) e alteração da forma da carapaça, por efeito da expansão e calcificação de estruturas duras e produção de tecidos moles (Ebert, 2013; Padilla et al., 2014). As estruturas duras (carapaça, espinhos e lanterna de Aristóteles) são compostas por calcite com quantidade variável em magnésio (consoante a idade do organismo e a temperatura da água) e por uma matriz orgânica que permite a sua calcificação (Ebert, 2013; Padilla et al., 2014; Asnaghi et al., 2019). O crescimento somático nestes animais é baseado em processos celulares que proporcionam o incremento, por calcificação, de camadas de calcite, magnésio e matriz orgânica às estruturas duras do esqueleto do ouriço-do-mar, permitindo o aumento dimensional das mesmas (Ebert, 2013).

P. lividus é uma espécie onde se regista maiores taxas de crescimento em indivíduos juvenis (até ~30 mm), que crescem mais rapidamente, e menores taxas de crescimento em adultos (Padilla et al., 2014; Asnaghi et al., 2019; Boudouresque & Verlaque, 2020). Pode verificar-se um crescimento mensal médio (CMM) de 1,2 mm em indivíduos com diâmetros inferiores a 20 mm e de 0,3 - 0,5 mm para indivíduos de maiores dimensões (Jacinto et al., 2021).

A inibição de processos fisiológicos como a alimentação, digestão e respiração, entre outros, influencia diretamente o crescimento do ouriço-do-mar (Grosjean et al., 2003). Desta forma, o processo de crescimento em ouriços-do-mar depende essencialmente de fatores como o alimento disponível, a temperatura da água e do desenvolvimento reprodutivo (Tomšić et al., 2010; Boudouresque & Verlaque, 2020). A quantidade e qualidade do alimento disponível afeta diretamente as taxas de crescimento, sendo estas mais reduzidas em condições de escassez do mesmo ou quando este é de fraca qualidade (Levitan, 1991; Turon et al., 1995; Tomšić et al., 2010; Ebert, 2013; Ouréns et al., 2013; Asnaghi et al., 2019; Boudouresque & Verlaque, 2020). Relativamente à temperatura da água, um aumento da mesma dá origem à aceleração do metabolismo do organismo, permitindo que a digestão do alimento ingerido seja feita mais rapidamente, e ao aumento das concentrações de magnésio, que favorecem a calcificação das estruturas duras do esqueleto. Assim, o aumento da temperatura da água em algumas épocas do ano (nomeadamente, no fim da primavera, verão e início do outono, em Portugal Continental) promove um crescimento mais rápido, ou seja, a obtenção de taxas de crescimento mais elevadas (Tomšić et al., 2010; Ouréns et al., 2013; Padilla et al., 2014; de Casamajor et al., 2017; Boudouresque & Verlaque, 2020). Quanto ao desenvolvimento reprodutivo, o crescimento somático não ocorre de forma linear, visto que antes da desova o organismo concentra a maior parte da sua energia na maturação das gónadas e não no crescimento corporal. Após este evento o processo de crescimento aumenta significativamente (Turon et al., 1995; Tomšić et al., 2010; Padilla et al., 2014; Boudouresque & Verlaque, 2020).

Para além dos fatores descritos anteriormente, verifica-se que outros fatores ambientais e biológicos também podem influenciar indiretamente o processo de crescimento, como o hidrodinamismo, a predação e a competição interespecífica, e o habitat. Relativamente ao hidrodinamismo, é de realçar que em locais ou épocas de intensa atividade das ondas, os indivíduos despendem de mais energia para a fixação ao substrato, locomoção, proteção, manutenção e reparação das estruturas duras do corpo e alimentação. Desta forma, é notória a diminuição nas taxas de crescimentos (Turon et al., 1995; Ouréns et al., 2013; de Casamajor et al., 2017). No que diz respeito à predação e à competição interespecífica, pode notar-se que quando a sua pressão é superior, as taxas de crescimento são menores, uma vez que é necessário maior gasto energético para a proteção contra predadores, o que faz com que os indivíduos permaneçam mais tempo em tocas, diminuindo a ingestão de alimento, ou em processos de competição com outras espécies (Ouréns et al., 2013; Cruz et al., 2015; de Casamajor et al., 2017). Em relação ao tipo de habitat e às suas características, o crescimento dos indivíduos pode ser significativamente afetado. Em áreas pouco profundas (e.g. canais e subtidal pouco profundo) o crescimento dos ouriços-do-mar é mais evidente, por se verificar uma maior disponibilidade de alimento e de território, menor pressão predatória e interespecífica, estando os indivíduos menos suscetíveis a grandes períodos de emersão (variações do nível da água) e de intensa atividade das ondas, bem como a flutuações de temperatura da água e salinidade. Por outro lado, em zonas de águas rasas (e.g. poças-de-maré), onde se observa a existência de indivíduos de menores dimensões, advém das características destes habitats (menor disponibilidade de alimento, maior predação e competição, maiores períodos de emersão, maior exposição à atividade das ondas e a grandes flutuações de temperatura da água e salinidade), não potenciarem taxas de crescimento mais elevadas (Trudgill et al., 1987; Turon et al., 1995; Gago et al., 2003; Ouréns et al., 2013; de Casamajor et al., 2017; Jacinto et al., 2021).

Para melhor compreender de que forma varia o crescimento dos ouriços-do-mar, tornou-se necessário desenvolver estratégias para monitorizar e identificar estes indivíduos. Alguns dos estudos de estimativas de crescimento em ouriços-do-mar foram realizados a partir da identificação das linhas de crescimento, nas mandíbulas presentes na lanterna de Aristóteles (formadas por deposição de calcite, magnésio e matriz orgânica) (Turon et al., 1995; Gago et al., 2003). Estas linhas são visíveis por terem elevada densidade e por serem formadas em épocas de crescimento intensivo (Moore, 1935; Lozano et al., 1995). No entanto, a proximidade das mesmas ou a sua aparência translúcida (e.g. por aumento dos níveis de stress), resultou numa sobrestimação da idade ou na medição incorreta do crescimento (Turon et al., 1995; Padilla et al., 2014). Por forma a solucionar estas questões que podem originar resultados dúbios, desenvolveram-se técnicas de captura e recaptura com o auxílio de marcadores de crescimento. Assim, tornou-se possível monitorizar os ouriços-do-mar libertados após a captura e estudar outros parâmetros para além taxas de crescimento, tais como a sobrevivência, a abundância populacional, as interações predador-presa, a maturidade populacional, os processos e padrões de movimento, o uso de habitat

e as respostas a mudanças ambientais (Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022). De forma a analisar qual o melhor marcador a utilizar, é necessário ter em conta que o método deve ser o menos invasivo possível (por forma a não afetar o crescimento e locomoção dos indivíduos), apresentar taxas de sobrevivência e retenção da marcação elevadas (para posterior recuperação e estudo das amostras marcadas), ser detetável e facilmente identificável nos indivíduos marcados, de rápida aplicação e de baixo custo (Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022).

O estudo de métodos de marcação física (diretamente inserida no corpo) e química (com fluorocromos) em ouriços-do-mar tem sido realizado desde a década de 1960 (Ebert, 2013). Relativamente aos métodos de marcação física, já foram testadas diversas etiquetas externas, algumas colocadas nos espinhos dos ouriços-do-mar (e.g. tubos de plástico, contas, pintura com esmalte ou tinta anti-incrustante) (Figura 3). Contudo, as mesmas apresentam baixas taxa de retenção (ou durabilidade), podendo afetar a sobrevivência, locomoção e comportamento dos animais (Agatsuma et al., 2000; Ebert, 2013; Cipriano et al., 2014; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022). Outras etiquetas inseridas externamente, através de perfuração do corpo do ouriço-do-mar já foram utilizadas, no entanto este método demonstrou ter influência negativa no crescimento, sobrevivência e locomoção dos indivíduos, para além de ser invasivo e apresentar baixas taxas de retenção e elevadas taxas de mortalidade (Tuya et al., 2004; Zeng et al., 2007; Ebert, 2013). Para além destas, as etiquetas de âncora T-bar (Figuras 4 e 5) também já foram testadas como método de marcação externa, sendo possível fazer a identificação individual, porém por apresentarem tamanhos consideráveis, podem afetar o comportamento dos ouriços-do-mar (Sandford et al., 2020; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022).

Para além destes métodos de marcação física, existem estudos, realizados em ouriços-do-mar desde o final da década de 1990 de etiquetas com fios codificados (CWTs) (Figura 6) e etiquetas transponder integradas passivas (PIT) (Figura 7) (Ebert, 2013). As CWTs consistem em pequenos fios de inoxidável magnetizado com uma sequência numérica (única para cada indivíduo), inseridos no interior da cavidade corporal (carapaça) do ouriço-do-mar. Este método requer que a identificação do código seja feita a microscópio e que haja sacrifício animal, não permitindo leituras repetidas ao longo do tempo (Ebert, 2013; Gianasi et al., 2015; Sandford et al., 2020; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022). As PIT correspondem a microchips biocompatíveis e encapsulados em vidro com uma bobina eletromagnética, que fornecem um código alfanumérico individual único, implantados internamente na carapaça e detetados de forma não invasiva por radiofrequência (Rogers-Bennett et al., 2003; Gibbons & Andrews, 2004; Acolas et al., 2007). Este método apresenta taxas de sobrevivência e de retenção elevadas, permitindo leituras repetidas ao longo do tempo. Contudo o crescimento dos ouriços-do-mar é afetado e, por outro lado, é inadequada a sua implementação em indivíduos de menores dimensões (Woods & James, 2005; Ebert, 2013; Cipriano et al., 2014; Sandford et al., 2020; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022;).

Nos métodos de marcação químicas com fluorocromos (tetraciclina ou calceína), os indivíduos são expostos ao fluorocromo (e.g. por imersão ou injeção) (Figura 8), que se liga a iões de cálcio,

sendo incorporado no momento de calcificação das estruturas duras do esqueleto do animal, deixando uma linha de crescimento detetável (em estruturas calcificadas da lanterna de Aristóteles) sob iluminação ultravioleta (tetraciclina em amarelo e calceína a verde) (Ellers & Johnson, 2016; Haag et al., 2013; Johnson et al., 2013; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022). Este método, ainda que não permita a identificação individual, é acessível, simples e eficaz em marcações em massa, permitindo obter dados de crescimento individual, estrutura da população e história de vida (Ellers & Johnson, 2016; Gianasi et al., 2015; Cruz et al., 2015; Santos et al., 2022). A utilização de calceína verifica-se mais vantajosa, por ser um fluorocromo menos tóxico, com fluorescência mais intensa e mais facilmente absorvido em relação à tetraciclina (Monaghan, 1993; Santos et al., 2022).



Figura 3 - Ouriço-do-mar marcado com contas. (Fonte: Cipriano et al., 2014)

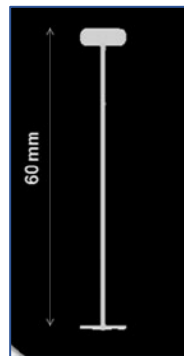


Figura 4 - Etiquetas de âncora T-bar. (Fonte: Rodríguez-Barreras & Sabat, 2015)



Figura 5 - Inserção de uma T-bar, na região aboral. (Fonte: Tourón et al., 2022)

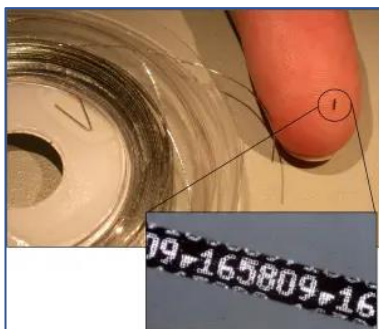


Figura 6 - Etiquetas com fios codificados, CWT. (Fonte: NMT)



Figura 7 - Etiquetas transponder integradas passivas, PIT. (Fonte: Rodríguez-Barreras & Sabat, 2015)



Figura 8 - Injeção com fluorocromo, na região oral. (Fonte: Paredes & Costas, 2020)

Em geral, as etiquetas mais invasivas e de aplicação física/externa, devem ser evitadas por apresentarem taxas de retenção, sobrevivência e crescimento baixas, para além de apenas serem viáveis em indivíduos maiores (Ebert, 2013; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022). Gradualmente, estas técnicas têm deixado de ser tão utilizadas devido ao seu impacto negativo nos indivíduos e por consequência da redução dos custos dos métodos químicos (Padilla et al., 2014). Deste modo, destacam-se métodos de injeção e imersão com fluorocromos, por permitirem marcar um grande número de indivíduos rapidamente (até mesmo debaixo de água), e por não apresentarem limitações de tamanho quanto aos indivíduos a serem marcados (Ebert, 2013; Padilla et al., 2014; Tourón et al., 2022). Este método pode, também, ser detetado mesmo em linhas de incremento de crescimento muito finas ou em casos de crescimento nulo, quando há reabsorção e transformação

da calcite das linhas de crescimento adicionadas nas estruturas duras do esqueleto do animal, por forma a reduzir os custos energéticos de manutenção destas estruturas (Märkel, 1979; Levitan, 1991; Ebert, 2013).

Em estudos com *P. lividus*, os métodos de captura e recaptura com marcação química com calceína demonstram ser favoráveis para estudar a estrutura de crescimento das populações e idade dos indivíduos em habitat natural (Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022).

1.3. Recurso explorável

Enquanto recurso explorável, o produto principalmente explorado do ouriço-do-mar são as gónadas (“ovas”) (Figura 9), altamente apreciadas para fins gastronómicos e com alto valor comercial (Andrew et al., 2002; Bertocci et al., 2014). Assim, várias espécies comestíveis são pescadas para fins comerciais, aumentando a pressão antrópica nas populações selvagens (Agatsuma & Momma, 1988; Gianguzza et al., 2006; Bertocci et al., 2014).



Figura 9 - Gónadas de ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus*. (Fonte: Terence Chea, Associated Press)

P. lividus é uma das espécies de ouriço-do-mar comestíveis, sendo França e Espanha os principais países consumidores deste recurso, embora o consumo em menor escala e a apanha para exportação do mesmo, ocorra, ou tenha ocorrido, numa área maior (e.g. Itália, Grécia, Irlanda, Portugal, Croácia) (Boudouresque & Verlaque, 2020). Na zona sudoeste da costa portuguesa, a apanha é feita intensivamente de forma artesanal e lúdica, em determinados períodos do ano, por um número reduzido de apanhadores que desempenham esta prática em habitats de intertidal e subtidal pouco profundo (Guiomar, 1997; Castro, 2004; Mamede, 2014; Boudouresque & Verlaque, 2020). Na costa norte de Portugal Continental, a apanha é feita para fins comerciais, de forma a suplementar mercados de regiões próximas, como Espanha, onde a intensa captura de *P. lividus* tem provocado drásticas reduções das populações selvagens (Bertocci et al., 2014). Em 2018, foram capturadas em Portugal cerca de 170 toneladas (t) (peso fresco) de ouriço-do-mar, valorizadas em 273.000 euros. Estes valores não abrangem as capturas tradicionais, por pesca lúdica, nem todas as capturas para fins comerciais, evidenciando lacunas na gestão do recurso (sobre a apanha e comercialização), e verificando a necessidade do estudo nesta temática (Jacinto et al., 2021).

Num futuro próximo, com a procura crescente deste recurso, devido à sobrepesca, existe a possibilidade de escassez do mesmo, podendo levar à extinção da espécie (Fernandez & Pergent, 1998; Spirlet et al., 2001; Andrew et al., 2002; Bertocci et al., 2014). Desta forma, é expectável que as populações selvagens de ouriço-do-mar venham a necessitar de sistemas que otimizem a

exploração deste recurso, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias de exploração alternativas que permitam em simultâneo a conservação da espécie (Rey-Méndez et al., 2015). Neste sentido, por forma a equilibrar a procura comercial com a abundância e distribuição das populações selvagens, verifica-se a necessidade de implementação de medidas para a apanha de ouriços-do-mar, tais como: a implementação de cotas de captura e limitação de tamanho mínimo de apanha, a pesca rotativa e a aquacultura (Andrew et al., 2002; Guidetti et al., 2004; Sloan, 2020). As cotas de captura e a pesca rotativa têm como finalidade a manutenção e evolução das populações selvagens, permitindo que os ouriços-do-mar desovem mais do que uma vez antes de serem capturados e que não haja uma diminuição do tamanho e da biomassa dos indivíduos nestas populações (Guidetti et al., 2004; Ouréns et al., 2011). A aquacultura surge como estratégia alternativa à pesca de populações selvagens de ouriço-do-mar, possibilitando a exploração e estudo do recurso em cativeiro, colmatando a procura comercial do mesmo, constituindo uma das medidas de conservação da espécie e permitindo o repovoamento e restauro de populações selvagens (Vizzini et al., 2018).

