



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Marinha Aquática e Costeira

Culminação de Estudos II

Relatório do Trabalho de Investigação

**Avaliação experimental da sensibilidade de larvas de ouriço-do-mar,
Tripneustes gratilla (Linnaeus, 1758), à acidificação oceânica em
Bangua (Ilha de Inhaca)**

Autora: Aceleit Herca da Graça Chico



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia Marinha Aquática e Costeira
Culminação de Estudos II
Relatório do Trabalho de Investigação

**Avaliação experimental da sensibilidade de larvas de ouriço-do-mar,
Tripneustes gratilla (Linnaeus, 1758), à acidificação oceânica em
Bangua (Ilha de Inhaca)**

Autora:

Aceleit Herca da Graça Chico

Supervisora:

Prof^a. Doutora: Maria Perpétua Scarlet

Co-supervisor:

Mestre: Jossias Duvane

Maputo, Setembro de 2024

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus pela vida, por sua presença constante em todos os momentos da minha vida.

A minha supervisora a Prof^ª. Doutora Maria Perpétua Scarlet, por todo empenho, pelas coerentes observações ao meu trabalho, sabedoria, compreensão, incentivo, referência bibliográfica, livros e artigos científicos, que orientaram-me na realização deste trabalho.

Ao meu co-supervisor o Mestre Jossias Duvane, pelo suporte, paciência, observações, disponibilidade para orientar-me a entender o programa ImageJ e apoio em artigos científicos.

Ao corpo docente integrante do projecto “Ocean Acidification” financiado pela Western Indian Ocean Marine Science (WIOMSA), nomeadamente: o Prof. Doutor Adriano Macie, a Prof^ª. Doutora Daniela De Abreu, ao Mestre Mizeque Mafambissa, a Mestre Damboia Cossa, por acolherem-me no projecto, pelo aprendizado e conhecimento que recebi durante a realização do projecto e puder realizar este trabalho.

As colegas da equipe do projecto “Ocean Acidification” nomeadamente: a Carolina, a Emelda, a Minda, a Sibelle, a Carmen e a Yudmila, por todo trabalho em equipe, pela troca de conhecimento.

A todos docentes do curso BMAC da Universidade Eduardo Mondlane, por todo conhecimento e aprendizado partilhado ao longo do curso.

A minha querida mãe Graça Chico Munglês e aos meus irmãos Iyan da Graça Chico, Neurissi da Graça Chico, por todo amor, apoio e pela confiança depositada em mim, para que realizasse o meu sonho.

Aos meus tios Venâncio Vilanculos e Cacilda Vilanculos, primos: Inoque da Graça Chico, Amilcar, Eurico Vilanculos, Hirondina Vilanculos, Saugina Vilanculos por todo apoio e confiança.

Aos meus amigos, Tânia Bule, Célia Matsine, Flávia Rugo, Sofia Amade, Eugênio Tambo, Agostinho Laquino e a todos colegas pelo apoio, incentivo seguir atrás do dos meus sonhos.

Declaração de Honra

Eu, Aceleit Herca da Graça Chico, estudante da Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas, do curso de Licenciatura em Biologia Marinha Aquática e Costeira, declaro por minha honra que este relatório é resultado da minha investigação, que pode ser comprovado pela bibliografia referente às fontes consultadas durante o processo de pesquisa e está a ser submetido para aquisição do grau de Licenciatura em Biologia Marinha Aquática e Costeira, na Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

A Autora

(Aceleit Herca da Graça Chico)

Maputo, Setembro de 2024

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe Graça Chico Munglês e aos meus irmãos Inoque da Graça Chico Munglês, Elyan Iyan da Graça Chico Munglês e Neurissi Mila da Graça Chico Munglês, que me apoiaram incondicionalmente nessa longa caminhada, é por eles que batalhei para obter o grau de licenciatura

Resumo

O aumento das emissões de CO₂ na atmosfera devido á acção antropogénica, tem causado a acidificação dos oceanos. A acidificação dos oceanos tem impactado negativamente a vida marinha, especialmente aos animais calcificadores. Esta pesquisa teve como objecto de estudo avaliar a sensibilidade de larvas dos ouriços-do-mar *Tripneustes gratilla*, à variação do pH marinho para compreender os limites fisiológicos de tolerância á acidificação oceânica. Para tal, testou-se o efeito do pH sobre as taxas de sobrevivência, crescimento do corpo e dos braços, calcificação e índice de simetria entre os braços de larvas de *T. gratilla* de Bangua (Ilha de Inhaca). As larvas foram cultivadas durante 7 dias em 4 tratamentos de pH (8.04, 7.67, 7.46 e 7.29), que representam o pH actual e futuro do seu habitat natural. A redução do pH diminui significativamente as taxas de sobrevivência, crescimento, calcificação e índice de simetria entre os braços de larvas. O limite fisiológico de tolerância á acidificação oceânica destas larvas situa-se entre o pH 7.67 e pH 8.04. Se o pH do mar continuar a diminuir conforme sugerido pelos modelos actuais, pode-se esperar morte massiva de organismos marinhos calcificadores no futuro.

Palavras-chaves: acidificação oceânica, sobrevivência, crescimento morfométrico, calcificação, ouriço-do-mar, Bangua (Ilha de Inhaca).

Lista de Abreviaturas

ANOVA- Análise de Variância;

B- Banguá;

AO- Acidificação Oceânica;

CaCO₃- Carbonato de cálcio;

CO₂- Dióxido de carbono;

EBMI- Estação de Biologia Marítima de Inhaca;

BMAC- Biologia Marinha Aquática e Costeira;

NaCl- Cloreto de sódio;

pCO₂- Pressão parcial do gás carbônico;

PFA- Paraformaldeído;

TIFF- Tagged Image File Format;

GIF- Graphics Interchange Format;

JPEG- Joint Photographic Experts Group;

BMP- Windows Bitmap;

DICOM- Digital Imaging and Communications in Medicine;

FITS- Flexible Image Transport System;

“**CRUS**”- Carta do Regime do Uso do Solo;

T. ciliatum- *Talassadendron ciliatum*;

T. gratilla- *Tripneustes gratilla*;

WIOMSA- Western Indian Ocean Marine Science Association.