A aquacultura é definida como a atividade de cultivo ou criação de organismos aquáticos (DGRM, 2018). Este cultivo pode variar consoante o regime pretendido (extensivo, semi-intensivo e intensivo), o nível de monitorização humana e tecnológica necessária no controlo das funções básicas do sistema (e.g. oxigénio, temperatura da água, gestão de resíduos, entre outras) (aberto, semifechado e fechado), o tipo de instalação e a sua localização (em terra, entremarés e zonas costeiras/mar aberto) e o tipo e a frequência da alimentação (artificial/natural e animal/vegetal) (Tidwell, 2012; Dinis & Rocha, 2021). A aquacultura pode também ser realizada em sistemas híbridos, através de: aquacultura multitrófica (cultivo simultâneo de organismos com diferentes níveis tróficos); aquaponia (cultivo de organismos aquáticos em paralelo com o cultivo de algas); e, mesocosmos (cultivo larvar de um ecossistema pelágico, que engloba fitoplâncton, zooplâncton e as larvas das espécies em cultivo) (Tidwell, 2012; Dinis & Rocha, 2021).

A aquacultura não pode ser vista como a solução final para a conservação de espécies de ouriços-do-mar, uma vez que os sistemas de exploração em regime intensivo para estes animais ainda não são amplamente desenvolvidos (Sartori et al., 2015; Lourenço et al., 2020). Esta acarreta, ainda, importantes questões ambientais, como a utilização de farinha de peixe em dietas, que afeta os *stocks* marinhos das espécies utilizadas para a obtenção da mesma, para além de facilitar a disseminação de doenças, devido à elevada densidade de animais, e acarretar problemas de poluição aquícola de origem biológica (e.g. resíduos, excrementos e restos mortais) (Sartori et al., 2015).

Por forma a possibilitar a implementação da aquacultura de ouriços-do-mar, como medida de conservação, é necessário recorrer a regimes e sistemas de exploração que a tornem uma atividade sustentável e simultaneamente ecológica. Deste modo, foram desenvolvidos diversos estudos em aquacultura (com diversos métodos de cultivo) que têm demonstrado resultados favoráveis para o aperfeiçoamento desta atividade, como: o repovoamento em habitat natural, com larvas e juvenis

(Jangoux, 1998; Tidwell, 2012; Castilla-Gavilán et al., 2018); a aquacultura em sistema aberto, em zonas de mar aberto (Fernandez, 1996; Fernandez & Caltagirone, 2020), em gaiolas imersas (Fernandez, 1996; Robinson & Colborne, 1997; Rey-Méndez et al., 2015; Vizzini et al., 2018), ou em aquacultura multitrófica (policultura com outros organismos aquáticos) (Kelly et al., 1998; Grosso et al., 2021); em regime intensivo e em sistemas fechados, com o cultivo feito ao longo de todo o ciclo reprodutivo (desde a produção de larvas até ao indivíduo adulto) (Le Gall & Bucaille, 1989; Le Gall, 1990; Grosjean et al., 1996; Spirlet et al., 2000; Mendes et al., 2019); e, em sistemas fechados, com sistema de recirculação aquícola (RAS) (Fernandez & Pergent, 1998; Sartori et al., 2015; Sartori & Gaion, 2016).

Como anteriormente referido, em termos ecológicos é aconselhável recorrer a regimes e sistemas de exploração viáveis para os indivíduos e para o ambiente que os rodeia. Através de alguns dos estudos anteriores (Grosjean et al., 1996; Fernandez & Pergent, 1998) foi possível verificar que os sistemas fechados e semifechados acarretam graves problemas ambientais (e.g. elevada quantidade de resíduos provenientes da produção), afetando o crescimento somático dos ouriços-do-mar (Fernandez & Pergent, 1998). Contrariamente, estudos em sistema aberto e regime extensivo ou semi-intensivo (Fernandez, 1996; Rey-Méndez et al., 2015; Vizzini et al., 2018; Fernandez & Caltagirone, 2020) obtêm resultados de crescimento somático em ouriços-do-mar significativos, por apresentarem uma menor densidade de indivíduos, reduzindo drasticamente o aparecimento de doenças e reduzindo o nível de stress, e por a manutenção dos processos ecológicos ser feita de forma natural, sendo o nível de oxigénio mantido estável pelas comunidades naturais de organismos fotossintéticos e os resíduos serem eliminados por processos naturais. Relativamente a instalações como jangadas e flutuadores, estas demonstram ser infraestruturas vantajosas para a aquacultura em sistema aberto, visto que acarretam baixos custos de manutenção e possuem uma grande capacidade de confinamento de vários tamanhos e densidades de ouriço-do-mar (Rey-Méndez et al., 2015). Para *P. lividus* são diversos os estudos feitos em aquacultura de sistema aberto, com recurso a gaiolas/jaulas em zonas costeiras ou mar aberto, que focam a influência da dieta no crescimento somático do ouriço-do-mar (Fernandez, 1996; Rey-Méndez et al., 2015; Vizzini et al., 2018).

Em termos ecológicos e ambientais, em aquacultura, a qualidade da dieta fornecida pode afetar não só a viabilidade dos ouriços-do-mar, como os resíduos e substâncias químicas provenientes da exploração (Sartori et al., 2015). Desta forma, é essencial a integração do estudo de dietas nas pesquisas destinadas à aquacultura de ouriço-do-mar, sendo o desafio principal a produção de dietas com baixos custos económicos e ambientais, produzidas de forma segura, sem redução da quantidade, qualidade, viabilidade e valor do produto (ouriço-do-mar) (Thorarinsdottir et al., 2011). Para tal, é necessário recorrer ao conceito de dietas sustentáveis para animais (StAnD), que integra a importância da utilização eficiente dos recursos naturais, a proteção do meio ambiente, os benefícios socioculturais, a lucratividade, a integridade ética e sensibilidade (diretamente associada a questões de bem-estar animal) (Makkar & Ankers, 2014). Atualmente, a aquacultura

de ouriços-do-mar não cumpre os requisitos de utilização de dietas sustentáveis, visto que faz uso de dietas dispendiosas, manufaturadas (e.g. ração peletizada), com ingredientes de alto custo económico e ambiental (e.g. de origem animal) (Kelly et al., 1998; George et al., 2004; McBride, 2005) e com efeitos ecologicamente prejudiciais (e.g. extração de algas em ambientes naturais) (Pearce et al., 2002; Daggett et al., 2005;). Como alternativa, surgem estudos (e.g. Vizzini et al., 2015, 2017) que recorrem aos produtos hortícolas disponíveis, por excedente de produção, como componente a integrar na dieta de *P. lividus*, demonstrando ser uma opção sustentável (com baixos custos económicos e fácil de armazenar) e ecológica (com diminuição da pressão sobre organismos marinhos) (Vizzini et al., 2018).

Na aquacultura de *P. lividus*, são diversos os estudos comparativos entre opções para otimização do crescimento somático e/ou desenvolvimento gonadal, com diferentes componentes na base das dietas fornecidas, como: alface (Vizzini et al., 2018); milho e algas/espinafres (Sartori et al., 2015); dietas artificiais de origem vegetal, animal e mista (Fernandez & Boudouresque, 2000; Fernandez & Pergent, 1998) e algas (Fernandez & Pergent, 1998); dieta artificial de origem animal e algas (Rey-Méndez et al., 2015); dietas artificiais à base de soja e alimentos mistos, algas secas e algas frescas (Spirlet et al., 2001); várias espécies de algas (Lourenço et al., 2020). Destacam-se as opções de dietas de origem animal com maior sucesso no crescimento somático do ouriço-do-mar, por apresentarem níveis proteicos mais elevados que as dietas de origem vegetal (Fernandez & Pergent, 1998; Fernandez & Boudouresque, 2000). Todavia, quando se recorre apenas a opções de origem vegetal, destacam-se as dietas com algas (Spirlet et al., 2001; Rey-Méndez et al., 2015).

Segundo Lawrence (2003), o ouriço-do-mar tem uma capacidade limitada de regular o consumo de alimento. Deste modo, é aconselhável considerar também a quantidade (Fernandez & Boudouresque, 2000) e frequência (Lawrence et al., 2003) da dieta a fornecer, visto que uma quantidade excessiva de alimentação também pode impactar negativamente a qualidade da água, as taxas de crescimento dos ouriços-do-mar e a sua sobrevivência (James & Siikavuopio, 2012). Assim, torna-se necessário planear a alimentação tendo em conta estes fatores, por forma a maximizar o crescimento e a otimizar a taxa de conversão alimentar (alimento que é utilizado diretamente para o crescimento somático) (James & Siikavuopio, 2012; Cárcamo, 2015). A “alimentação compensatória” (Jobling, 2010) surge como uma estratégia para otimizar a alimentação, reduzindo a frequência de eventos de alimentação, ao introduzir períodos de não alimentação (fome), com verificação de recuperação significativa do crescimento neste períodos. Esta estratégia tem uma dupla vantagem, primeiramente ao garantir um crescimento contínuo enquanto o consumo de alimentação é restrito (período de fome) ou reduzido, melhorando significativamente a eficiência da conversão alimentar de ouriços-do-mar em cativeiro, adicionalmente ao facto da redução da frequência de alimentação possibilitar a redução dos custos de alimentação e de mão de obra (James & Siikavuopio, 2012). No entanto, segundo McCarron et al. (2009) e James & Siikavuopio (2012), esta estratégia só é aplicável em indivíduos adultos, visto

que o metabolismo de indivíduos juvenis (com diâmetro inferior a 40 mm) é mais rápido, necessitando que o fornecimento alimentar seja mais regular, por forma a manter as taxas de crescimento.

1.4. Objetivos

Considerando as características da espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* referidas anteriormente, define-se como objetivo geral desta dissertação a caracterização do processo de crescimento na espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os objetivos específicos dividem-se entre os estudos realizados *in situ* e em ambiente artificial (aquacultura). Os objetivos específicos dos estudos *in situ* centram-se no estudo dos padrões de variação do crescimento em dois habitats do intertidal rochoso (poças-de-maré e canais) e em duas épocas do ano distintas (inverno e verão). Os objetivos específicos do estudo em ambiente artificial focam-se no estudo dos padrões de variação de crescimento em função da dieta fornecida (algas, vegetais, ração peletizada e em regime de fome).

Desta forma, na presente dissertação, foram formuladas as hipóteses que se seguem, para serem testadas:

- A taxa de crescimento mensal (mm) é superior em canais, por ser o habitat onde há uma maior disponibilidade de alimento, maior disponibilidade territorial, menos pressão intraespecífica, menos influência da atividade das ondas e menor necessidade de manutenção e reparação das estruturas duras do corpo do ouriço-do-mar, favorecendo o seu crescimento;
- A taxa de crescimento mensal (mm) é superior no verão, por ser a estação do ano em que a temperatura da água e o hidrodinamismo são mais favoráveis para o crescimento e na qual há uma maior disponibilidade de alimento;
- O tratamento dietético que proporciona taxas de crescimento (mm) superiores é à base de algas, conforme se verificou nos estudos de Rey-Méndez et al. (2015) e Spirlet et al. (2001).

2. Materiais e métodos

2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em dois setores da costa de Portugal Continental: Cascais e Sines (Figura 10). Ambos os setores costeiros estão altamente expostos ao intenso hidrodinamismo do norte atlântico, caracterizando-se pela presença de substratos rochosos e pela ocorrência de *P. lividus*.

Em cada um destes setores, foi selecionado aleatoriamente um local para o estudo de crescimento *in situ* de *P. lividus*. Em Cascais, o estudo decorreu no Cabo Raso (38°42'29.8"N, 9°29'11.2"W), destinado à montagem da experiência piloto, e, em Sines, decorreu no Cabo de Sines (37°57'46"N, 8°53'10"W), para a montagem da experiência de crescimento *in situ*. Em cada um destes locais, foram considerados dois habitats de intertidal distintos: poças-de-maré e canais (inferiores a 2 m de profundidade). Nestes locais, os trabalhos de campo decorreram entre agosto e outubro de 2021 para a experiência piloto, entre dezembro e abril de 2022 para a experiência de crescimento *in situ* de inverno, e entre junho e agosto de 2022 para a experiência de crescimento *in situ* de verão. Ainda em Sines, a experiência em ambiente artificial decorreu no Porto de Sines, na jangada de aquacultura do CIEMAR (37°56'17"N, 8°51'48"W), entre junho e agosto de 2022.

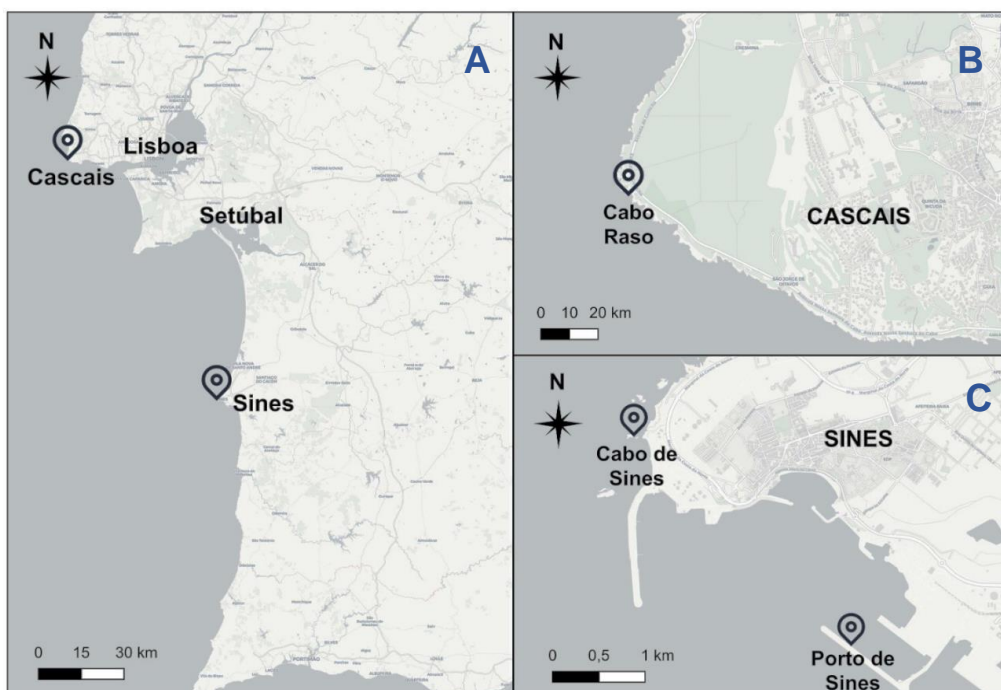


Figura 10 - Área de estudo. **A:** localização da área de estudo em Portugal Continental; **B:** Cabo Raso, em Cascais, onde decorreu a experiência piloto; **C:** Cabo de Sines e Porto de Sines, em Sines, onde decorreram a experiência *in situ* e a experiência em ambiente artificial, respetivamente. Realizado no software QGis.

2.2. Experiência piloto

A experiência piloto teve como objetivos descrever a taxa de crescimento mensal (mm) em função do diâmetro da carapaça (mm) do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, em dois habitats do intertidal rochoso (poças-de-maré e canais), e testar o método de marcação química com calceína para estudos de crescimento em ouriços-do-mar.

Apesar da calceína ser um fluorocromo com baixa toxicidade, em quantidades e concentrações elevadas pode influenciar a sobrevivência e o crescimento dos ouriços-do-mar. Desta forma, os estudos de marcação química com calceína sugerem que o volume ideal a injetar é de 0,01 mililitros (ml) por 1 grama (g) de peso vivo (Ellers & Johnson, 2016; Haag et al., 2013; Rowley & Mackinnon, 1995). Para além disso é aconselhável que a solução a injetar apresente uma concentração de 100 miligramas por litro (mg/L) (Santos et al., 2022).

Antes do início da experiência recorreu-se à base de dados (de 2019 e 2020) do projeto "Ouriceira Mar" (Jacinto et al., 2021), por forma a estabelecer uma relação entre o peso total (g) e o diâmetro da carapaça (mm) dos ouriços-do-mar (Figura 11). Através desta relação, foi possível estabelecer o volume (ml) ideal de solução de calceína (100mg/L), para marcar cada classe dimensional de *P. lividus* (Tabela 1).

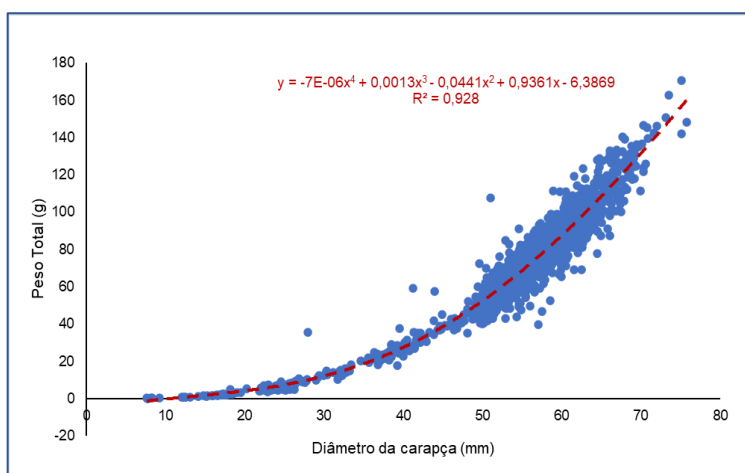


Figura 11 - Relação entre o diâmetro da carapaça (mm) e o peso total (g) dos ouriços-do-mar, *P. lividus*, estabelecida através dos dados do projeto "Ouriceira Mar" (Jacinto et al., 2021).

Tabela 1 - Volume (ml) ideal de solução de calceína (100mg/L), para marcar cada classe dimensional de *P. lividus*. Os indivíduos têm diâmetro da carapaça (Dt) em C1 de [10, 20[mm, em C2 de [20, 30[mm, em C3 de [30, 40[mm, em C4 de [40, 50[mm), em C5 de [50, 60[mm, em C6 de [60, 70[mm, em C7 de [70, 80[mm, em C8 de [80, 90[mm e em C9 de [90, 100[mm.

Classe dimensional	Diâmetro carapaça (mm)	Peso Total (g)	Volume de calceína (ml)
C1	15	1,765	0,018
C2	25	7,031	0,07
C3	35	17,587	0,176
C4	45	36,193	0,362
C5	55	63,929	0,639
C6	65	100,195	1,002
C7	75	142,711	1,427
C8	85	187,517	1,875
C9	95	228,973	2,290

Para o estudo das taxas de crescimento verão/outono do ouriços-do-mar *P. lividus*, entre habitats do intertidal rochoso (poças-de-maré e canais), foi realizada uma experiência no terreno entre agosto e outubro de 2021, tendo sido selecionado, aleatoriamente, um local no Cabo Raso – Cascais, onde é notória a presença de populações naturais de *P. lividus*. Em ambos os habitats deste local foram estabelecidas, aleatoriamente, 3 áreas de 35 por 35 centímetro (cm) (réplicas), utilizando um quadrado para delimitar o território em estudo em cada uma delas. Para localizar a delimitação destas áreas, na data de recaptura, recorreu-se a pequenas marcas de resina epoxy para assinalar os vértices do quadrado usado no terreno. Todos os ouriços-do-mar no interior do quadrado foram injetados, *in situ*, com uma solução de calceína (100 mg/L), de acordo com os dados da Tabela 1. Decorridos 71 dias após a marcação, foram recolhidos (com recurso a bicheiros) todos os ouriços-do-mar que se encontravam no interior da área previamente, delimitada pelo quadrado, bem como alguns encontrados fora do quadrado (distância máxima de 50 cm) que apresentavam marcação com calceína. Esta marcação foi detetada com recurso a uma lanterna subaquática ultravioleta (UV-FL-1 Dive Light™) e óculos com filtro amarelo (NightSea LLC, Califórnia, EUA).

No laboratório, foram registados o diâmetro (mm) e peso (g) dos ouriços-do-mar recolhidos, sendo estes posteriormente dissecados para remoção da lanterna de Aristóteles (que contém as mandíbulas). As mandíbulas foram imersas numa solução com lixívia (~4%), de forma a desintegrar eventuais tecidos moles ainda presentes e preparar as mesmas para observação à lupa de epifluorescência. Nestas estruturas, foi possível observar a marca da calceína (Mi) e medir o incremento de calcário a partir dessa marca (Figura 12).

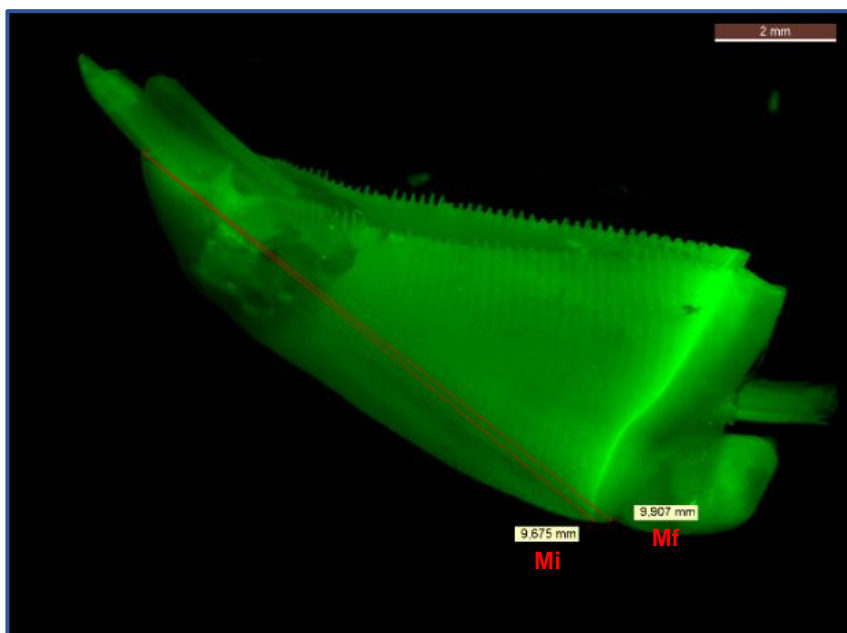


Figura 12 – Observação da marca de calceína presente na mandíbula da lanterna de Aristóteles, à lupa de epifluorescência, e medição do comprimento máximo inicial da mandíbula (Mi), aquando da marcação, e do comprimento máximo final da mandíbula (Mf), após a recaptura.

Previamente, foi estabelecida uma relação entre o comprimento da mandíbula (mm) e o diâmetro da carapaça (mm) do indivíduo, recorrendo à base de dados (de 2019 e 2020) do projeto “Ouriceira Mar” (Jacinto et al., 2021) (Figura 13).

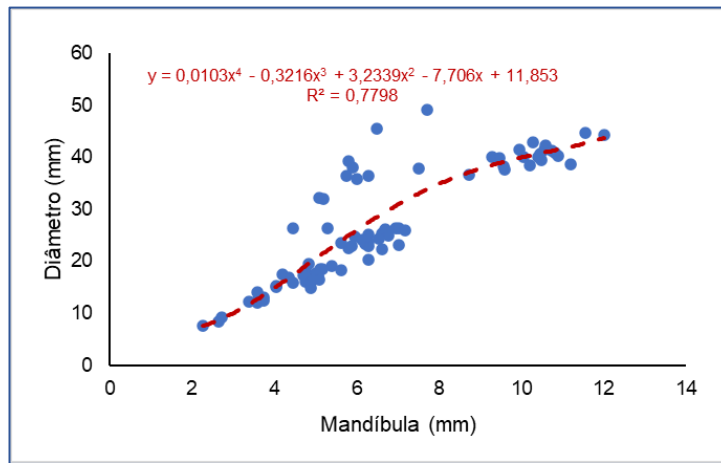


Figura 13 - Relação entre o comprimento da mandíbula (mm) e o diâmetro da carapaça (mm) dos ouriços-do-mar, *P. lividus*, estabelecida através dos dados do projeto "Ouriceira Mar" (Jacinto et al., 2021).

Utilizando a relação entre o comprimento das mandíbulas (mm) dos ouriços-do-mar recolhidos com o diâmetro da carapaça (mm) dos mesmos (Figura 13) para estimar o diâmetro inicial e final da carapaça dos indivíduos, foi possível obter o crescimento mensal médio (CMM) através da seguinte fórmula (1):

$$(1) \quad \text{CMM (mm)} = \frac{Df \text{ (mm)} - Di \text{ (mm)}}{t} \times 30 \text{ dias}$$

onde Df e Di, respetivamente, representam o diâmetro final e inicial e t o número de dias entre a marcação e a recaptura.

Para analisar a significância da diferença do crescimento médio mensal entre habitats (canais e poças-de-maré), recorreu-se ao teste de homogeneidade de variância (F-test), e, sempre que possível, ao teste de comparação de médias entre amostras independentes (T-Student). Estas análises foram realizadas com recurso ao software Rstudio e a algumas funções do Microsoft Excel®.

2.3. Experiência de crescimento *in situ*

A experiência de crescimento *in situ* realizou-se com o objetivo de estudar as taxas de crescimento em ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, em função do habitat (poças-de-maré e canais) e da época do ano (inverno e verão).

Por forma a fazer cumprir o estudo em diferentes épocas do ano, a experiência foi realizada numa primeira data, de dezembro de 2021 a abril de 2022, e, com repetição do procedimento da data anterior, a numa segunda data, de junho a agosto de 2022. Para a montagem da experiência, foi escolhido aleatoriamente um local no Cabo de Sines – Sines (37°57'46.0"N 8°53'10.1"W), com a presença de populações naturais de *P. lividus*. Neste local, em cada um dos habitats foram delimitadas aleatoriamente 4 áreas de 35 por 35 centímetros (cm) (réplicas), recorrendo a um quadrado para demarcar o território em estudo (Figura 14). Por forma a reconhecer a demarcação deste território na data de recaptura, foram assinalados no terreno os vértices deste quadrado com pequenas marcas de resina epoxy (data 1) ou parafusos (data 2) (colocados com o auxílio de um berbequim subaquático - NEMO® Hammer Drill 50 m).

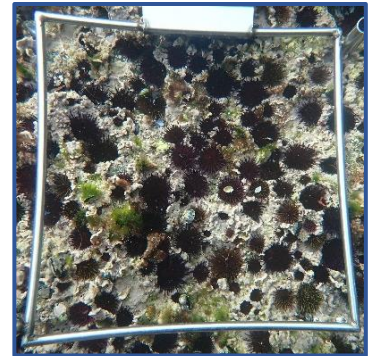


Figura 14 - Quadrado (35x35 cm), que delimita o território a amostrar.

A solução de calceína (100 mg/L) foi injetada, recorrendo a uma seringa e agulha hipodérmica (0,38 x 13 mm), pela região oral (pelo periestoma) (Figuras 15 e 16) ou pela região aboral (no caso dos indivíduos mais pequenos, sujeitos a serem partidos na maipulação), na cavidade interna de todos os ouriços-do-mar presentes no interior do quadrado, de acordo com os dados da Tabela 1.

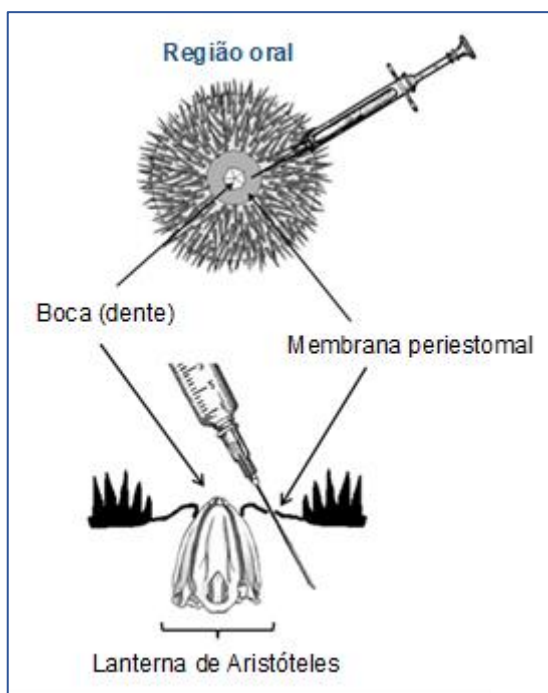


Figura 15 - Representação esquemática do método de marcação química, através de injeção com calceína (100 mg/L), pela membrana periestomal. (Fonte: adaptado de Corelab)



Figura 16 - Marcação química, com injeção de calceína (100 mg/L), *in situ*.

Aproximadamente após 116 dias da primeira data de marcação e 57 dias da segunda data, todos os ouriços-do-mar do interior da área previamente demarcada pelo quadrado foram recapturados (com recurso a bicheiros), assim como alguns adjacentes ao mesmo (distância máxima de 50 cm) que apresentassem marcação com calceína. Esta marcação foi detetada com

recurso a uma lanterna subaquática ultravioleta (UV-FL-1 Dive Light™) e óculos com filtro amarelo (NightSea LLC, Califórnia, EUA).

Em laboratório, foram registados o diâmetro (mm) e o peso (g) dos ouriços-do-mar recapturados, sendo estes posteriormente dissecados para remoção da lanterna de Aristóteles, utilizando o procedimento referido na experiência piloto. Desta forma, tornou-se possível detetar a marca da calceína (Mi) e medir o incremento de calcário a partir dessa marca (Figura 12). Por fim, através desta medição foi também obtido o crescimento mensal médio (CMM) através da fórmula (1), tendo sido estimado previamente o diâmetro inicial e final da carapaça dos ouriços-do-mar recolhidos, por meio da relação entre o comprimento das mandíbulas (mm) com o diâmetro da carapaça (mm) através da Figura 13.

Por forma a verificar se a diferença de crescimento médio mensal entre estações do ano (inverno e verão) em cada um dos habitats (canais e poças-de-maré) seria significativa, foram realizados testes de homogeneidade de variância (F-test) e, sempre que possível, a comparação de médias entre amostras independentes (T-Student). As análises em causa foram realizadas usando o software Rstudio e algumas funções do Microsoft Excel®.

2.4. Experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura)

A experiência em ambiente artificial, em aquacultura, teve como objetivo estudar os padrões de variação de crescimento em função da dieta fornecida (algas, vegetais, ração peletizada e em regime de fome).

Com o intuito de aferir o objetivo geral deste estudo, foi realizada uma experiência em aquacultura de sistema aberto e em regime semi-intensivo, com utilização de uma jangada de aquacultura (CIEMAR) como instalação principal. O fornecimento das dietas decorreu entre junho e agosto de 2022, sendo realizado uma vez por semana. Todavia, previamente, foi necessário realizar uma série de tarefas logísticas que antecederam a montagem da experiência durante o mês de maio de 2022, nomeadamente: delineamento da experiência, testagem e preparação das jaulas, testagem das jaulas na jangada, preparação das dietas (algas e vegetais), apanha de ouriços-do-mar e período de aclimatização dos mesmos.

A jangada de aquacultura onde decorreu a experiência localiza-se no Porto de Sines, e consiste numa plataforma flutuante composta por tubos de polietileno de alta densidade (PEAD), montados juntos para formar dois quadrados de 5x5 m, separados por um passadiço com 1 m (total das dimensões: 12,5x6 m; Figuras 17 e 18) (Fernandes, 2019). Esta infraestrutura é bastante utilizada em aquacultura em zonas costeiras e mar aberto, permitindo a suspensão de cordas,

lanternas ou cestos para a criação e produção de diversos tipos de organismos (Dinis & Rocha, 2021).

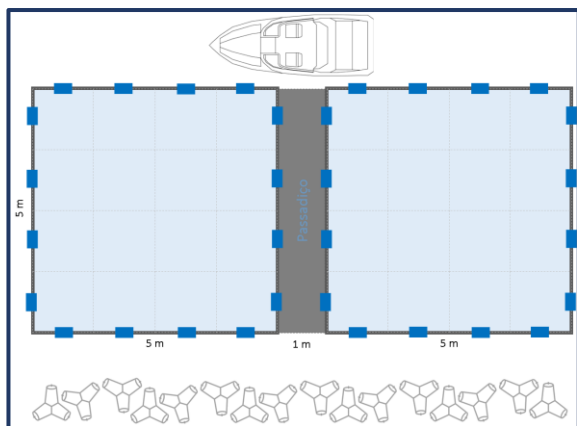


Figura 17 - Representação esquemática da jangada de aquacultura (CIEMAR), localizada no Porto de Sines.



Figura 18 - Jangada de aquacultura (CIEMAR), localizada no Porto de Sines.

A experiência foi delineada por forma a criar 4 filas de 5 jaulas, suspensas horizontalmente por dois cabos e com amarração feita à estrutura da jangada (Figuras 19 e 20). Cada uma destas jaulas continha 20 ouriços com classe dimensional C2 e C3 ($Dt = [20, 40[$ mm), recolhidos em zona de intertidal no Cabo de Sines ($37^{\circ}57'46.0''N$ $8^{\circ}53'10.1''W$). A recolha foi feita de forma manual com recurso a bicheiros e pinças e com o auxílio de craveiras para medição do diâmetro. Foram coletados cerca de 450 ouriços-do-mar para manter uma margem de abundância de indivíduos, caso a taxa de mortalidade/fuga no período de aclimatização se mostrasse muito elevada. Na experiência, foram testados 4 tratamentos dietéticos (com 4 réplicas cada), pré-estabelecidos aleatoriamente pelas 20 jaulas:

- Tratamento de vegetais (V), provenientes de desperdícios alimentares de superfícies comerciais (couve, alface, batata, cenoura, feijão-verde, abóbora, aipo, brócolos, grelos, espinafres), que teve como objetivo verificar se é possível canalizar os desperdícios humanos para outras utilizações e baixar assim os custos da exploração de ouriços-do-mar;
- Tratamento de algas (A) (das espécies *Ulva* sp., *Codium tomentosum*, *Codium intricatum*, *Stypocaulan scoparium*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Fucus guinti* e *Corallina officinalis*) pretendendo simular a alimentação natural de ouriços-do-mar, sendo manualmente recolhidas em zonas de intertidal do Cabo de Sines ($37^{\circ}57'52.6''N$ $8^{\circ}52'58.9''W$), num local onde estão presentes populações naturais de *P. lividus*;
- Tratamento de ração peletizada (P), sendo esta uma aglomeração de pequenas partículas por meio de um processo mecânico em combinação com humidade, calor e pressão (Buchanan et al., 2010). Neste caso, esta ração tem composição vegetal (farelo de soja, proteína de soja e glúten de trigo, produzida pela SPAROS (Olhão, Portugal)) e integra o estudo por forma a comparar os restantes tratamentos com um exemplo que já é utilizado atualmente em aquacultura;

- Sem tratamento (ST), surgindo como alternativa, caso seja necessária a contenção de custos no sistema de aquacultura, sendo possível analisar se terá influência no desempenho da produção. Desta forma, a ingestão de alimento é feita por absorção de partículas em suspensão e/ou do biofilme que se foi desenvolvendo na jaula;
- Sem tratamento e sem marcação com calceína (STSC), sendo este tratamento igual ao anterior. No entanto, neste caso, os ouriços-do-mar não sofreram qualquer tipo de marcação química, servindo este tratamento para controlo da influência da injeção calceína relativamente às restantes dietas.