Lista de Figuras

Figura 1. Variação do pH marinho na Ilha de Inhaca (Bangua).....	2
Figura 2. Morfologia de <i>T. gratilla</i>	5
Figura 3. Face aboral e oral de ouriço-do-mar.....	5
Figura 4. Ciclo de Vida de <i>T. gratilla</i>	8
Figura 5. Mapa do Local da amostragem Bangua (Ilha de Inhaca).....	13
Figura 6. Processo de colecta e transporte de <i>T. gratilla</i>	16
Figura 7. Esquema ilustrativo da técnica de indução por injeção de 20 µl NaCl em ouriços-do-mar e processo de colecta dos gâmetas de <i>T. gratilla</i>	17
Figura 8. Relação entre a taxa de sobrevivência de larvas de <i>T. gratilla</i> e o pH.....	23
Figura 9. Relação entre a taxa de crescimento de larvas de <i>T. gratilla</i> e o pH.....	23
Figura 10. <i>T. gratilla</i> . Desenvolvimento larval (crescimento e desenvolvimento dos braços das larvas).....	24
Figura 11. Relação entre a taxa do comprimento dos braços grandes de larvas de <i>T. gratilla</i> e o pH.....	25
Figura 12. Relação entre o índice de simetria dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i> e o pH.....	25
Figura 13. Relação entre a taxa de calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i> e o pH.....	26
Figura 14. <i>T. gratilla</i> . Calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i> durante os 7 dias de cultivo.....	26 e 27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Modelo dos tratamentos (pH).....	18
Tabela 2. Resumo da química do carbonato.....	22
Tabela 3. Resultados da análise de regressão da sobrevivência de larvas de <i>T. gratilla</i>	44
Tabela 4. ANOVA dos dados dos parâmetros observados (sobrevivência, crescimento, comprimento do braço grande, simetria dos braços e calcificação).....	44 e 45
Tabela 5. Teste de Tukey dos dados de sobrevivência de larvas de <i>T. gratilla</i> criadas em tratamentos de pH.....	46
Tabela 6. Resultados da análise de regressão do crescimento de larvas de <i>T. gratilla</i>	46
Tabela 7. Teste de Tukey dos dados de crescimento de larvas de <i>T. gratilla</i>	46
Tabela 8. Resultados da análise de regressão do comprimento dos braços grandes de larvas de <i>T. gratilla</i>	47
Tabela 9. Teste de Tukey dos dados do comprimento dos braços grandes de larvas de <i>T. gratilla</i> ...	47
Tabela 10. Resultados da análise de regressão da simetria dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i>	47 e 48
Tabela 11. Teste de Tukey dos dados da simetria dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i>	48
Tabela 12. Resultados da análise de regressão da calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i>	48
Tabela 13. Teste de Tukey dos dados da calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i>	49

Índice

Agradecimentos	I
Declaração de Honra.....	II
Dedicatória.....	III
Resumo	IV
Lista de Abreviaturas	V
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tabelas	VII
1. Introdução	1
2. Problema	2
3. Justificativa	3
4. Revisão Bibliográfica	4
4.1. Classificação taxonómica.....	4
4.2. Características Morfológicas.....	4
4.3. Distribuição Geográfica	6
4.4. Habitat	6
4.5. Alimentação	7
4.6. Reprodução e crescimento	7
4.7. Predação	8
4.8. Mortalidade	9
4.9. Acidificação Oceânica	9
5. Objectivos	10
5.1. Geral.....	10
5.2. Específicos	10
6. Hipóteses	11
7. Área de Estudo.....	12
8. Material e Metodologia.....	14
8.1. Materiais.....	14

8.1.1. Material não biológico.....	14
8.1.2. Material biológico	15
8.1.3. Reagentes.....	15
8.2. Metodologia	16
8.2.1. Coleta e manutenção de <i>T. gratilla</i>	16
8.2.2. Obtenção de gâmetas e fertilização	16
8.2.3. Experiência	17
8.2.4. Software ImajeJ	19
8.2.5. Taxa sobrevivência de larvas de <i>T. gratilla</i>	19
8.2.6 Taxa de Crescimento do corpo de larvas de <i>T. gratilla</i>	20
8.2.7. Taxa do comprimento dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i>	20
8.2.8. Índice de Simetria dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i>	21
8.2.9. Taxa de Calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i>	21
8.2.10. Análise de dados.....	21
9. Resultados.....	22
9.1. Química dos carbonatos (tratamentos).....	22
9.2. Taxa de sobrevivência de larvas de <i>T. gratilla</i>	22
9.3. Taxa de crescimento de larvas de <i>T. gratilla</i>	23
9.4. Taxa de comprimento dos braços grandes de larvas de <i>T. gratilla</i>	24
9.5. Índice de simetria dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i>	25
9.6. Calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i>	26
10. Discussão	28
10.1. Sobrevivência de larvas de <i>T. gratilla</i>	28
10.2. Crescimento de larvas de <i>T. gratilla</i>	28
10.3. Comprimento dos braços grandes de larvas de <i>T. gratilla</i>	29
10.4. Índice de simetria dos braços de larvas de <i>T. gratilla</i>	29
10.5. Calcificação de larvas de <i>T. gratilla</i>	29

11. Limitações.....	31
12. Conclusão	32
13. Recomendações	33
14. Referências Bibliográficas	34
15. Anexos	44

1. Introdução

Desde o ano de 1750, a absorção oceânica de carbono antropogénico tem sido responsável pela diminuição do pH e alteração da química dos carbonatos do oceano, fenómeno denominado acidificação dos oceanos (Caldeira e Wickett, 2003; Bernstein *et al.*, 2007).

Estas alterações modificam a dinâmica dos ecossistemas marinhos e impactam negativamente os organismos marinhos, através do aumento da mortalidade, diminuição da fecundidade ou redução do sucesso da fertilização (Csirke, 2005; Orr *et al.*, 2005; Rockstrom *et al.*, 2009; Steffen *et al.*, 2015), principalmente os organismos que dependem do processo de calcificação para a formação das suas partes esqueléticas tais como: corais, equinodermes, pterópodes, bivalves, moluscos, crustáceos, etc. (Porter *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 2007).

Em estudos anteriores, concluiu-se que os equinodermes eram surpreendentemente robustos à variação do pH do seu habitat natural e o ouriço-do-mar, foi identificado como o modelo principal de estudos de investigação sobre acidificação dos oceanos (Dupont *et al.*, 2010a). Entretanto, no contexto da acidificação oceânica, o baixo pH aumenta o custo energético para a homeostase do pH intracelular e manutenção da alcalinidade gástrica das larvas de ouriço-do-mar. A realocação da energia para a homeostase compromete o crescimento e outras características relacionadas ao “fitness” (Stump *et al.*, 2012, 2013). Consequentemente, o sucesso do recrutamento e a persistência das populações adultas será afectado, o que pode levar a extinção de muitas espécies marinhas (Brennand *et al.*, 2010).