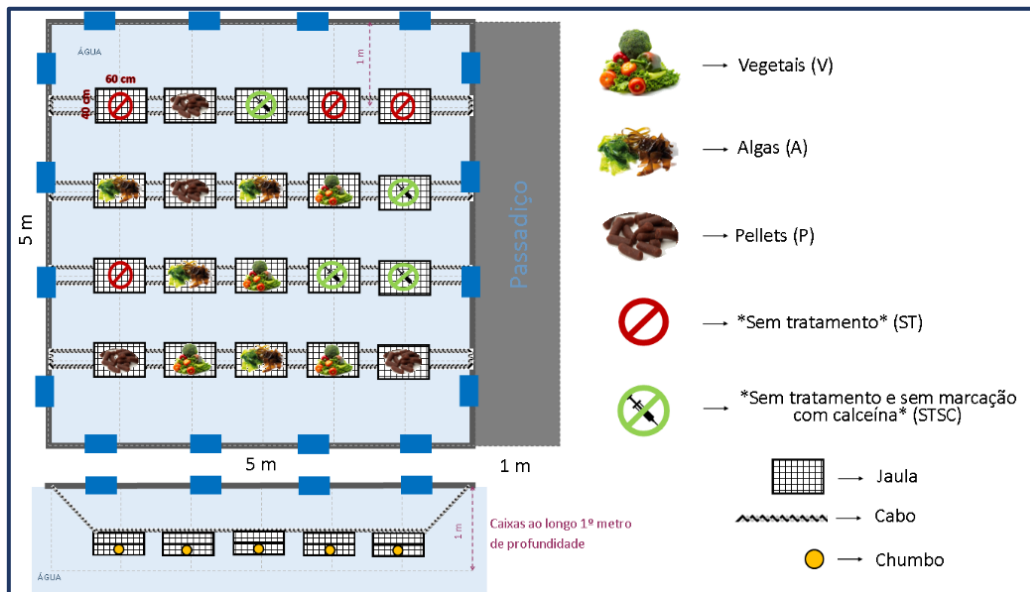


Figura 19 - Representação esquemática da distribuição das jaulas, com os respetivos tratamentos, na jangada de aquacultura.



Figura 20 - Colocação das jaulas, com amarrações, na jangada de aquacultura.

Por forma a efetuar o estudo de crescimento dos ouriços-do-mar incluídos nesta experiência, recorreu-se ao método de marcação química com solução de calceína (100 mg/L), de acordo com os dados da Tabela 1, à exceção do tratamento STSC, como foi referido anteriormente.

As jaulas utilizadas são constituídas por: um conjunto de duas caixas plásticas reutilizadas (60x40x26 cm), com um sistema de fecho feito por meio de abraçadeiras reutilizáveis; uma jaula estanque (com medidas semelhantes às caixas envolventes), construída com rede plástica de malha de 5 mm e abraçadeiras, contendo uma pequena abertura (15x10 cm) de manutenção no topo e fechada por abraçadeiras reutilizáveis; e um chumbo na base (~100 g), para manter a jaula submersa (Figura 21).



Figura 21 - Jaula utilizada na experiência de crescimento em ambiente artificial.

Antes da preparação de qualquer dieta, é necessário ter em conta que cada ouriço-do-mar ingere diariamente 2% do seu peso vivo (adaptado de Boudouresque & Verlaque, 2020). Assim sendo, e visto que o peso vivo médio de indivíduos C2 e C3 é de ~20 g, é possível obter a quantidade (g) de dieta a fornecer por semana e por réplica, de acordo com a seguinte fórmula (2):

$$(2) \quad D (g) = P (g) \times N_o \times 2\% \times 7 \text{ dias}$$

onde D é a quantidade de dieta a fornecer em gramas, por réplica e por semana, P representa o peso vivo do ouriço-do-mar em gramas e N_o é o número de ouriços-do-mar por réplica.

Desta forma, verificou-se que para uma réplica com 20 indivíduos, com um total de aproximadamente 400 g de peso vivo, é necessário fornecer semanalmente 56 g de alimento seco.

Para o tratamento com ração peletizada (P), foi apenas feita a pesagem da ração em si, visto que é alimento seco, sendo assim fornecidas semanalmente 56 g de ração peletizada por réplica. Por outro lado, para as algas (A) e vegetais (V) foi necessário proceder à secagem de porções destes mesmos tratamentos, por forma a estimar o conteúdo de água presente nos mesmos. Deste modo, foi possível estabelecer o peso húmido de alimento que deve ser fornecido, por forma a ser equivalente ao peso de ração peletizada disponibilizada.

Após a colheita das algas e tendo em conta a quantidade recolhida de cada espécie, foi estabelecida uma proporção entre as mesmas, para conceber o tratamento a fornecer, não sendo equivalente à sua abundância no local de recolha. Desta forma, foi usada a seguinte proporção: 25,1% de *Stypocaulan scoparium*; 23,6% de *Ulva* sp.; 21,0% de *Codium intricatum*; 14,7% de *Codium tomentosum*; 5,7% de *Fucus guinti*; 5,7% de *Corallina officinalis*; 4,3% de *Sphaerococcus coronopifolius*. Foram feitas 3 porções, de aproximadamente 100 g de peso húmido/escorrido (com as espécies presentes nas proporções apresentadas acima), procedendo-se à sua secagem. Quando o peso destas porções estabilizou (quando toda a água evaporou), obteve-se uma média de 23,74 g (23,74%) de peso seco do tratamento A. Assim, para perfazer as 56g de algas secas são necessárias 235,89 g de algas húmidas/escorridas, a fornecer por réplica e por semana.

Para a preparação do tratamento V, foi também essencial estabelecer uma proporção das variedades vegetais em função da quantidade obtida, dando origem à seguinte relação proporcional: 22,5% de abóbora; 16,8% de batata; 10,6% de cenoura; 10,2% de couve; 10,0% de brócolos; 8,2

% de grelos; 6,8% de feijão-verde; 5,9% de aipo; 5,9% de espinafres; 3,3% de alface. O processo de secagem para obter a quantidade de vegetais frescos em função do seu peso seco foi realizado da mesma forma que no tratamento A, obtendo-se uma média de 14,37 g (14,4%) de peso seco nas porções do tratamento V. Deste modo, para totalizar as 56 g de vegetais secos é necessário fornecer 396,70 g de vegetais frescos por réplica, semanalmente.

Para garantir que as condições das dietas fornecidas seriam as mesmas ao longo de toda a experiência, os vegetais (partidos em pedaços pequenos, ~2 cm) e as algas foram divididos e pesados, nas proporções estabelecidas para cada tratamento, e congelados em porções semanais (32 porções de 235,89 g de algas e 32 porções de 396,70 g de vegetais).

Antes do início da experiência, os 450 ouriços-do-mar capturados passaram por um período de aclimatização, sendo a ingestão de alimento feita por absorção de partículas em suspensão e/ou do biofilme que se foi desenvolvendo na jaula. Estes permaneceram no interior de duas jaulas, localizadas na Marina do Porto de Sines (37°57'01.4"N 8°51'54.9"W), durante 8 dias. No fim deste período de aclimatização, dos 450 indivíduos: 67 apresentaram lesões na carapaça ("doença do ouriço-do-mar careca", caracterizada por lesões na parede corporal, perda de espinhos, péstulares ambulacrais e perda de epiderme (Sweet, 2020)); 14 morreram; e 22 fugiram ou foram predados. Após a integração dos 400 ouriços-do-mar na experiência restaram ainda 14 indivíduos, que foram levados para laboratório, onde foi registado o seu diâmetro (mm) e peso (g), sendo dissecados para remoção da lanterna de Aristóteles (que contém as mandíbulas). Posteriormente à abertura, as mandíbulas foram imersas numa solução com lixívia (~4%), de forma a desintegrar eventuais tecidos moles ainda presentes e preparar as mesmas para observação à lupa de epifluorescência. Nestas estruturas foi possível medir o tamanho da mandíbula, servindo para estabelecer a relação com o diâmetro (Figura 13).

Após o período de aclimatização, 320 dos 400 ouriços-do-mar foram injetados com solução química de calceína e divididos pelas jaulas correspondentes aos tratamentos V, M, P e ST. Os restantes 80 ouriços-do-mar foram distribuídos pelas 4 jaulas do tratamento STSC. No momento de montagem da experiência na jangada, foi também fornecida a primeira dose de dietas pelos tratamentos que assim as incluem.

Ao longo da experiência, semanalmente, realizaram-se expedições de barco à jangada de aquacultura para fornecer aos ouriços-do-mar as dietas a ser estudadas (nos tratamentos que as incluem), garantindo que todas as jaulas estavam sujeitas ao mesmo período fora de água, por forma a garantir as mesmas condições de manuseio. Nestas expedições foram registadas as possíveis ocorrências: ao nível dos animais, se existiram fugas, morte ou sinais de predação; ao nível da alimentação, com presença de desperdícios em pouca ou elevada quantidade; ao nível do material utilizado, jaulas partidas, abertas ou rasgadas, cabos soltos ou cortos e amarrações seguras.

No término da experiência, os ouriços-do-mar foram levados para laboratório onde foram registados o diâmetro (mm) e peso (g) dos ouriços-do-mar recolhidos, sendo os mesmos posteriormente dissecados para remoção da lanterna de Aristóteles (utilizando o mesmo

procedimento dos ouriços-do-mar coletados após a aclimatização). Assim, tornou-se possível detetar a marca da calceína (Mi) e medir o incremento de calcário a partir dessa mesma marca. Por fim, através desta medição, foi também obtido o crescimento mensal através da fórmula (1), tendo sido estimado previamente o diâmetro inicial e final da carapaça dos ouriços-do-mar recolhidos, por meio da relação entre o comprimento das mandíbulas (mm) com o diâmetro da carapaça (mm) através da Figura 13. Nos ouriços sem tratamento e sem marcação com calceína (STSC), foi registada a medida total da mandíbula.

Por forma a verificar, se a marcação química com calceína tem influência significativa no crescimento dos ouriços-do-mar, isto é, se a diferença no diâmetro real final (mm) entre os tratamentos “Sem tratamento - ST” e “Sem tratamento e sem marcação com calceína - STSC” seria significativa, foram realizados, sempre que possível, testes de homogeneidade de variância (F-test) e comparação de médias entre amostras independentes (T-Student). Essas análises foram realizadas recorrendo ao software RStudio e algumas funções do Microsoft Excel®.

De forma a averiguar a existência de uma diferença significativa, entre os padrões de variação de crescimento mensal médio (mm) dos ouriços-do-mar sujeitos aos tratamentos com Algas (A), Pellets (P), Vegetais (V), Sem tratamento (ST) e Campo (dados dos indivíduos de classe dimensional C2 e C3 (Dt = [20; 40[mm) marcados *in situ* no verão, na experiência descrita em 2.3.), os dados recolhidos foram analisados utilizando técnicas de análise univariada PERMANOVA, com recurso ao software GMAV.5 for Windows (Institute of Marine Ecology, University of Sydney).

3. Resultados

3.1. Experiência piloto

Por forma a verificar o sucesso da marcação química com calceína em estudos de crescimento de ouriço-do-mar, foi registado, entre agosto e outubro de 2021, o número de indivíduos marcados no começo da experiência e o número de indivíduos recapturados marcados (Tabela 2), obtendo-se uma taxa de recaptura de ouriços-do-mar marcados *in situ* de 43%. Nas poças-de-maré, foram recapturados em média 46% dos indivíduos marcados, à semelhança do obtido em canais, onde a taxa de recaptura representou em média 42% dos indivíduos marcados. Dos ouriços-do-mar recapturados marcados, 87% encontravam-se na área de marcação (quadrado) e os restantes migraram para as imediações desta área (até 50 cm). Em poças-de-maré, a migração para as imediações da área de marcação, representou apenas 4% dos indivíduos recapturados marcados neste habitat. Nos canais, 26% dos indivíduos recapturados marcados encontravam-se nas imediações da área de marcação.

Tabela 2 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar *P. lividus* marcados, por réplica, em cada habitat estudado na experiência piloto.

Habitat	Réplica	Nº Marcados	Nº Recapturados dentro do quadrado	Nº Recapturados fora do quadrado	Nº Recapturados marcados dentro do quadrado	Nº Recapturados marcados fora do quadrado	Taxa de recaptura
Poça	1	37	29	26	15	1	43%
Poça	2	34	33		21		62%
Poça	3	34	15	26	10	1	32%
Canal	1	23	24	38	10	4	61%
Canal	2	37	16	45	7	5	32%
Canal	3	28	30	5	9		32%
TOTAL		193	147	140	72	11	43%

O crescimento médio mensal de *P. lividus* verificou-se variável entre os habitats selecionados (poça-de-maré e canal), assim como entre classes dimensionais (C1 (Dt = [10, 20[mm), C2 (Dt = [20, 30[mm), C3 (Dt = [30, 40[mm), C4 (Dt = [40, 50[mm) e C5 (Dt = [50, 60[mm)) (Figura 22). Em canais, registou-se uma variação no crescimento mensal médio nas cinco classes dimensionais, sendo este mais evidente em C2, com $1,7 \pm 0,37$ mm (média \pm erro padrão). Em poças-de-maré, a variação no crescimento mensal médio apenas se registou em indivíduos das classes dimensionais C2, C3 e C4, sendo superior em C2 com $0,5 \pm 0,14$ mm.

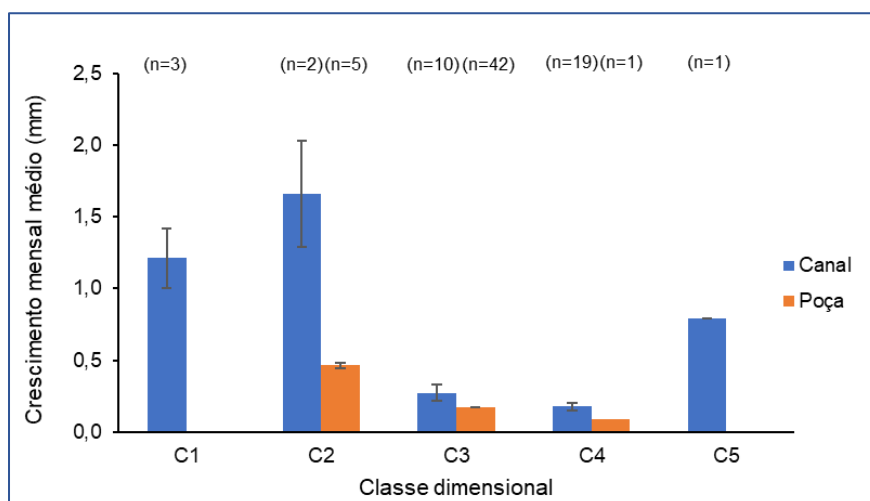


Figura 22 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar *P. lividus*, por classe dimensional, em cada um dos habitats estudados na experiência piloto.

Nas classes dimensionais C2, C3 e C4, obtiveram-se dados de crescimento mensal médio em ambos os habitats, sendo estes diferentes para canais e poças-de-maré. Para testar a significância desta diferença, apenas foram analisados, por teste de homogeneidade de variância (F-test) e teste de comparação de médias entre amostras independentes (T-Student), os dados da classe dimensional C3 dos canais (CMM = $0,3 \pm 0,06$ mm) e das poça-de-maré (CMM = $0,2 \pm 0,02$ mm), por ser a única classe bem representada. O F-test realizado sugeriu que não existiam diferenças significativas entre as variâncias dos dados de C3 para canal e para poça-de-maré ($F = 2.198$; $P > 0,05$). Desta forma, foi realizado o teste T-Student, para variâncias homocedásticas (iguais), onde os resultados sugerem que há diferenças significativas na média do crescimento mensal entre habitats para os ouriços-do-mar da classe dimensional C3 ($t = 2.0988$; $P < 0,05$).

3.2. Experiência de crescimento *in situ*

Mediante o registo do número de indivíduos marcados quimicamente com calceína no começo de cada momento da experiência (em dezembro de 2021 e em junho de 2022) e o número de indivíduos recapturados marcados (Tabela 3), foi possível verificar que se obteve um total de 22% de taxa de recaptura de ouriços-do-mar marcados *in situ*. Em poças-de-maré, foram recapturados em média 17% dos indivíduos marcados no inverno e em média 21% dos indivíduos marcados no verão. Nos canais, a taxa de recaptura dos indivíduos marcados representou em média 27% no inverno e 58% no verão. Dos 661 indivíduos recapturados marcados, foi possível verificar que 58% destes se mantiveram no local de marcação (quadrado). Nas poças-de-maré, 24% dos indivíduos recapturados marcados no inverno encontravam-se nas imediações da área de marcação (a uma distância até 50 cm), já no verão encontravam-se 18% dos indivíduos recapturados marcados. Em canais, no inverno 87% dos indivíduos recapturados marcados encontravam-se nas imediações da área de marcação, ao passo que no verão nas imediações do quadrado estavam presentes 100% dos indivíduos.

Tabela 3 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar *P. lividus* marcados, por estação do ano e réplica, em cada habitat estudado na experiência de crescimento *in situ*.

Estação do ano	Habitat	Réplica	Nº Marcados	Nº Recapturados dentro do quadrado	Nº Recapturados fora do quadrado	Nº Recapturados marcados dentro do quadrado	Nº Recapturados marcados fora do quadrado	Taxa de recaptura
Inverno	Poça	1	112	74	28	11	4	13%
Inverno	Poça	2	38	22	21	2	1	8%
Inverno	Poça	3	40	85	52	10	3	33%
Inverno	Poça	4	56	35	19	6	1	13%
Inverno	Canal	1	11	4	7	1	2	27%
Inverno	Canal	2	20	5	9	1	4	25%
Inverno	Canal	3	21		5		2	10%
Inverno	Canal	4	11		9		5	45%
Verão	Poça	1	103	58	93	18	0	17%
Verão	Poça	2	85	67	146	26	6	38%
Verão	Poça	3	44	29	46	6	5	25%
Verão	Poça	4	74	25	77	3	1	5%
Verão	Canal	1	17		14		11	65%
Verão	Canal	2	9		13		6	67%
Verão	Canal	3	6		10		4	67%
Verão	Canal	4	14		20		5	36%
TOTAL			661	404	569	84	60	22%

O crescimento médio mensal de *P. lividus*, verificou-se variável entre as duas amostragens da experiência (inverno e verão), entre os habitats selecionados (poça-de-maré e canal), assim como entre classes dimensionais (C0 (Dt = [0, 10[mm), C1 (Dt = [10, 20[mm), C2 (Dt = [20, 30[mm), C3 (Dt = [30, 40[mm), C4 (Dt = [40, 50[mm) e C5 (Dt = [50, 60[mm)) (Figura 23). No inverno, registou-se uma variação no crescimento mensal médio nas classes dimensionais C1, C2 e C3 em poças-de-maré, sendo este mais evidente em C1, com $0,2 \pm 0,08$ mm (média \pm erro padrão), e em C3, C4 e C5 em canais, destacando-se C5 com $0,5 \pm 0,17$ mm. No verão, verificou-se a variação de crescimento mensal médio em poças-de-maré nas classes dimensionais C0, C1, C2 e C3, sendo superior em C0 com $4,7 \pm 3,63$ mm, enquanto que em canais a variação ocorreu nas classes dimensionais C3, C4 e C5, evidenciando-se C5 com $0,8 \pm 0,14$ mm. Na classe dimensional C3 obtiveram-se dados de crescimento mensal médio díspares para ambos os habitats, nas duas épocas do ano. No entanto, por falta de robustez de dados, não foi possível verificar de que forma esta diferença seria significativa para a análise estatística de crescimento em função do habitat (análise espacial).

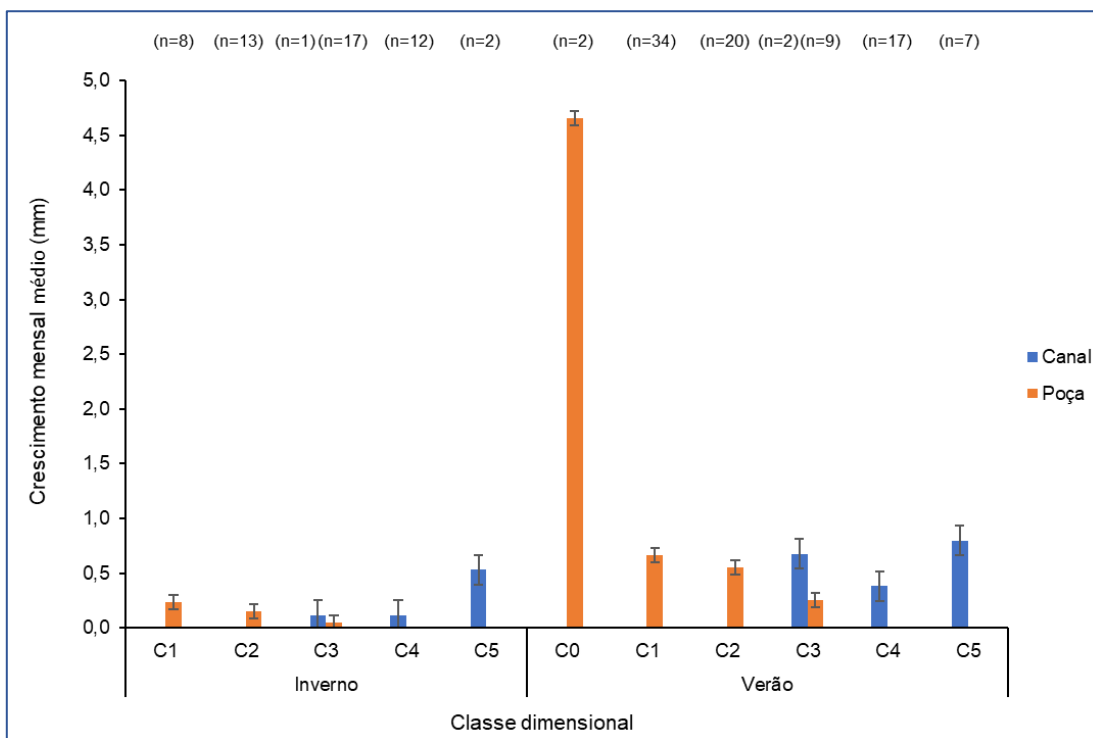


Figura 23 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar *P. lividus*, por estação do ano e por classe dimensional, em cada um dos habitats estudados na experiência de crescimento *in situ*.

Como referido anteriormente, o crescimento mensal médio foi diferente nos dois momentos de amostragem (inverno e verão), para cada um dos habitats (Figuras 24 e 25). Em canais, a variação no crescimento mensal médio foi de $0,2 \pm 0,05$ mm no inverno e $0,5 \pm 0,06$ mm no verão. Nas poças-de-maré, houve uma variação no crescimento mensal médio de $0,1 \pm 0,03$ mm e de $0,7 \pm 0,12$ mm, no inverno e no verão, respetivamente.

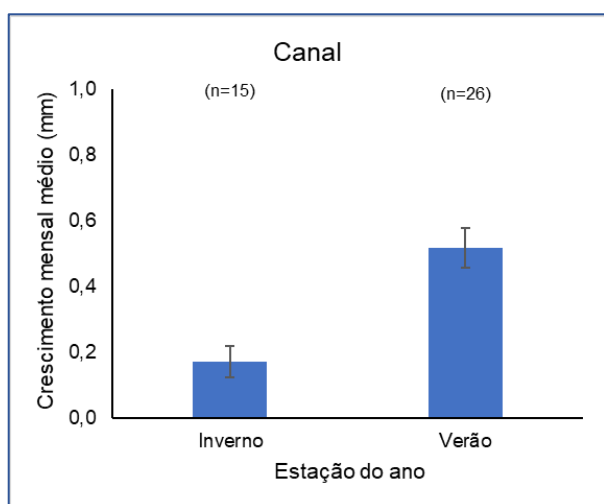


Figura 24 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar *P. lividus* em canal, por estação do ano, na experiência de crescimento *in situ*.

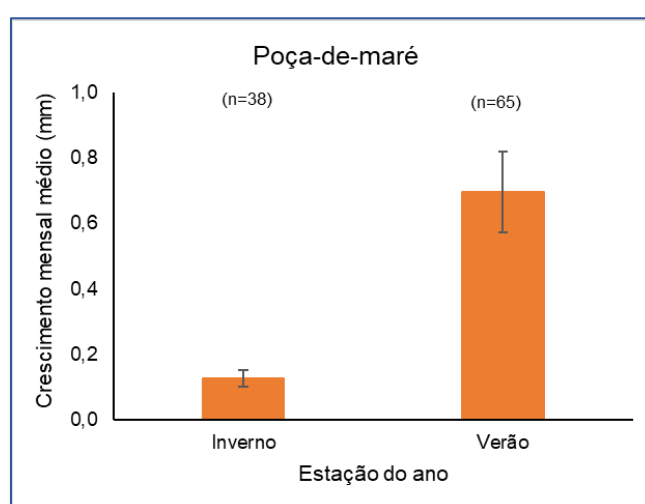


Figura 25 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar *P. lividus* em poças-de-maré, por estação do ano, na experiência de crescimento *in situ*.

Por meio desta disparidade, tornou-se necessário realizar uma análise temporal (inverno vs. verão) tanto em canais como em poças-de-maré, recorrendo a testes de homogeneidade de

variância (F-test) e a testes de comparação de médias entre amostras independentes (T-Student). Em canais, o F-test sugeriu que não existiam diferenças significativas entre as variâncias dos dados de inverno e de verão ($F = 0.36258$; $P > 0,05$). Desta forma, foi realizado o teste T-Student para variâncias iguais, onde os resultados sugerem que há diferenças significativas na média do crescimento mensal de inverno e de verão para os ouriços-do-mar dos canais ($t = -3.9099$; $P < 0,05$). Nas poças-de-maré, verificou-se através do F-test que existiam diferenças significativas entre as variâncias dos dados de inverno e verão ($F = 0.025297$; $P < 0,05$). Deste modo, foi realizado o teste T-Student, para variâncias diferentes, do qual resulta a existência de diferenças significativas na média do crescimento mensal de inverno e de verão para os ouriços-do-mar das poças-de-maré ($t = -3.4681$; $P < 0,05$).

3.3. Experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura)

Por meio da diferença entre o número de indivíduos colocados e recolhidos, no início e no fim da experiência, respetivamente, em cada uma das jaulas (Tabela 4), obteve-se um total de 97% de sobrevivência dos ouriços-do-mar presentes na experiência. A taxa de sobrevivência foi em média de 98% nos tratamentos A (algas), V (vegetais), ST (sem tratamento) e STSC (Sem tratamento e sem marcação com calceína) e de 95% em P (ração peletizada). Relativamente ao sucesso da marcação química com calceína, obteve-se um total de 55% de indivíduos marcados em relação ao número total de indivíduos colocados inicialmente. Em média, a taxa de sucesso da marcação foi de 31% em ST, 88% em P, 69% em A e 85% em V.

Tabela 4 - Taxa de recaptura de ouriços-do-mar *P. lividus* marcados, por réplica, em cada um dos tratamentos estudado na experiência de crescimento em ambiente artificial.

Tratamento	Réplica (caixa)	Nº Colocados	Nº Recolhidos	Nº Recolhidos marcados	Taxa de sobrevivência	Taxa de sucesso na marcação
ST	1	20	20	10	100%	50%
ST	2	20	20	7	100%	35%
ST	3	20	19	4	95%	20%
ST	4	20	19	4	95%	20%
P	1	20	19	19	95%	95%
P	2	20	20	19	100%	95%
P	3	20	19	17	95%	85%
P	4	20	18	15	90%	75%
A	1	20	18	13	90%	65%
A	2	20	20	10	100%	50%
A	3	20	20	19	100%	95%
A	4	20	20	13	100%	65%
V	1	20	18	14	90%	70%
V	2	20	20	20	100%	100%
V	3	20	20	18	100%	90%
V	4	20	20	16	100%	80%
STSC	1	20	20		100%	
STSC	2	20	18		90%	
STSC	3	20	20		100%	
STSC	4	20	20		100%	
TOTAL		400	388	218	97%	55%

Através dos tratamentos controlo com calceína (ST) e sem calceína (STSC), foi possível verificar qual a influência deste marcador químico no diâmetro real final dos indivíduos (Figura 26). Para ST o diâmetro real final foi de $29,3 \pm 0,02$ mm (média \pm erro padrão) e para STSC foi de $30,1 \pm 0,03$ mm.

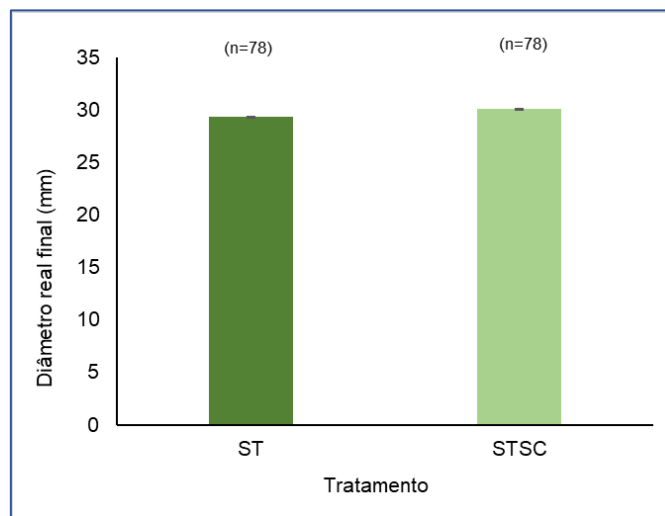


Figura 26 - Diâmetro real final (mm) de ouriços-do-mar *P. lividus* sem tratamento, marcados com calceína (ST) e sem marcação (STSC), na experiência de crescimento em ambiente artificial.

Por forma a testar a significância desta diferença, foram testados os dados referidos anteriormente, por teste de homogeneidade de variância (F-test) e teste de comparação de médias entre amostras independentes (T-Student). O F-test realizado sugeriu que não existiam diferenças significativas entre as variâncias dos dados de ST e STSC ($F = 0.68283$; $P > 0,05$). Desta forma, foi realizado o teste T-Student para variâncias homocedásticas (iguais), onde os resultados sugerem que não há diferenças significativas na média do diâmetro real final entre tratamentos para os ouriços-do-mar presentes na experiência em ambiente artificial ($t = -1.1434$; $P > 0,05$).

No tratamento A, verificou-se um crescimento mensal médio variou entre $0,5 \pm 0,04$ mm e $0,4 \pm 0,02$ mm. Para o tratamento P, o crescimento mensal médio variou entre $0,5 \pm 0,04$ mm e $0,4 \pm 0,03$ mm. Já para o tratamento ST o crescimento mensal médio variou entre $0,4 \pm 0,16$ mm e $0,3 \pm 0,07$ mm. No tratamento V, a variação do crescimento mensal médio foi entre $0,5 \pm 0,04$ mm e $0,4 \pm 0,03$ mm. Para os indivíduos do Campo, a variação do crescimento mensal médio foi entre $0,6 \pm 0,17$ mm e $0,1 \pm 0,13$ mm (Figura 27).