Um dos equinodermes afectados pela acidificação oceânica é o ouriço-do-mar, em particular a *T. gratilla*, por conta do processo de formação das suas espículas calcárias e desenvolvimento da larva que é muito frágil (James e Unwin, 2007).

Este trabalho teve como finalidade avaliar a sensibilidade de *T. gratilla*, à variação do pH marinho através dos limites fisiológicos de tolerância á acidificação oceânica e para tal, testou-se o efeito do pH sobre as taxas de sobrevivência, crescimento e calcificação de larvas de *T. gratilla* de Banguá, na Ilha de Inhaca.

2. Problema

O aumento das emissões antropogénicas de CO₂ na atmosfera, tem causado o aumento da acidificação oceânica (AO), o que tem criado um impacto negativo sobre organismos marinhos calcificadores tais como, algas calcárias, moluscos, crustáceos, equinodermes e corais. O aumento de AO, pode causar um possível colapso ambiental e perda da diversidade marinha (Ricklefs, 2010; Gazeau *et al.*, 2013; Silveira *et al.* 2014). Os ouriços-do mar podem viver nos cascalhos de coral, areias arenosas e lamacentas, lagoas, zonas intertidais e subtidais, pradarias de algas e em tapetes de ervas marinhas expostas ao ar e intensidade luminosa, em marés baixas e cobertas pela água em marés altas. A variação do pH marinho em tapetes de ervas marinhas é comum em ambientes costeiros (Hofmann *et al.*, 2011), por isso, organismos que vivem nos tapetes de ervas marinhas experimentam condições de acidificação oceânica (similares ao pH previsto para o futuro), em determinados períodos da sua vida. Por exemplo, o estudo preliminar de Wiomsa (2022) mostrou que os tapetes de ervas marinhas do EBMI na Ilha de Inhaca são caracterizados por variação do pH de 8.3 à 7.8, os organismos marinhos que lá habitam são expostos em determinados momentos ao pH projectado para o ano de 2050 (Figura 1). Porque os ouriços-do-mar, *T. gratilla* que habitam em tapetes de ervas marinhas de Bangua (Ilha de Inhaca) são expostos a estas condições ambientais e de acidificação, pretende-se com este trabalho avaliar a sensibilidade de larvas de *T. gratilla* à variação do pH marinho para compreender os limites fisiológicos de tolerância á acidificação oceânica.

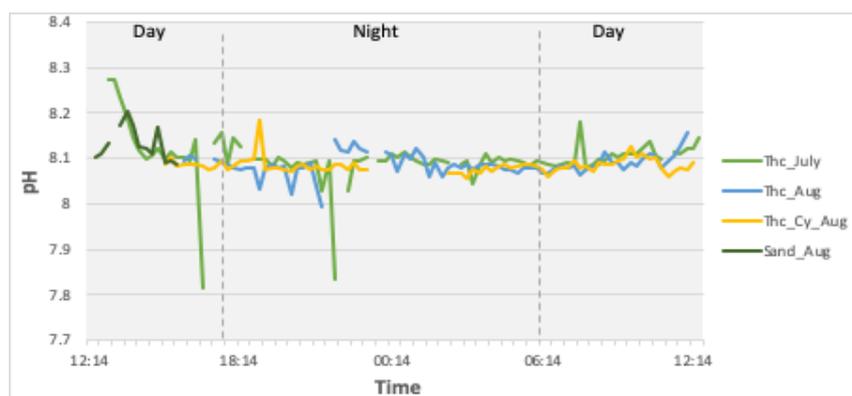


Figura 1. Variação do pH marinho em diferentes substratos de ervas marinhas na Ilha de Inhaca em 2022. Em Julho no período da manhã houve maior variação do pH nas ervas marinhas *Talassadendron*, no período da noite houve menos variação do pH nas ervas marinhas do género *Talassadendron* e no período da tarde a variação estabilizou. Em Agosto, no período da manhã houve menos variação do pH nas ervas marinhas cymodáceas e areia, há noite houve maior variação do pH nas ervas marinhas *Talassadendron* e cymodáceas e há tarde houve menos variação do pH nas ervas marinhas *Talassadendron* e *Cymodáceas* (Wiomsa, 2022).

3. Justificativa

Os ouriços-do-mar *T. gratilla*, apresentam um papel específico como "engenheiros de ecossistemas" (Valentine e Edgar, 2010). Estes organismos ajudam na regulação da densidade de algas contribuindo assim, na prevenção da ocorrência do efeito bloom e aumento da cobertura das algas coralinas crustosas (Stimson *et al.*, 2007; Toha *et al.*, 2017).

A espécie *T. gratilla* está também associada a reciclagem dos fundos dos oceanos possibilitando o transporte dos nutrientes do fundo dos oceanos para as águas superficiais, podendo também ser usado como bioindicador de contaminação de metais pesados (Toha *et al.*, 2017).

Os ouriços-do-mar são muito importantes para a farmacologia, seu esqueleto contém compostos bioativos úteis para a descoberta de novas drogas, medicamentos e pesquisas farmacológicas (Nakagawa *et al.*, 2003).

Os ouriços-do-mar são fonte de alimentação de muitos organismos marinhos como peixes, estrelas-do-mar, gastrópodes (Brennand *et al.*, 2010) contudo, contribuem para o desenvolvimento da economia de vários países (Branch *et al.*, 2012). As suas ovas são um recurso alimentar comercialmente valioso, por isso, muitos países praticam a aquicultura de *T. gratilla* para o posterior comércio (Lawrence e Agatsuma, 2013). *T. gratilla* é uma fonte importante de renda, emprego, alimentação de muitas comunidades de zonas costeiras em todo o mundo, podendo ser explorados para a subsistência ou mesmo para o comércio (Orr *et al.*, 2005), e em particular na Ilha da Inhaca (Fernando, 2011).

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Classificação taxonômica

Segundo Kroh, (2013) e Toha *et al.*, (2017), *T. gratilla* (Linnaeus, 1758) é uma espécie de ouriço-do-mar, pertencente ao:

Reino Animalia,

Filo Echinodermata,

Subfilo Echinozoa,

Classe Echinoidea,

Subclasse Euechinoidea,

Infraclasse Carinácea,

Superordem Echinacea,

Ordem Camarodonta,

Infraordem Echinidae,

Superfamília Odontophora,

Família Toxopneustidae,

Gênero *Tripneustes* (*T*) e

Espécie *T. gratilla*

4.2. Características Morfológicas

T. gratilla possui um corpo redondo denominado corona ou teste, dividido em duas faces a aboral e a oral, com características morfológicas distintas onde a face oral (inferior) encontra-se a boca com uma estrutura raspadora dotada de cinco dentes, designada lanterna-de-Aristóteles e na face aboral (superior) encontra-se o ânus (Figura 3). Os ouriços da espécie *T. gratilla*, apresentam variadas cores, com espinhos pelo corpo e pés tubulares movidos para defesa, alimentação e locomoção. Os adultos podem medir um diâmetro de teste (corpo) de 10-15 centímetros e 4 a 6 polegadas de tamanho (Toha *et al.*, 2017) (Figura 2).

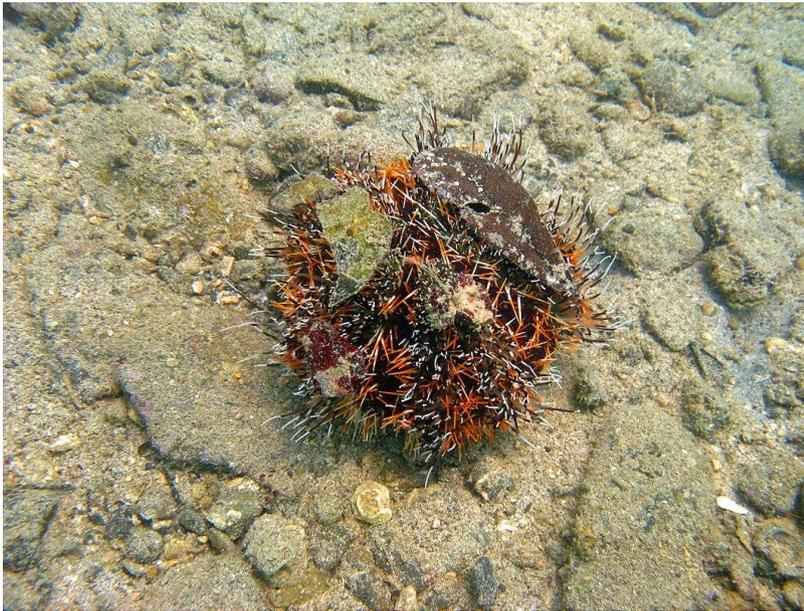


Figura 2. Morfologia de *T. gratilla*. É redondo de cor roxo-azulado com espinhos brancos e laranja, diferentes caracteres morfológicos, sua superfície corporal possui coluna curta colorida e pés tubulares e corpo (denominado corona ou teste) dividido em superfície aboral e oral. Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/22/Tripneustes_gratilla_Asia.jpg/1067pxTripneustes_gratilla_Asia.jpg. Acessado no dia 15/04/2024.

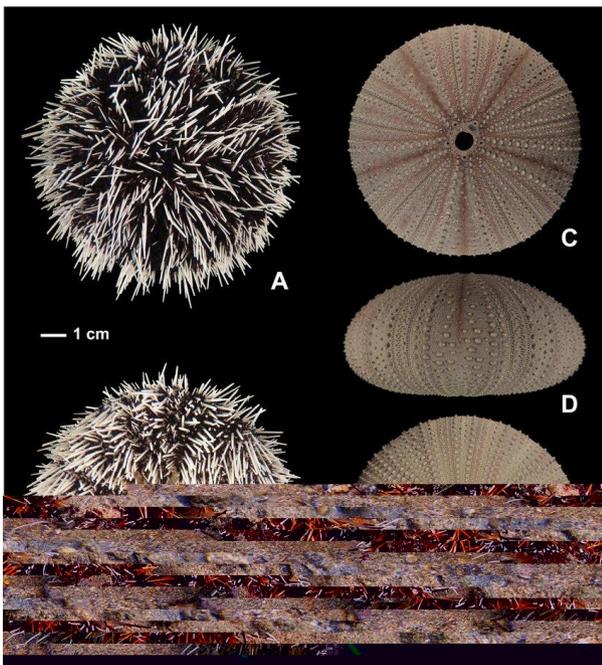


Figura 3. Face aboral e oral de ouriço-do-mar. A e C superfície aboral (ânus) do ouriço-do-mar; D- corpo de ouriço-do-mar e B e E superfície oral (boca) do ouriço-do-mar. <https://www.researchgate.net/publication/318571431/figure/fig1/AS:613900663918624@1523376732981/External-appearance-A-B-and-corona-C-E-of-Tripneustes-kermadecensis-n-sp-Aboral.png> Acessado no dia 15/04/2024.

marinhas (Tertsching, 1989). No entanto, os principais predadores da *T. gratilla* em áreas protegidas, substratos duros e ásperos são as estrelas-do-mar (*Protoreaster lincki*) (Shears e Babcock 2002, Bonaviri *et al.*, 2009; Eklof *et al.*, 2009). *T. gratilla* é também capturada por humanos por causa das suas deliciosas gônadas (Tertsching, 1989).

4.8. Mortalidade

A mortalidade em *T. gratilla* é causada por diversos factores que incluem, chuvas sazonais e mau tempo (Vaïtilingon *et al.*, 2005), diminuição da recuperação (Ebert, 1982), sucessão (Dafni e Tobol, 1986; Dafni, 1992), aprisionamento em águas rasas (Shimabukuro 1991), alteração do habitat, doenças, predação, morte natural (Junio-Menez, 2008) e muitos outros factores desconhecidos (Eklof *et al.*, 2009).

4.9. Acidificação Oceânica

Nos últimos 200 anos, vem-se registando um aumento significativo nas emissões do gás CO₂ na atmosfera, o que têm causado a acidificação dos oceanos. O aumento dos níveis de emissão de CO₂ na atmosfera é devido aos factores antropogénicos como, à intensificação da industrialização, agricultura mecanizada, produção de cimento e o uso da terra (Bernstein *et al.*, 2007).

AO é o fenómeno de decréscimo de pH dos oceanos a partir da absorção de CO₂ atmosférico, diminuindo a concentração de CO₂, alcalinidade total e o estado de saturação de aragonite e calcite. Estas alterações modificam a dinâmica dos ecossistemas marinhos e tem sido um desafio para a adaptação de diversas espécies dependentes do ciclo de carbono inorgânico do oceano (Csirke, 2005; Orr *et al.*, 2005).

Estas alterações podem acontecer ao nível do decréscimo de saturação do carbonato de cálcio (CaCO₃) (Fabry *et al.*, 2008) ou por via de distúrbios ácido-base (metabólicos), afectando assim, a reprodução, o crescimento de populações marinhas e principalmente os organismos que dependem do processo de calcificação para a formação das suas partes esqueléticas como espículas, conchas e exoesqueletos (ex.: de corais, equinodermes, pterópodes, bivalves, crustáceos, etc.) (Porter *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 2007).