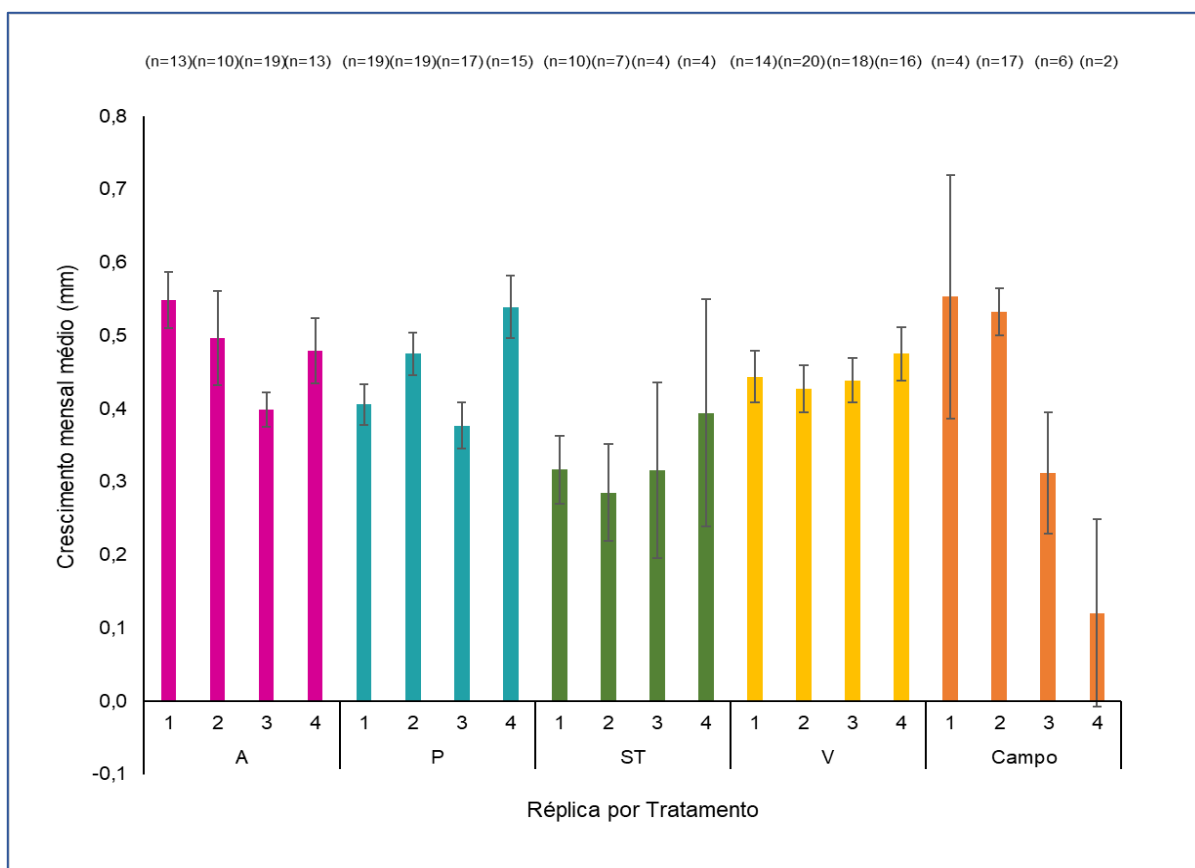


Figura 27 - Crescimento mensal médio (mm) de ouriços-do-mar *P. lividus*, por réplica, em cada um dos tratamentos estudados na experiência de crescimento em ambiente artificial.

Os resultados dos padrões de variação de crescimento mensal médio (mm) dos ouriços-do-mar, sujeitos aos tratamentos com Algas (A), Pellets (P), Sem tratamento (ST), Vegetais (V) e Campo, obtidos por meio da análise PERMANOVA univariada (Tabela 5), sugerem que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) nos valores médios de crescimento mensal médio de ouriço-do-mar entre tratamentos e entre réplicas.

Tabela 5 - Teste PERMANOVA ao efeito do tratamento (fator fixo com 5 níveis: Algas, Pellets, Sem Tratamento, Vegetais e Campo) no crescimento mensal médio (mm) do ouriço-do-mar *P. lividus*. Fator aleatórios réplica (Re) aninhado ao fator tratamento (Tr) $n=4$. Análise com base no coeficiente de similaridade de distância Euclidiana de dados não transformados. Valores obtidos usando 9999 permutações aleatórias. Legenda: g.l. – graus de liberdade; MQ – média dos quadrados. Diferenças significativas assinaladas a negrito ($p < 0,05$).

PERMANOVA - crescimento mensal médio (mm) entre tratamentos				
Fonte de variação	g.l.	M.Q.	Pseudo-F	P
Tr	4	0,10629	1,5441	0,2393
Re (Tr)	15	6,54E-02	0,66659	0,8235
Res	227	9,80E-02		

4. Discussão

O estudo dos padrões de variação de crescimento em ouriços-do-mar permite obter informações não só sobre a espécie, como também sobre o ambiente que a rodeia, uma vez que fatores como a disponibilidade de alimento, de território, a pressão predatória e competitiva e as condições abióticas do meio (e.g. temperatura da água, salinidade, hidrodinamismo e fotoperíodo), podem afetar significativamente o crescimento dos indivíduos (Boudouresque & Verlaque, 2020; Jacinto et al., 2021). Esta dissertação surge como trabalho pioneiro para estudos futuros com *Paracentrotus lividus*, na costa portuguesa, visto que é dos primeiros estudos de crescimento no terro, em Portugal Continental, com sucesso considerável na aplicação da metodologia utilizada e na obtenção de resultados conclusivos.

4.1. Experiência piloto

Na experiência piloto (2.2.), foram recapturados 43% dos ouriços-do-mar marcados no início da experiência, destes 46% são indivíduos de poça-de-maré e 42% de canais. Os restantes ouriços-do-mar marcados não foram detetados na área delimitada para marcação e nas suas imediações, pelo insucesso da marcação (marcas de calceína não visíveis ou inexistente, no momento da recaptura e/ou após a dissecação), por terem migrado para outras áreas (indivíduos adultos ($Dt > 40$ mm), migram para áreas mais profundas), ou ainda, por terem morrido (fatores bióticos ou abióticos do meio), constituindo estes os principais fatores que sugerem a inviabilização da recaptura de indivíduos marcados (Padilla et al., 2014; Jacinto et al., 2021). Em relação à migração dos ouriços-do-mar recapturados marcados, da área de marcação (quadrado) para as imediações da mesma (a uma distância de até 50 cm), pode verificar-se que 87% dos indivíduos permaneceram nesta área. Os resultados podem ser justificados pelo comportamento gregário e pela baixa mobilidade, característicos de *P. lividus* (Padilla et al., 2014; Boudouresque & Verlaque, 2020; D Jacinto et al., 2021). Em canais, a percentagem de indivíduos que migraram para as imediações da área de marcação (26%) é superior à verificada em poças-de-maré (4%), sugerindo que os ouriços-do-mar presentes em canais apresentam maior mobilidade comparativamente aos de poças-de-maré. Este resultado, pode evidenciar a necessidade de deslocação para procura de alimento, proteção em tocas e cobertura para ouriços-do-mar de habitats onde o território é mais amplo (Boudouresque & Verlaque, 2020).

Relativamente aos dados de crescimento entre classes, obteve-se um crescimento mensal médio superior em ouriços-do-mar da classe dimensional C2 ($Dt = [20;30]$) tanto em poças-de-maré ($CMM = 1,7 \pm 0,37$ mm) como em canais ($CMM = 0,5 \pm 0,14$ mm), quando comparados com os indivíduos das restantes classes dimensionais. Estes resultados sugerem que indivíduos mais pequenos têm taxas de crescimento superiores, em comparação com indivíduos maiores, como

afirmado por Boudouresque e Verlaque (2020) e comprovado em estudos como Padilla et al. (2014) e Jacinto et al. (2021), onde foi utilizada metodologia idêntica e onde se obtiveram resultados semelhantes.

Por forma a perceber de que forma o habitat afeta o crescimento dos ouriços-do-mar, foi necessário fazer a comparação dos resultados de crescimento mensal médio entre indivíduos da mesma classe dimensional (no caso, a única com dados de amostragem suficientes para fazer a análise), para ambos os habitats. Por meio deste estudo, foi possível verificar que há diferença significativa ($P < 0,05$) no crescimento mensal médio de indivíduos da classe dimensional C3 (Dt = [30;40[mm), entre poças-de-maré e canais. Esta evidência poderá ter origem no facto de zonas pouco profundas, como os canais, serem habitats com menor exposição à atividade das ondas (os indivíduos despendem de menos energia para a fixação ao substrato, locomoção, proteção, manutenção e reparação das estruturas duras do corpo e alimentação) e com maior disponibilidade de alimento e território, contrariamente a zonas de águas rasas, como as poças-de-maré (Turón et al., 1995; Ouréns et al., 2013; de Casamajor et al., 2017; Boudouresque & Verlaque, 2020). Através da mesma metodologia, Jacinto et al. (2021), obtiveram para ouriços-do-mar de classes dimensionais C2, C3 e C4 valores de crescimento mensal médio superiores em canais, comparativamente aos registados nas poças-de-maré. Estudos como Turón et al. (1995) e Ouréns et al. (2013), ainda que utilizando diferentes metodologias para estimar taxas de crescimento (contagem de bandas de deposição de calcite em ossículos) em *P. lividus*, obtiveram resultados semelhantes ao presente este estudo. Deste modo, é comprovada a hipótese da taxa de crescimento mensal (mm) em ouriços-do-mar *P. lividus* ser superior em canais. Contudo, os resultados deste estudo corroboram esta hipótese apenas para indivíduos da classe C3, uma vez que foi a única classe bem representada em ambos os habitats em estudo.

4.2. Experiência de crescimento *in situ*

Na experiência de crescimento *in situ* (2.3.), dos 661 ouriços-do-mar sujeitos a marcação química com calceína, foram recapturados 22%. Em comparação com a experiência piloto (43%), utilizando o mesmo método de marcação com calceína, os resultados evidenciaram menos sucesso de recaptura dos indivíduos marcados para esta experiência. Na amostragem de inverno (dezembro 2021 a abril de 2022), foram recapturados 17% dos indivíduos marcados em poças-de-maré e 27% em canais. Para a amostragem de verão, obteve-se uma taxa de recaptura de 21% em poças-de-maré e 58% em canais. Contrariamente aos resultados obtidos na experiência piloto, no presente estudo verificou-se uma variação na taxa de recaptura entre habitats, evidenciando-se superior em canais. Para além disso, entre as duas amostragens da experiência *in situ* também se constatou uma variação temporal na taxa de recaptura, sendo esta superior no verão para ambos os habitats. Como referido anteriormente, fatores como o sucesso da marcação, a migração e a mortalidade podem influenciar a recaptura dos indivíduos marcados (Padilla et al., 2014; Jacinto et

al., 2021). Além disso, o sucesso da marcação (marcas de calceína visíveis, no momento da recaptura e/ou após a dissecação) pode ser afetado pela metodologia de marcação ou por fatores bióticos e abióticos (e.g. temperatura da água, a quantidade de alimento disponível, o desenvolvimento reprodutivo, as concentrações de magnésio, hidrodinamismo, predação e competição) (Ebert, 2007; Padilla et al., 2014). Uma vez que estes últimos fatores influenciam direta ou indiretamente o crescimento e calcificação das estruturas duras do corpo do ouriço-do-mar, quando expostos ao stress (e.g. diminuição da temperatura da água, redução da quantidade de alimento disponível, maior desenvolvimento reprodutivo, menores concentrações de magnésio, elevado hidrodinamismo, elevada pressão predatória e competitiva), a absorção e fixação da marcação podem ser inviabilizadas por um processo de crescimento negativo ao nível das estruturas duras (reabsorção e transformação da calcite nos ossículos da carapaça, na lanterna de Aristóteles e nos espinhos) (Märkel, 1979; Levitan, 1991; Ebert, 2007), afetando a sua calcificação (Ebert, 2007; Padilla et al., 2014). As elevadas taxas de migração derivam de mudanças comportamentais que induzem movimentos sincronizados em ouriços-do-mar, como uma resposta à pressão predatória, disponibilidade de alimento ou a ambos os fatores (Boudouresque & Verlaque, 2020). A mortalidade dos indivíduos pode ter origem no procedimento de captura (e.g. extração, processo de marcação, recolocação no substrato), na elevada pressão predatória e na pesca (Padilla et al., 2014; Jacinto et al., 2021).

Desta forma, os resultados obtidos para taxas de recaptura variáveis entre inverno e verão sugerem que o período de amostragem pode estar na origem de maiores taxas de migração e mortalidade na amostragem de inverno, uma vez que os ouriços-do-mar marcados no inverno estiveram mais dias em campo (116 dias) até ao momento da recaptura, comparativamente aos indivíduos marcados no verão (57 dias). Desta forma, é necessário que em estudos futuros o período de amostragem seja semelhante em ambos os momentos de estudo, por forma a averiguar se este padrão acontece entre épocas do ano. Para além disso, o insucesso na marcação, devido às marcas de calceína não estarem visíveis ou serem inexistentes, no momento da recaptura e/ou após a dissecação, pode estar na origem de maiores taxas de recaptura no verão, visto que os fatores bióticos e abióticos são mais favoráveis ao crescimento e calcificação das estruturas duras dos ouriços-do-mar (temperatura da água mais elevada e maior disponibilidade de alimento), em comparação com as condições bióticas e abióticas de inverno. Relativamente à migração dos ouriços-do-mar recapturados marcados, da área de marcação (quadrado) para as imediações da mesma (a uma distância de até 50 cm), pode verificar-se que 58% dos indivíduos permaneceram no quadrado. Estes resultados são inferiores aos registados na experiência piloto (87%), sugerindo maior migração para fora da área de marcação dos indivíduos marcados na experiência *in situ*. Em poças-de-maré 24% dos indivíduos recapturados marcados no inverno e 18% no verão, encontravam-se nas imediações da área de marcação. Nos canais 87% dos indivíduos recapturados marcados no inverno e 100% no verão, estavam localizados nas imediações da área de marcação. A variação na taxa de migração entre habitats sugere que os ouriços-do-mar

presentes em canais apresentam maior mobilidade comparativamente aos de poças-de-maré, tal como se comprovou com os dados da experiência piloto. Este comportamento migratório em indivíduos presentes em canais, pode advir da necessidade de deslocação para procura de alimento, proteção em tocas em territórios maiores (Boudouresque & Verlaque, 2020). A taxa de migração dos indivíduos recapturados marcados para as imediações da área de marcação, em poças-de-maré, foi inferior no verão. Estes resultados vão de acordo com a observação de Barnes e Crook (2001), uma vez que no verão se espera que a taxa de migração em *P. lividus* seja mais reduzida, devido ao aumento da abundância de predadores, aos níveis de oxigénio se encontrarem no mínimo, aos níveis de temperatura da água e intensidade/duração da luz se encontrarem no máximo, e ao facto dos comportamentos de cobertura serem mais evidentes (por maior intensidade da luz). No entanto, não foi obtido o mesmo padrão em canais, uma vez que a taxa de migração para as imediações da área de migração foi superior no verão, contudo fatores como a migração para áreas menos expostas à predação e/ou à luz podem estar na origem deste comportamento.

Através dos resultados de crescimento mensal médio entre classes dimensionais, é possível verificar que em poças-de-maré, as taxas de crescimento mensal médio são superiores para a classe C1 ($Dt = [10;20[$ mm) no inverno ($CMM = 0,2 \pm 0,08$ mm) e para a classe C0 ($Dt = [0;10[$ mm) no verão ($CMM = 4,7 \pm 3,63$ mm). Estes resultados são corroborados com estudos como Padilla et al. (2014), Boudouresque e Verlaque (2020) e Jacinto et al. (2021), onde se verificou que indivíduos mais pequenos têm taxas de crescimento superiores, em comparação com indivíduos maiores. Contudo, o mesmo não se verificou em canais, uma vez que as taxas de crescimento mensal médio são superiores na classe dimensional C5 ($Dt = [50; 60[$ mm), tanto no inverno ($CMM = 0,5 \pm 0,17$ mm) como no verão ($CMM = 0,8 \pm 0,14$ mm). Este resultado pode ser justificado pela capacidade de indivíduos maiores resistirem a taxas de predação elevadas, por apresentarem mais robustez física, permitindo que se desloquem no território em busca de alimento, enquanto indivíduos mais pequenos permanecem mais tempo em tocas por serem mais vulneráveis aos predadores. Assim, é de esperar que os indivíduos maiores apresentem taxas de crescimento mais elevadas, em habitats com maior disponibilidade de território.

No presente estudo, apenas na classe dimensional C3 ($Dt = [30;40[$ mm) se obtiveram resultados de crescimento mensal médio para ambos habitats (poças-de-maré e canais). No entanto, por falta de robustez de dados (devido à reduzida taxa de recaptura de indivíduos marcados (22%) nesta experiência), não foi possível analisar a ocorrência de diferenças significativas no crescimento mensal médio dos indivíduos desta classe, entre habitats, inviabilizando o estudo da influência da variação espacial no crescimento de *P. lividus*. Desta forma, não é possível comprovar nem refutar a hipótese de, em canais, o crescimento mensal médio (mm) em *P. lividus* ser superior comparativamente de poças-de-maré. Contudo, através da experiência piloto, com recurso à mesma metodologia de marcação e recaptura, foi possível validar esta hipótese. Assim, fatores como a pesca de indivíduos maiores (C3, C4 e C5) em zonas rasas de fácil aceso, a maior influência do hidrodinamismo em zonas rasas, temperatura da água, disponibilidade de alimento entre

períodos de amostragem e a região e local da amostragem, podem influenciar a diferença entre os resultados obtidos.

Os resultados deste estudo sugerem que a variação temporal (entre inverno e verão) tem influência nas taxas de crescimento de *P. lividus*, uma vez que se comprovou, tanto em canais como em poças-de-maré, a diferença significativa ($P < 0,05$) no crescimento mensal médio entre as distintas épocas do ano estudadas. Em ambos os habitats, as taxas de crescimento mensal médio são superiores no verão (CMM poças-de-maré = $0,7 \pm 0,12$ mm; CMM canais = $0,5 \pm 0,06$ mm), comparativamente aos dados de crescimento de inverno. Estes resultados são justificados por o verão ser uma época com hidrodinamismo mais fraco, os níveis de temperatura da água se encontrarem no máximo e haver um pico sazonal de disponibilidade de alimento, sendo estes fatores favoráveis ao crescimento de ouriços-do-mar (Turon et al., 1995; Tomšić et al., 2010; Padilla et al., 2014; de Casamajor et al., 2017; Boudouresque & Verlaque, 2020). Desta forma, a hipótese de o crescimento mensal médio (mm) em *P. lividus*, ser superior no verão, é corroborada pelos resultados obtidos na experiência *in situ* realizada no presente estudo.

Através do presente estudo, é de realçar a necessidade de dar continuidade a estudos deste tipo, em mais locais da costa continental portuguesa, ao longo de todo o ano e com períodos mais longos de amostragem (e.g. interanual), por forma a entender se este padrão é comum a todas as classes dimensionais, habitats e estações do ano.

4.3. Experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura)

Na experiência de crescimento em ambiente artificial (2.4.), dos 400 ouriços-do-mar colocados nas jaulas, obteve-se uma taxa de sobrevivência de 97%. Este resultado vai de acordo com outros estudos de crescimento realizados com *P. lividus* em aquacultura, em sistema aberto e com a utilização de jaulas submersas, obtendo taxas de mortalidade praticamente nulas (Rey-Méndez et al., 2015; Vizzini et al., 2018). Deste modo, é possível verificar que apesar de os ouriços-do-mar estarem expostos às condições abióticas do meio (e.g. temperatura da água, hidrodinamismo, níveis de oxigénio, intensidade/duração da luz), estas não são limitantes ao ponto de influenciarem a sobrevivência dos indivíduos (Fernandez, 1996; Rey-Méndez et al., 2015; Vizzini et al., 2018; Fernandez & Caltagirone, 2020).

Em média, 97% dos 320 indivíduos marcados com calceína (ouriços-do-mar dos tratamentos A, V, ST e P) sobreviveu até ao término da experiência. Comparativamente com a taxa de sobrevivência dos ouriços-do-mar do tratamento STSC (98%) e estudos que obtêm taxas de mortalidade nulas com a utilização deste método de marcação (Levitan, 1991; Ellers & Johnson, 2016; Ebert, 2013; Santos et al., 2022), é possível concluir que a utilização de calceína não influencia a sobrevivência dos ouriços-do-mar. A marcação química com calceína é o método mais aconselhado, não só pelas elevadas taxas de sobrevivência, como também por ser o fluorocromo menos tóxico, mais fluorescente e por ser mais facilmente absorvido (Ebert, 2013; Ellers &

Johnsona, 2016; Santos et al., 2022; Tourón et al., 2022). Nesta experiência, foram detetadas marcas de calceína em 55% dos indivíduos marcados. Comparativamente a estudos com taxas de retenção da marcação de 100% em ouriços-do-mar (Russell & Urbaniak, 2004; Ellers & Johnson, 2016; Rodríguez et al., 2016; Santos et al., 2022), os resultados obtidos nesta experiência estão abaixo do esperado. A taxa de retenção da marcação variou entre tratamentos (31% em ST, 88% em P, 69% em A e 85% em V), sugerindo que a alimentação é um dos fatores biológicos que afeta o sucesso da marcação química (Ebert et al., 2008; Padilla et al., 2014), tendo em conta que outros fatores (e.g. temperatura da água, concentrações de magnésio, hidrodinamismo, predação nula e competição) influenciaram de igual forma todos os indivíduos da experiência. Através deste estudo, foi ainda possível constatar que a marcação com calceína não tem influência no crescimento dos ouriços-do-mar, visto que os resultados permitiram verificar que houve crescimento em indivíduos do tratamento ST e não foi verificada a existência de diferença significativa ($P > 0,05$) no diâmetro real final entre indivíduos do tratamento ST e STSC, sugerindo que indivíduos de STSC atingiram tamanhos semelhantes aos de ST. Estes resultados corroboram os estudos de marcação em ouriços-do-mar de Santo et al. (2022) e Turon et al. (2022).

Relativamente aos resultados de crescimento mensal médio (mm) em indivíduos marcados, pode verificar-se que apesar de haver diferenças entre as réplicas de cada tratamento e entre tratamentos (A, V, ST, P e Campo), esta diferença não é significativa ($P > 0,05$). Desta forma, a hipótese de que o tratamento com algas proporciona taxas de crescimento (mm) superiores, é refutada, contrariamente ao que acontece em estudos como Spirlet et al. (2001) e Rey-Méndez et al. (2015), onde existe diferença significativa nas taxas de crescimento dos ouriços-do-mar alimentados com algas e as restantes dietas a serem testadas, sendo as mesmas superiores em algas. No entanto, como nesta experiência se obteve taxas de sucesso de marcação relativamente baixas (55% para ouriços-do-mar nos tratamentos em ambiente artificial e 32% para os do Campo), é possível verificar que a calcificação (e por sua vez, absorção da calceína) foi limitada por fatores de stress, inibindo, assim, o crescimento positivo dos ouriços-do-mar. Por um lado, a temperatura da água é o fator que mais influencia o crescimento em ouriços-do-mar (Fernandez & Pergent, 1998; Spirlet et al., 2000; Sartori et al., 2015), no entanto, no presente estudo, não se verificou a influência deste fator nas taxas de crescimento entre tratamentos e o “Campo”, sugerindo que a temperatura da água entre o ambiente artificial e natural seria semelhante. Outros fatores como a diminuição da pressão predatória (sendo a jaula uma barreira física), a diminuição da competição intraespecífica (por haver baixa densidade de indivíduos nas jaulas e alimento à disposição) e a baixa exposição ao hidrodinamismo (por estarem ao abrigo do porto), (Rey-Méndez et al., 2015), todavia a influência destes fatores não se verificou nos resultados deste estudo. Contudo, a alimentação poderá ter sido um dos fatores que sugere a diferença (apesar de não ser significativa) de crescimento mensal médio entre tratamentos em ambiente artificial, refletindo-se nas taxas de sucesso de recaptura, (31% em ST, 88% em P, 69% em A e 85% em V).

De outro modo, o período de aclimatização, antes do início da experiência, pode ter sido outro fator limitante para o crescimento dos ouriços-do-mar de ambiente artificial. Uma vez que permaneceram durante 8 dias em elevadas densidades (~200 indivíduos, em duas jaulas submersas) e com baixa disponibilidade de alimento (partículas em suspensão e/ou do biofilme que se foi desenvolvendo nas jaulas), resultou no aumento dos níveis de stress e no possível aparecimento de doenças (“doença do ouriço-do-mar careca”, caracterizada por lesões na parede corporal, perda de espinhos, pés-tubulares ambulacrais e perda de epiderme (Sweet, 2020)), sendo necessário mais investimento energético para manutenção e reparação das estruturas duras do corpo dos ouriços-do-mar.

5. Conclusão

Na presente dissertação, foi estudada a variação das taxas de crescimento em ouriços-do-mar *P. lividus* no litoral rochoso de Portugal Continental e em aquacultura em sistema aberto, com recurso a marcação química com calceína para detetar as marcas de crescimento nas estruturas duras do corpo dos ouriços-do-mar. Os estudos de crescimento em ouriços-do-mar permitem, através da variação de crescimento dos indivíduos em função da variação de fatores bióticos e abióticos, conhecer as características do habitat e a dinâmica das populações.

Em Cascais, os resultados da experiência piloto permitiram concluir que os indivíduos mais pequenos têm taxas de crescimento superiores, relativamente a indivíduos maiores, e que há variação das taxas de crescimento entre habitats (canais e poças-de-maré), sendo estas superiores em canais, apesar de tal facto se ter verificado apenas em indivíduos da classe C3. Esta variação entre habitats, acontece por habitats pouco profundos (canais) estarem menos expostos ao hidrodinamismo, terem maior disponibilidade de alimento e de território, aquando comparados com a zonas rasas (poças-de-maré).

Na experiência de crescimento *in situ*, realizada em Sines, a verificação de taxas de crescimento superiores em indivíduos mais pequenos comprovou-se em poças-de-maré, contrariamente ao que aconteceu nos canais. Os resultados em canais podem ser justificados pela maior capacidade de resistência a predadores (por robustez física) e de procura de alimento que os indivíduos maiores apresentam, relativamente a ouriços-do-mar mais pequenos que permanecem mais tempo em tocas. Para além disso, não foi possível concluir sobre a variação das taxas de crescimento entre habitats, por falta de robustez dos dados obtidos. Contudo, os resultados sugeriram que há variação nas taxas de crescimento entre épocas do ano, sendo estas superiores no verão, comparativamente aos resultados obtidos no inverno. O verão potencia o crescimento de ouriços-do-mar, por ser uma época com baixo hidrodinamismo, por apresentar níveis de temperatura da água elevados e por ter picos de elevada disponibilidade de alimento.

A experiência de crescimento em ambiente artificial (aquacultura), na jangada do Porto de Sines, não permitiu retirar conclusões sobre o efeito da dieta fornecida nas taxas de crescimento de ouriços-do-mar, uma vez que não se obteve diferenças significativas entre tratamentos (algas, vegetais, ração peletizada e sem tratamento) e indivíduos do campo. Os fatores como a invariabilidade da temperatura da água e o período de aclimatização ter acontecido em elevadas densidades, podem ser considerados fatores limitantes para o crescimento dos ouriços-do-mar, dando origem a taxas de crescimento semelhantes entre tratamentos e indivíduos do campo.

5.1. Perspetivas futuras para estudos de crescimento

Através dos resultados obtidos na experiência piloto e na experiência *in situ*, foi evidente a reduzida taxa de recaptura de indivíduos marcados, influenciando a robustez da amostra e a análise da mesma, acabando por não solucionar as principais questões que deram origem à elaboração deste trabalho. Assim, para futuros estudos de crescimento, *in situ* e com recurso a marcação química, sugere-se:

- Amostrar mais regiões e locais, aumentar o número de réplicas por local e o número de indivíduos marcados por réplica, aumentando a robustez de dados;
- Centralizar a marcação de ouriços-do-mar de classes dimensionais comuns nos habitats que se pretende amostrar, permitindo obter resultados mais robustos;
- Diminuir o período de amostragem na época de inverno, reduzindo o período de exposição a fatores limitantes para o crescimento (e.g. temperatura da água e hidrodinamismo), a migração e a mortalidade;
- Utilizar a mesma duração de amostragem em estudos de variação temporal, para permitir comparar a influência de fatores como a migração e a mortalidade, em épocas do ano distintas.

Relativamente aos resultados obtidos na experiência de crescimento em aquacultura em sistema aberto, aconselha-se, para estudos futuros, nestas condições de cultivo:

- Realizar uma avaliação ao nível da influência da profundidade a que são colocadas as jaulas (fazendo variar os níveis de exposição ao hidrodinamismo), nas taxas de crescimento dos ouriços-do-mar;
- Diminuir a densidade de ouriços-do-mar nas jaulas durante o período de aclimatização, evitando que os indivíduos fiquem expostos a mais fatores de stress e ao aparecimento de doenças;
- Aumentar o número de réplicas e por sua vez, o número de indivíduos a estudar, obtendo uma matriz de dados mais robusta;
- Aumentar a duração do período de amostragem, permitindo obter resultados diferentes e, sobretudo, para estes terem aplicações e maior relevância para a aquacultura (onde o objetivo será criar indivíduos com dimensões comerciais).

5.2. Medidas de conservação da espécie

O ouriço-do-mar *P. lividus* desempenha um papel ecológico importante no ecossistema em que se insere, não só como predador e presa, como também pelo seu papel como bioindicador e bioengenheiro do ecossistema. Por outro lado, sendo uma espécie comestível, o aumento da sua exploração em Portugal Continental, tem aumentando ao longo dos anos para consumo e venda das gónadas de ouriço-do-mar. Assim, torna-se necessário investir na investigação e no estudo de

fatores como o crescimento, que podem fornecer informações importantes sobre as características do habitat e a dinâmica das populações, bem como a conservação da espécie.

Atualmente, o não cumprimento da legislação em vigor (tamanho mínimo do ouriço-do-mar para a apanha, cotas de diárias por apanhador, pesca rotativa e a aquacultura), o baixo esforço de fiscalização em áreas de ocorrência da espécie, a falta de coordenação entre pescadores e a falta de conhecimento das leis em vigor e do impacto ecológico da pesca lúdica e/ou profissional (onde são apanhados em grandes quantidades os ouriços-do-mar mais pequenos, impactando a evolução da população onde estes se inserem), pode pôr em causa a estabilidade das populações naturais de *P. lividus*, levando à exploração excessiva do recurso (Castro, 2004).

A pressão antrópica através da exploração do recurso, surge como a ameaça principal à espécie de ouriço-do-mar em estudo. Deste modo, para evitar a sobrepesca e criar alternativas de exploração mais sustentáveis, é necessário implementar novas medidas de conservação como: fazer cumprir as leis e medidas atualmente em vigor; aumentar a fiscalização em locais de fácil acesso, evitando a inviabilização de populações que se encontrem nestas zonas; aumentar a vigilância em reservas marinhas, bem como aumentar as existentes e criar novas reservas; aumentar a consciencialização ambiental e fazer sensibilização junto da população e dos pescadores; criar refúgios de captura (e.g. proibindo pescar em locais com menos de 5 m de profundidade), salvaguardando o crescimento de indivíduos mais jovens e permitindo que estes migrem para áreas mais profundas e menos acessíveis; delinear épocas sazonais para a apanha, permitindo evitar épocas de desova ou de crescimento acentuado, beneficiando a estabilidade das populações.

A aquacultura, quando realizada com recurso a sistemas sustentáveis e com impactos reduzidos para o ecossistema (como sistemas abertos ou semifechados, em regime extensivo), pode também constituir uma medida de conservação da espécie. Através da exploração do recurso com por meio da aquacultura, a pressão antrópica por atividades piscatórias diminui, permitindo que haja um retorno e a manutenção das populações naturais. A produção de larvas e juvenis em aquacultura surge assim como mais uma alternativa à conservação da espécie, ao promover o repovoamento da mesma em habitat natural. A aquacultura com aproveitamento dos desperdícios da agroindústria (cujos resultados são bastante promissores tendo em conta o presente estudo, onde se obtiveram taxas de crescimento semelhantes às que se observa com dietas à base de algas e em sistemas naturais), surge como alternativa para promover a economia circular, beneficiando não só a produção da espécie como a economia local.