5. Objectivos

5.1. Geral

- Avaliar a sensibilidade à variação do pH marinho, sobre a taxa de sobrevivência, crescimento do corpo e dos braços, calcificação e índice de simetria entre os braços de larvas de *Tripneustes gratilla* de Bangua (Ilha de Inhaca).

5.2. Específicos

- Determinar a taxa de sobrevivência de larvas de *T. gratilla*, nos diferentes tratamentos de pH;
- Determinar as taxas de crescimento do corpo e dos braços e o índice de simetria entre os braços de larvas de *T. gratilla*, para os diferentes tratamentos de pH;
- Determinar as taxas de calcificação de larvas de *T. gratilla*, para os diferentes tratamentos de pH;
- Comparar a taxa de sobrevivência de larvas de *T. gratilla*, entre os diferentes tratamentos de pH;
- Comparar as taxas de crescimento do corpo e dos braços o índice de simetria entre os braços de larvas de *T. gratilla*, entre os diferentes tratamentos de pH
- Comparar as taxas de calcificação de larvas de *T. gratilla*, entre os diferentes tratamentos de pH;
- Identificar os limites fisiológicos de larvas de *T. gratilla* ao pH marinho;

6. Hipóteses

Ho: As taxas de sobrevivência, crescimento do corpo e dos braços, calcificação e índice de simetria entre os braços de larvas de *T. gratilla* não são afectadas pela redução do pH da água do mar.

H1: As taxas de sobrevivência, crescimento do corpo e dos braços, calcificação e índice de simetria entre os braços de larvas de *T. gratilla* são afectadas pela redução do pH da água do mar.

Ho: Os limites fisiológicos de larvas de *T. gratilla* estão abaixo do pH mínimo da variação natural das ervas marinhas.

H1: Os limites fisiológicos de larvas de *T. gratilla* não estão abaixo do pH mínimo da variação natural das ervas marinhas.

7. Área de Estudo

A Ilha de Inhaca localiza-se á entrada da baía de Maputo, no sul de Moçambique na parte mais a norte da ecoregião do Maputaland (Figura 5) (EBMI, 2021), com as seguintes coordenadas geográficas 26°S de latitude e 33° E de longitude, ocupando uma área de 42km² com dimensões de norte-sul de 12,5km (entre a Ponta Mazondue, a norte e a Ponta Torres, a sul) e a este-oeste de 7km. Ela encontra-se a 32km a leste da cidade de Maputo, cujo município faz parte administrativamente, constituindo um distrito municipal de nome KaNyaka (Lopes, 2011).

Clima e Relevo

A Ilha da Inhaca, situa-se numa região de transição de clima tropical a clima temperado quente, com duas estações distintas, Verão quente e chuvoso e Inverno fresco e seco. A temperatura média no verão (Outubro a Março) é de cerca de 24.7°C e no inverno (Abril a Setembro) aproxima-se a 21°C (Pereira, 2000). A ilha é formada por planícies dunares, com solos arenosos pouco evoluídos. A humidade relativa mais alta atinge 82,1% e a evaporação de variações moderadas alcança em média 100mm/mês. A corrente quente do Canal de Moçambique que banha a ilha e a insularidade são os principais responsáveis pelo relativo aumento da humidade (Moreira, 2005).

Flora e Fauna

A ilha possui uma grande diversidade biológica com cerca de 12000 espécies registadas, 150 espécies de corais, mais de 300 espécies de aves, 9 espécies de ervas marinhas, 115 espécies de moluscos, 75 espécies de equinodermes, 13 espécies de mamíferos terrestres, 37 espécies de répteis, mais de 800 espécies de insectos, 600 espécies de peixes, 200 espécies de crustáceos, 7 espécies de mamíferos marinhos e 4 espécies de tartarugas marinhas que tem como local de nidificação a zona costeira da ilha. Toda a zona costeira da ilha é rodeada por dunas cobertas de vegetação natural, sendo, protegidas pelo Parque Nacional de Maputo, sob a responsabilidade da Estação de Biologia Marítima de Inhaca, que é um órgão da Universidade Eduardo Mondlane (Moreira, 2005; EBMI, 2021). Devido a sua grande diversidade em termos de ecossistemas e existência de condições ecológicas distintas, a Ilha de Inhaca é reconhecida ao nível internacional como uma zona de grande importância na conservação da biodiversidade (EBMI, 2021).

Comunidade

A população residente na ilha vive com base na agricultura, exploração de recursos florestais (incluindo os mangais), comércio e pesca. As florestas terrestres ou do mangal da ilha são fontes de vários produtos madeireiros e não madeireiros, as populações retiram a lenha, os frutos silvestres,

medicamentos a partir de plantas medicinais, material de construção e etc. Algumas áreas da floresta são utilizadas para a prática da agricultura (Barbosa, 1995).

O local da amostragem foi Bangua que é uma zona intertidal, coberta por tapetes de ervas marinhas e organismos marinhos. Na maré baixa os tapetes de erva marinhas ficam expostos ao ar e a luz solar, nas marés altas cobertas por água do mar.