6. Referências bibliográficas

- Acolas, M. L., Roussel, J. M., Lebel, J. M., & Baglinière, J. L. (2007). Laboratory experiment on survival, growth and tag retention following PIT injection into the body cavity of juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Fisheries Research*, 86(2–3), 280–284. <https://doi.org/10.1016/J.FISHRES.2007.05.011>
- Agatsuma, Y., & Momma, H. (1988). Release of cultured seeds of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz), in the Pacific coastal waters of southern Hokkaido [Japan], 1: Growth and reproductive cycle. *Scientific Reports of Hokkaido Fisheries Experimental Station (Japan)*.
- Agatsuma, Y. U., Nakata, A. K., & Matsuyama, K. E. (2000). Seasonal foraging activity of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus* on coralline flats in Oshoro Bay in south-western Hokkaido, Japan. *Fisheries Science*, 66(2), 198–203. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00035.x>
- Andrew, N. L., Agatsuma, Y., Ballesteros, E., Bazhin, A. G., Creaser, E. P., Barnes, D. K. A., Botsford, L. W., Bradbury, A., Campbell, A., Dixon, J. D., Einarsson, S., Gerring, P. K., Hebert, K., Hunter, M., Hur, S. B., Johnson, C. R., Juinio-Meñez, M. A., Kalvass, P., Miller, R. J., ... Xiaoqi, Z. (2002). Status and management of world sea urchin fisheries. *Oceanography and Marine Biology*, 40(40), 343-425. <https://doi.org/10.1201/9780203180594-26>
- Asnaghi, V., Collard, M., Mangialajo, L., Gattuso, J. P., & Dubois, P. (2019). Bottom-up effects on biomechanical properties of the skeletal plates of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in an acidified ocean scenario. *Marine Environmental Research*, 144, 56–61.
- Barnes, D., & Crook, A. (2001). Quantifying behavioural determinants of the coastal European sea-urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 138(6), 1205-1212.
- Bertocci, I., Dominguez, R., Machado, I., Freitas, C., Domínguez Godino, J., Sousa-Pinto, I., Gonçalves, M., & Gaspar, M. B. (2014). Multiple effects of harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. *Fisheries Research*, 150, 60–65. <https://doi.org/10.1016/J.FISHRES.2013.10.010>
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2020). *Paracentrotus lividus*. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 43, pp. 447-485). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00026-3>
- Buchanan, N. P., Lilly, K. G. S., Gehring, C. K., & Moritz, J. S. (2010). The effects of altering diet formulation and manufacturing technique on pellet quality. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(2), 112–120. <https://doi.org/10.3382/JAPR.2009-00070>
- Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., & Cinelli, F. (1999). Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(1), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00073-8)
- Cárcamo, P. F. (2015). Effects of food type and feeding frequency on the performance of early juveniles of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea): Implications for

- aquaculture and restocking. *Aquaculture*, 436, 172–178.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.10.045>
- Castilla-Gavilán, M., Buzin, F., Cognie, B., Dumay, J., Turpin, V., & Decottignies, P. (2018). Optimising microalgae diets in sea urchin *Paracentrotus lividus* larviculture to promote aquaculture diversification. *Aquaculture*, 490, 251–259.
- Castro, J. J. (2004). *Predação humana no litoral rochoso alentejano: caracterização, impacte ecológico e conservação*.
- Cipriano, A., Burnell, G., Culloty, S., & Long, S. (2014). Evaluation of 3 tagging methods in marking sea urchin, *Paracentrotus lividus*, populations under both laboratory and field conditions. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(6).
- Cruz, T., Jacinto, D., Sousa, A., Penteado, N., Pereira, D., Fernandes, J. N., ... & Castro, J. J. (2015). The state of the fishery, conservation and management of the stalked barnacle *Pollicipes pollicipes* in Portugal. *Marine Environmental Research*, 112, 73-80.
- Daggett, T. L., Pearce, C. M., Tingley, M., Robinson, S. M. C., & Chopin, T. (2005). Effect of prepared and macroalgal diets and seed stock source on somatic growth of juvenile green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 244(1–4), 263–281.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.11.030>
- de Casamajor, M. N., Mahias, J., Castets, V., Caill-Milly, N., Bru, N., & Lissardy, M. (2017). Tidal level influence on the spawning process of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) on a rocky shore (Bay of Biscay). *Regional Studies in Marine Science*, 9, 126–134.
<https://doi.org/10.1016/J.RSMA.2016.12.004>
- Dinis, M. T., & Rocha, R. M. (2021). *Introdução à Aquacultura* (LIDEL (ed.)).
- Ebert, T. A. (2007). Growth and survival of postsettlement sea urchins. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 37, pp. 95-134). Elsevier.
- Ebert, T. A., Russell, M. P., Gamba, G., & Bodnar, A. (2008). Growth, survival, and longevity estimates for the rock-boring sea urchin *Echinometra lucunter lucunter* (Echinodermata, Echinoidea) in Bermuda. *Bulletin of Marine Science*, 82(3), 381–403.
- Ebert, T. A. (2013). Growth and survival of postsettlement sea urchins. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 38, pp. 83-117). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00007-1>
- Ellers, O., & Johnson, A. S. (2016). Polyfluorochrome marking slows growth only during the marking month in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebrate Biology*, 128(2), 126–144. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2008.00159.x>
- Fernandes, J. I. R. N. (2019). *Recruitment of the Stalked Barnacle Pollicipes Pollicipes on an Artificial Substratum (“Barticle”) and Transfer to an Extensive System of Production: Success Techniques and Pitfalls* (Doctoral dissertation, Universidade de Evora (Portugal)).
- Fernandez, C. (1996). *Croissance et nutrition de Paracentrotus lividus dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle* (Doctoral dissertation, Corte).

- Fernandez, C., & 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., & Caltagirone, A. (2020). Growth rate of adult sea urchins, *Paracentrotus lividus* in a lagoon environment: the effect of different diet types. In *Echinoderms through time* (pp. 655–660). CRC Press.
- Fernandez, C., Pasqualini, V., Johnson, M., Ferrat, L., Caltagirone, A., & Boudouresque, C. F. (2001). Stock evaluation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a lagoonal environment. *Echinoderm research*, 319–323.
- Fernandez, C., & 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, 1571–1581.
- Gago, J., Range, P., & Luis, O. J. (2003). Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. *Echinoderm Research*, 269–276. https://www.academia.edu/29879911/Growth_reproductive_biology_and_habitat_selection_of_the_sea_urchin_Paracentrotus_lividus_in_the_coastal_waters_of_Cascais_Portugal
- George, S. B., Lawrence, J. M., & Lawrence, A. L. (2004). Complete larval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* fed an artificial feed. *Aquaculture*, 242(1–4), 217–228. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.06.024>
- Gianasi, B. L., Verkaik, K., Hamel, J. F., & Mercier, A. (2015). Novel use of PIT tags in sea cucumbers: promising results with the commercial species *Cucumaria frondosa*. *PloS One*, 10(5), e0127884.
- Gianguzza, P., Chiantore, M., Bonaviri, C., Cattaneo-Vietti, R., Vielmini, I., & Riggio, S. (2006). The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fisheries Research*, 81(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.FISHRES.2006.06.002>
- Gibbons, W. J., & Andrews, K. M. (2004). PIT tagging: simple technology at its best. *Bioscience*, 54(5), 447–454.
- Grosjean, P., Spirlet, C., & Jangoux, M. (1996). Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201(1–2), 173–184. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00200-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00200-6)
- Grosjean, P., Spirlet, C., & Jangoux, M. (2003). A functional growth model with intraspecific competition applied to a sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(3), 237–246.
- Grosso, L., Rakaj, A., Fianchini, A., Morroni, L., Cataudella, S., & Scardi, M. (2021). Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system combining the sea urchin *Paracentrotus lividus*, as primary species, and the sea cucumber *Holothuria tubulosa* as extractive species. *Aquaculture*, 534,

736268. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736268>

- Guidetti, P., Terlizzi, A., & Boero, F. (2004). Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fisheries Research*, 66(2–3), 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(03\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(03)00206-6)
- Guiomar, C. A. R. (1997). Aspectos da biologia e exploração do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)(Echinodermata: Echinoidea) na costa alentejana. In *Relatório de estágio profissionalizante, Universidade de Lisboa*, 64pp.
- Haag, N., Russell, M. P., Hernandez, J. C., & Dollahon, N. (2013). Assessing fluorochrome-staining efficacy in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776). *Cah Biol Mar*, 54, 625-631.
- Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., & Sala, E. (2005). The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Marine Biology*, 146(2), 293-299. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1439-y>
- Jacinto, D., & Cruz, T. (2012). *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) attachment force and burrowing behavior in rocky shores of SW Portugal. *Zoosymposia*, 7, 231–240.
- Jacinto D, MJ Correia, F Maresca, D Mateus, P Mega Lopes, C Alves, J Ruivo, T Silva, B Quintella, JJ Castro, T Cruz & JL Costa, (2021). OURICEIRA MAR: estudo e caracterização do recurso ouriço-do-mar na Ericeira e regiões adjacentes (Relatório final do projeto). Ouriceira Mar, 165 páginas.
- Jacinto, D., Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., & Cruz, T. (2013). Patterns of abundance, population size structure and microhabitat usage of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in SW Portugal and NW Italy. *Marine Biology*, 160(5), 1135–1146. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2166-z>
- Jangoux, M. (1998). Land-based, closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck)(Echinoidea: Echinodermata): a long-term experiment at a pilot scale. *Journal of Shellfish Research*, 17(5), 1523-1531.
- James, P., & Siikavuopio, S. I. (2012). The effect of continuous and intermittent feeding regimes on survival and somatic and gonadal growths of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 364–365, 173–179. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.08.022>
- Jobling, M. (2010). Are compensatory growth and catch-up growth two sides of the same coin?. *Aquaculture International*, 18(4), 501-510.
- Johnson, A. S., Salyers, J. M., Alcorn, N. J., Eilers, O., & Allen, J. D. (2013). Externally visible fluorochrome marks and allometries of growing sea urchins. *Invertebrate Biology*, 132(3), 251–269. <https://doi.org/10.1111/ivb.12024>
- Kelly, M. S., McKenzie, J. D., & Brodie, C. C. (1998). Sea urchins in polyculture: the way to enhanced gonad growth. *Echinoderms: San Francisco. Balkema, Rotterdam*, 707-711.
- Kroh, A., & Mooi, R. (2021). World Echinoidea Database. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=124316>

- Lawrence, J. M. (Ed.). (2013). *Sea urchins: biology and ecology*. Academic Press.
- Lawrence, J. M., Plank, L. R., & Lawrence, A. L. (2003). The effect of feeding frequency on consumption of food, absorption efficiency, and gonad production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *134*(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00222-2)
- Le Gall, P. (1990). Culture of echinoderms. *Aquaculture*, *1*, 443-462.
- Le Gall, P., & Bucaille, D. (1989). Sea urchins production by inland farming.
- Leviton, D. R. (1991). Skeletal changes in the test and jaws of the sea urchin *Diadema antillarum* in response to food limitation. *Marine Biology*, *111*(3), 431–435.
- Lourenço, S., José, R., Andrade, C., & Valente, L. M. P. (2020). Growth performance and gonad yield of sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) fed with diets of increasing protein: energy ratios. *Animal Feed Science and Technology*, *270*, 114690. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2020.114690>
- Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., & Palacin, C. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, *122*, 179-191.
- Makkar, H. P. S., & Ankers, P. (2014). Towards sustainable animal diets: A survey-based study. *Animal Feed Science and Technology*, *198*, 309–322. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2014.09.018>
- Mamede, N. M. G. (2014). *Relações Ecológicas Entre Ouriços-do-Mar e ops Seus Predadores e Presas no Sudoeste de Portugal Continental* (Doctoral dissertation, Universidade de Evora (Portugal)).
- Märkel, K. (1979). Structure and growth of the cidaroid socket-joint lantern of Aristotle compared to the hinge-joint lanterns of non-cidaroid regular echinoids (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphologie*, *94*(1), 1–32.
- McBride, S. C. (2005). Sea urchin aquaculture. In *American Fisheries Society Symposium* (Vol. 46, p. 179). American Fisheries Society.
- McCarron, E., Burnell, G., & Mouzakitis, G. (2009). Growth assessment on three size classes of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* using continuous and intermittent feeding regimes. *Aquaculture*, *288*(1-2), 83-91.
- Mendes, A., Araújo, J., Soares, F., Bandarra, N., & Pousão-Ferreira, P. (2019). Production of Purple Sea Urchin *Paracentrotus lividus* in Portugal. *The World Aquaculture Society*, *50*(1), 46-50.
- Monaghan Jr, J. P. (1993). Comparison of calcein and tetracycline as chemical markers in summer flounder. *Transactions of the American Fisheries Society*, *122*(2), 298–301.
- Moore, H. B. (1935). A comparison of the biology of *Echinus esculentus* in different habitats. Part II. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *20*(1), 109-128.

- Ouréns, R., Flores, L., Fernández, L., & 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.
- Ouréns, Rosana, Fernández, L., & Freire, J. (2011). Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology* 2010 158:4, 158(4), 793–804. <https://doi.org/10.1007/S00227-010-1607-1>
- Padilla, H. T., Martín, M. S. C., & Pérez, J. C. H. (2014). Estimación del crecimiento del erizo de mar. *Paracentrotus lividus*. *Revista de La Academia Canaria de Ciencias: = Folia Canariensis Academiae Scientiarum*, 26(1), 263–279. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5909125&info=resumen&idioma=ENG>
- Paredes, E., & Costas, D. (2020). Non-lethal sex identification of sea urchins: method and advantages. *Lab Animal*, 49(1), 7–8.
- Pearce, C. M., Daggett, T. L., & Robinson, S. M. C. (2002). Effect of protein source ratio and protein concentration in prepared diets on gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 214(1–4), 307–332. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00041-8)
- Rey-Méndez, M., Tourón, N., Rodríguez-Castro, B., Rama-Villar, A., Fernández-Silva, I., González, N., Martínez, D., Ojea, J., & Catoira, J. L. (2015). Growth rate and gonadal index improvement in sea urchin culture *Paracentrotus lividus* (Echinoida: Echinidae). *Revista de Biología Tropical*, 63, 261-272.
- Robinson, S. M. C., & Colborne, L. (1997). Enhancing roe of the green sea urchin using an artificial food source. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, (1), 14-20.
- Rodríguez-Barreras, R., & Sabat, A. M. (2015). Evaluation of three tagging methods in the sea urchin *Diadema antillarum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(6), 1255–1260.
- Rodríguez, A., Hernández, J. C., & Clemente, S. (2016). Efficiency of calcein tagging on juveniles of the sea urchins *Diadema africanum* and *Paracentrotus lividus*. *Marine Ecology*, 37(2), 463–469.
- Rogers-Bennett, L., Rogers, D. W., Bennett, W. A., & Ebert, T. A. (2003). Modeling red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) growth using six growth functions.
- Rowley, R. J., & Mackinnon, D. L. (1995). Use of the fluorescent marker calcein in biomineralisation studies of brachiopods and other marine organisms. *Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco), Special issue*, 111–120.
- Russell, M. P., & Urbaniak, L. M. (2004, December). Does calcein affect estimates of growth rates in sea urchins. In *Proceedings of the 11th international echinoderm conference*, Balkema, Rotterdam (pp. 53-57).
- Sandford, M., Castillo, G., & Hung, T. C. (2020). A review of fish identification methods applied on small fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 542–554.

- Santos, P. M., Quintella, B. R., Jacinto, D., Gomes, A., Saldanha, C., Lourenço, S., Mega Lopes, P., Correia, M., Mateus, D., Cruz, T., Pombo, A., & Lino Costa, J. (2022). Physical and chemical tagging methods for the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Scientia Marina*, 86(3), e038–e038.
- Santos, R., Gorb, S., Jamar, V., & Flammang, P. (2005). Adhesion of echinoderm tube feet to rough surfaces. *Journal of Experimental Biology*, 208(13), 2555–2567.
- Sartori, D., & Gaion, A. (2016). Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility evaluation. *Aquaculture Nutrition*, 22(6), 1214–1221. <https://doi.org/10.1111/anu.12326>
- Sartori, D., Scuderi, A., Sansone, G., & Gaion, A. (2015). Echinoculture: the rearing of *Paracentrotus lividus* in a recirculating aquaculture system—experiments of artificial diets for the maintenance of sexual maturation. *Aquaculture International*, 23(1), 111–125.
- Sloan, N. A. (2020). Echinoderm fisheries of the world: a review. *Echinodermata*, 109–124.
- Spirlet, C., Grosjean, P., & Jangoux, M. (2001). Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquaculture Nutrition*, 7(2), 91–100.
- Spirlet, Christine, Grosjean, P., & Jangoux, M. (2000). Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture*, 185(1–2), 85–99. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00340-3)
- Sugni, M., Barbaglio, A., Bonasoro, F., Gioria, M., Fasano, P., & Pasini, M. E. (2013). The Role of Models in Science: A Multicomprehensive Experience with the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus*. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 93, 1404–1408. <https://doi.org/10.1016/J.SBSPRO.2013.10.052>
- Sweet, M. (2020). Sea urchin diseases: Effects from individuals to ecosystems. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 43, pp. 219–226). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00012-3>
- Thorarinsdottir, R. I., Jokumsen, A., & Thrandur Björnsson, B. Torrissen, O. (2011). Local raw materials for production of fish feed for aquaculture.
- Tidwell, J. H. (2012). Characterization and Categories of Aquaculture Production Systems. In *Aquaculture production systems* (pp. 64–78).
- Tomšić, S., Conides, A., DUPČIĆ RADIĆ, I., & Glamuzina, B. (2010). Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). *Acta Adriatica: International Journal of Marine Sciences*, 51(1), 67–77.
- Tourón, N., Paredes, E., & Costas, D. (2022). Comparison of the Effectiveness of Different Tags in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.102594>

- Trudgill, S. T., Smart, P. L., Friederich, H., & Crabtree, R. W. (1987). Bioerosion of intertidal limestone, Co. Clare, Eire — 1: *Paracentrotus lividus*. *Marine Geology*, 74(1–2), 85–98. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(87\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0025-3227(87)90007-7)
- Turon, X., Giribet, G., López, S., & Palacín, C. (1995). Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 193-204.
- Tuya, F., Martin, J. A., & Luque, A. (2004). Patterns of nocturnal movement of the long-spined sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi) in Gran Canaria (the Canary Islands, central East Atlantic Ocean). *Helgoland Marine Research*, 58(1), 26–31.
- Vizzini, S., Micciché, L., Vaccaro, A., & Mazzola, A. (2015). Use of fresh vegetable discards as sea urchin diet: effect on gonad index and quality. *Aquaculture International*, 23(1), 127-139.
- Vizzini, S., Visconti, G., Vaccaro, A., & Mazzola, A. (2018). Experimental rearing of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fed with discards of the lettuce *Lactuca sativa* in a sea-based system. *Aquaculture Research*, 49(2), 631-636.
- Witman, J. D., & Dayton, P. K. (2001). Rocky subtidal communities. *Marine community ecology*, 339-366.
- Woods, C. M., & James, P. J. (2005). Evaluation of passive integrated transponder tags for individually identifying the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Valenciennes). *Aquaculture Research*, 36(7), 730–732.
- Zeng, X. Q., Zheng, Y., & You, K. (2007). A Review of the Tag Methods Used in the Study of Sea Urchins. *Periodical of Ocean University of China*, 37, 717–722.