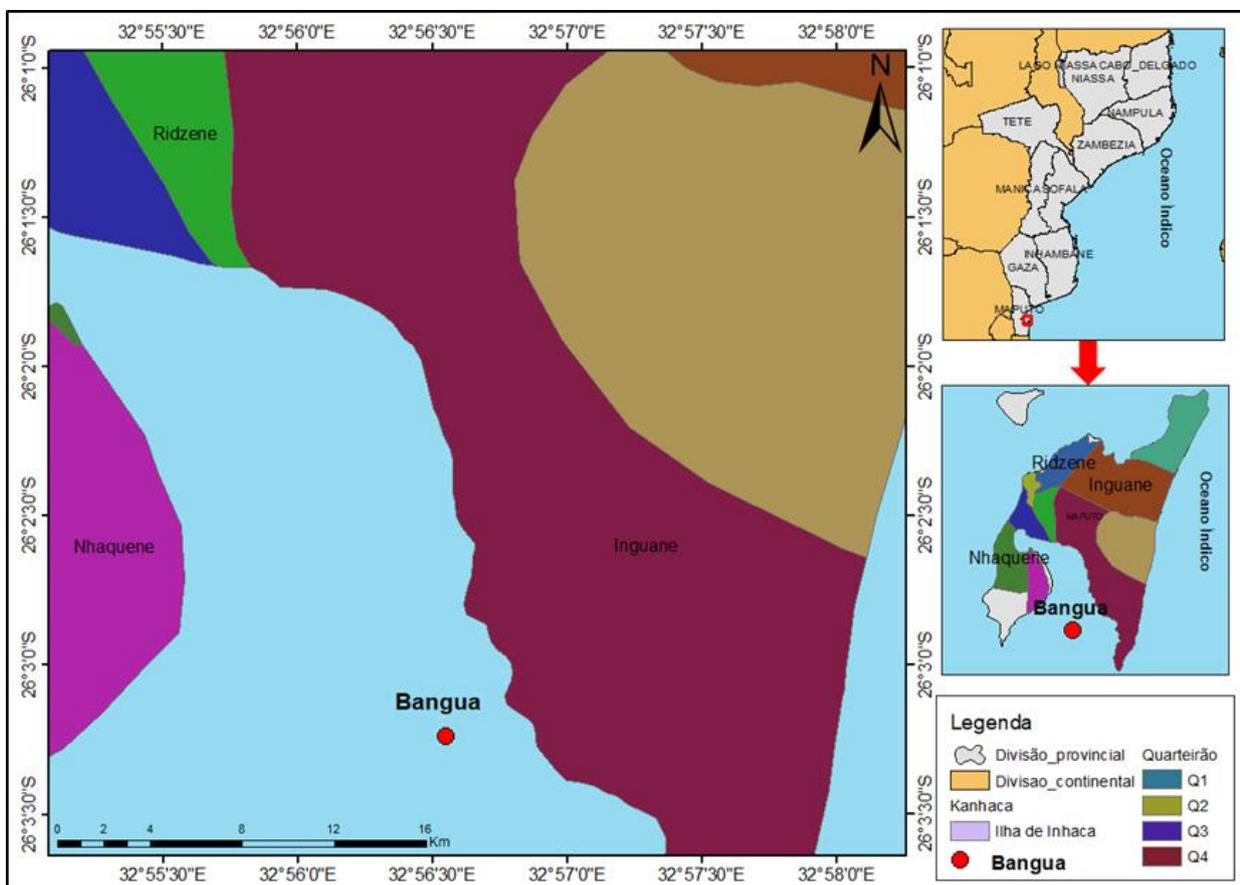


Figura 5. Mapa do Local da amostragem Bangua (Ilha de Inhaca). Fonte: ArcGis adaptado por Aceleit Chico (2024).

8. Material e Metodologia

8.1. Materiais

8.1.1. Material não biológico

- 10 Aquários;
- Pipetas;
- Copos de Becker;
- Água oxigenada;
- Bacias/baldes;
- Medidor de pH;
- Luvas (pequenas, médias e grandes);
- Tina plástica;
- Balança analítica;
- Pinça;
- Agulha;
- Aeradores;
- Bolinhas de aeradores;
- Tubos (conectados nas bombas);
- Provetas;
- Água do mar da EBMI (Ilha de Inhaca);
- Uma mangeira;
- Bidons de 25l e baldes de 50l;
- Barco;
- Escova de Nylon;
- Tigelas;
- Mangueiras para limpeza de aquários;
- Filtros (40nm e 70nm de malhagem);
- Algodão para filtros;
- Areia fina e grossa;
- Carvão;
- Termômetros;
- Termostatos;
- Banho-maria;
- Seringas 1ml;
- Placas de alumínio;

- Tubos eppendorfs;
- Micropipetas (2-20 μ l; 30-200 μ l e 1000-5000 μ l);
- Pontas de micropipetas (amarelas, azuis e brancas);
- Placas de 12 poços;
- Erlenmeyer (250ml);
- Copos Becker (250ml);
- Balão volumétrico (250ml);
- Lâminas;
- Lamelas;
- Álcool a 70% (5l);
- 2 Borrifadores;
- Conta-gotas;
- Sabão neutro;
- Sonda de pH;
- 2 Caixas de Garrafas tampa azul (1l);
- Buffers de calibração;
- Lupa;
- Microscópio óptico;
- Computador;
- Hemocitómetro.

8.1.2. Material biológico

- Amostras de *T. gratilla*, da Ilha de Inhaca (Bangua);
- Ervas Marinhas (*T. ciliatum*);
- Suspensão de algas criptófitas (*Rhodomonas sp.*).

8.1.3. Reagentes

- NaCl a 0,5 N;
- Ácido clorídrico;
- Paraformaldeído (4%);
- Álcool a 70%.

8.2. Metodologia

8.2.1. Coleta e manutenção de *T. gratilla*

A colecta de *T. gratilla* decorreu em Novembro de 2021 onde, durante a maré baixa fez-se a colecta de 12 ouriços-do-mar (*T. gratilla*) e os indivíduos de interesse para a experiência foram 6 fêmeas e 6 machos sexualmente maduros com diâmetro do corpo entre 9-15cm, uma vez que com esse diâmetro atingem a maturidade (Toha *et al.*, 2017), em Bangua, que está localizada nos tapetes de ervas marinhas intertidais (Figura 5 e 6A). Após a colecta, os espécimes foram transportados em baldes com água salgada do local da amostragem para o laboratório da EBMI (Figura 6B e 6C), onde foram mantidos em aquários previamente identificados.

O laboratório da EBMI foi o local onde decorreram todos procedimentos que culminaram com a experiência.



Figura 6. Processo de colecta (A) e transporte (B e C) de *T. gratilla* (Fotografado por Adriano Macia).

Diariamente, fez-se a troca de água dos aquários. Os ouriços foram aclimatizados à 24°C num mínimo de 24h antes do início do trabalho experimental e alimentados de dois em dois dias na base das ervas marinhas da espécie *T. ciliatum*, colectadas nos tapetes de ervas marinhas da EBMI.

8.2.2. Obtenção de gâmetas e fertilização

No laboratório, os gâmetas (óvulos e espermatozóides) foram obtidos através da injeção de 20µl de NaCl na região perioral (Figura 7A) do ouriço em pontos com diâmetros opostos, para facilitar a libertação de gâmetas através dos gonóporos, que estão localizados na região aboral do animal (Figura 7B). Um aspecto importante de se notar foi que, os gâmetas que apresentaram a cor branca e leitosa tratavam-se de machos e as amareladas ou alaranjadas de fêmeas (Figura 7B e 7C). No caso

de fêmea, a desova foi feita num copo de bécker preenchido com água do mar, com a superfície aboral voltada para baixo de forma que os gonóporos permanecessem imersos na água (Figura 7C). No caso dos machos, os espermatozóides foram colectados com o auxílio de uma pipeta de 100-200µl, transferidos para um tubo de Eppendorf (Figura 7B) e conservados a frio num copo de bécker com gelo a uma temperatura de +/- 1 a 0°C frio. A fertilização foi induzida pela adição de 25µl de espermatozóides previamente activados em água do mar filtrada. O sucesso da fertilização foi próximo de 100% e levou em torno de 30min para o aparecimento da primeira divisão celular. Este método para obtenção de gâmetas e fertilização foi descrito por (Dupont em preparação). Antes do início do experimento, os gâmetas foram submetidos a um teste para verificar a compatibilidade na fertilização, onde, foi colocada uma gota de suspensão de óvulos na lâmina e adicionou-se meia gota de espermatozóides para poder observar através do microscópio a presença ou não da fertilização (Dupont em preparação).

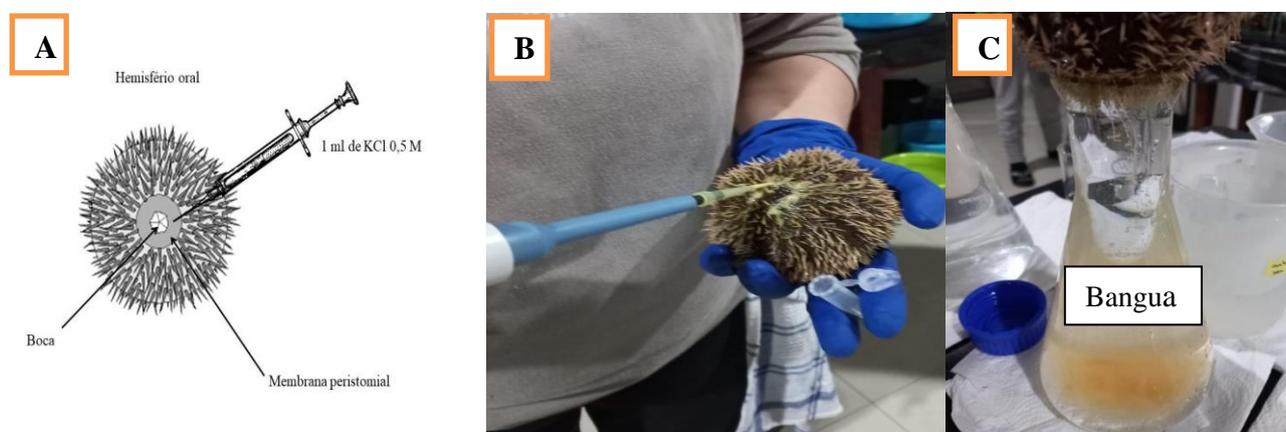


Figura 7. A- Esquema ilustrativo da técnica de indução por injeção de 20µl NaCl em *T. gratilla*. https://www.google.com/imgres?imgurl=x-rawimage%3A%2F%2F%2F665a3f40cc8296f8dd8edb02ada5242fac9dce6a645c56eac129bf2d860af942&tbnid=JaCzEA_WmZhAM&vet=1&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.ipma.pt%2Fexport%2Fsites%2Fipma%2Fbin%2Fdocs%2Fpublicacoes%2Fipma%2Frct-ipma-sd-20.pdf&docid=umbf7LPch3hRM&w=960&h=720&source=sh%2F%2Fim%2Fm1%2F2&kgs=bdbf57e8315a5575&shem=abme%2Ctri_e Acessado no dia 06/05/2021; B- Esquema ilustrativo da retirada dos gâmetas masculinos (esperma). C- Processo de colecta de óvulos (gâmetas femeninos).

8.2.3. Experiência

A experiência de sensibilidade de larvas de *T. gratilla*, seguiu o protocolo de Dupont em preparação.

- **Desenho Experimental**

Para a experiência de sensibilidade de larvas de *T. gratilla* foram considerados 4 tratamentos em triplicado de pH (Tabela 1), destes, o 8.04 foi considerado como o pH controle, uma vez que representa o valor actual de pH obtido (no momento da experiência) da água do mar da EBMI e os restantes 3 tratamentos experimentais de pH representam um futuro aumento dos níveis de acidez do mar de, 7.67, 7.46 e 7.29 (Dorey *et al.*, 2013). Para cada tratamento foram estabelecidas 3 réplicas cada, totalizando 12 amostras (Tabela 1). Os 3 tratamentos de pH experimental foram alcançados pela mistura de água do mar (filtrada) e água do mar (filtrada) saturada com o CO₂, que foi obtido através do borbulhamento de CO₂ até atingir o pH desejado, medido e controlado por uma sonda de pH HI769819X- Hanna e pH computer (AquaMedic). A água utilizada para o experimento foi equilibrada no pH alvo em baldes de 50l cheios (com água do mar filtrada) aerado.

E para o cultivo de larvas foram usadas garrafas de 1l de boro-silicato previamente lavadas e esterilizadas.

Tabela 1: Modelo dos tratamentos (pH). Tratamentos (pH), onde foram cultivados as larvas de *T. gratilla* com as respectivas réplicas, em garrafas de boro-silicato.

	Tratamentos (pHs)			
Réplicas (R)	Controle (8.04)	7.67	7.46	7.29
R1	B1.1	B2.1	B3.1	B4.1
R2	B1.2	B2.2	B3.2	B4.2
R3	B1.3	B2.3	B3.3	B4.3

- **Cultivo das larvas**

Os embriões fertilizados (estágio de duas células) foram transferidos para 12 garrafas de boro-silicato (1l) preenchidos até ao topo com água do mar saturada com o respectivo tratamento de pH (volume de 1138ml), garantindo que nenhuma bolha permanecesse na garrafa para evitar interação com a atmosfera e trocas gasosas que poderiam alterar o pH, a densidade final de embriões ficou em torno de 10 embriões por ml, dando início ao cultivo de larvas. Do primeiro ao último dia do cultivo, fez se o monitoramento e troca de água (com água do mar filtrada, areada previamente ajustada ao pH dos respectivos tratamentos contida nos baldes de 50l) em cada garrafa. As garrafas não foram

mantidas areadas. As culturas larvais foram monitoradas por 7 dias, mantidas a uma temperatura de 24°C e uma salinidade em torno dos 35. O pH, a temperatura e a alcalinidade total (AT) foram medidos diariamente em cada garrafa replicada seguindo o modelo de (Dickson *et al.*, 2007).

As larvas de *T. gratilla* foram alimentadas a partir do terceiro dia por uma suspensão alimentar de algas criptófitas (*Rhodomonas sp*) quando notou-se o aparecimento do intestino funcional, em concentrações variando de 397×10^4 células/l de água do mar (Guillard e Ryther, 1962; Mullin *et al.*, 1966).

Diariamente, uma subamostra de 10 ml de suspensão de larvas foi colectada de cada cultura e fixada em paraformaldeído (PFA) a 4% para análise posterior.

8.2.4. Software ImajeJ

É um software de computador de domínio público, destinado a processamento de imagens, desenvolvido no National Institutes of Health, que possibilita a exibição, edição, análise, processamento além da facilidade em salvar e imprimir imagens de 8 bits, 16 bits e 32 bits. Também é possível fazer a leitura de vários formatos de imagem, bem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS e “crus” (Gonzalez e Woods, 2009; Schneider *et al.*, 2012). O ImageJ 1.44p42 faz medições com maior facilidade e exatidão de imagens, as imagens do trabalho foram medidas em “ μm ” (Rasband, 1997–2012).

8.2.5. Taxa sobrevivência de larvas de *T. gratilla*

Do terceiro ao sétimo da criação de larvas, foram extraídas em cada réplica uma amostra de 10 ml, depois fixada em PFA e com o auxílio de uma lupa fez se a observação e contagem de larvas para estimar a taxa de sobrevivência (Marsh e Manahan 1999, Dorey *et al.*, 2013).

Os dados de sobrevivência foram convertidos usando a fórmula (Stumpp *et al.*, 2011):

$$1 + (10 / (1138 - 10))$$

Onde,

1138 – volume das garrafas (com suspensão das larvas) de cultivo em ml no primeiro dia da amostragem e esse valor foi mudando cada vez mais que se extraía 10 ml da amostra em cada réplica;

10 - volume em ml da suspensão das larvas.

8.2.6 Taxa de Crescimento do corpo de larvas de *T. gratilla*

A metodologia usada para determinação da taxa de crescimento foi baseado em (Dorey *et al.*, 2013), após a contagem das larvas para a sobrevivência, 10 larvas de cada subamostra (réplica) foram observadas com o auxílio do microscópio, onde tirou-se as respectivas fotografias (com computador conectado ao microscópio), no total 120 subamostras foram analisadas e fotografadas diariamente. No fim da experiência foram analisadas e fotografadas ao todo 600 larvas, para determinar as taxas de crescimento do corpo, braços e calcificação.

Para determinar as taxas de crescimento do corpo de larvas de *T. gratilla* foram utilizadas fotografias feitas no computador, onde com o auxílio do software ImageJ fez se a medição do corpo de cada larva (Rasband, 1997–2012; Dorey *et al.*, 2013).

Os dados do crescimento do corpo foram convertidos usando á fórmula (Stumpp *et al.*, 2011)

$$\frac{\text{valor}}{1.448}$$

onde,

1.448 - constante de conversão e

Valor - valor obtido da medição do corpo de cada larva.

8.2.7. Taxa do comprimento dos braços de larvas de *T. gratilla*

Para determinar as taxas do comprimento dos braços de larvas de *T. gratilla* foram utilizadas fotografias feitas no computador, onde com o auxílio do software ImageJ fez se a medição dos braços (pequeno e grande) de cada larva (Rasband, 1997–2012; Dorey *et al.*, 2013).

Os dados do comprimento dos braços (pequeno e grande) foram convertidos usando á fórmula (Stumpp *et al.*, 2011)

$$\frac{\text{valor}}{1.448}$$

onde,

1.448 - constante de conversão e

Valor - valor obtido da medição dos braços (pequeno, grande) de cada larva.

8.2.8. Índice de Simetria dos braços de larvas de *T. gratilla*

O índice de simetria dos braços de larvas de *T. gratilla* foi calculado com a razão entre o comprimento do braço pequeno e braço grande no programa Excel (Dorey *et al.*, 2013).

8.2.9. Taxa de Calcificação de larvas de *T. gratilla*

Para determinar as taxas de calcificação de larvas de ouriços-do-mar foram utilizadas fotografias feitas no computador, onde com o auxílio do software ImageJ fez se a medição e soma de todos elementos esqueléticos (bastões de calcita) de cada larva (Dorey *et al.*, 2013).

Os dados de calcificação foram convertidos com á fórmula (Stumpp *et al.*, 2011)

$$\text{valor} / (2 * 1.448)$$

onde,

2*1.448 - constante de conversão

valor - valor obtido da medição e soma de todos elementos esqueléticos de cada larva.

8.2.10. Análise de dados

Os dados foram limpos e organizados no excel, os modelos de regressão linear simples e exponencial foram utilizados para testar o tipo de relação entre as variáveis. O crescimento, a simetria dos braços e o braço grande foram transformados em logarítmos, de seguida, calculou-se as relações exponenciais. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 10.0. O software Prisma foi usado para a Construção dos Gráficos.

A normalidade, homogeneidade e variância foram confirmadas antes da análise, usando o teste de Levene para a homegeneidade, o teste de Shapiro-Wilk's-Wtest e Kolmogorov para a normalidade e o teste de ANOVA para a variância. As diferenças foram consideradas significativas para o valor p menor que 0,05 (P <0,05).

O teste post-hoc de Tukey foi conduzido para detectar diferenças entre as médias nos tratamentos.

9. Resultados

9.1. Química dos carbonatos (tratamentos)

Os parâmetros da química da água apresentaram maior variação entre os tratamentos e menos variação entre as réplicas do mesmo tratamento. Estes parâmetros foram significativamente diferentes entre tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo da química do carbonato (cada valor expresso como média±SEM);

pH alvo	Parâmetros medidos (média±SEM)				Parâmetros estimados (média±SEM)		
	Temperatura (°C)	Salinidade (psu)	pH _T	AT (μmol Kg ⁻¹)	pCO ₂ (μatm)	Ω _{calcite}	Ω _{aragonite}
7.3	21.8±0.08	35.3±0.15	7.287±0.01	2329.42±4.53	2668.72±25.03	1.04±0.02	0.68±0.01
7.5	21.7±0.08	35.3±0.15	7.463±0.01	2313.27±3.12	1673.48±28.32	1.56±0.01	1.02±0.01
7.7	21.7±0.06	35.4±0.13	7.665±0.01	2335.52±7.47	1015.48±8.52	2.41±0.03	1.58±0.02
7.8	21.7±0.10	35.3±0.12	7.786±0.03	2329.26±1.97	700.05±20.27	3.21±0.09	2.10±0.06
8.1	21.7±0.11	35.4±0.11	8.038±0.03	2322.03±11.33	317.77±31.45	5.53±0.27	3.62±0.18

9.2. Taxa de sobrevivência de larvas de *T. gratilla*

O pH elevado da água do mar teve um impacto negativo na taxa de sobrevivência de larvas (Anova, $P < 0.05$, Tabela 4). As larvas cultivadas no pH mais alto (pH 8.04) apresentaram maior taxa de sobrevivência que os restantes tratamentos (Tukey, $P < 0.05$, Tabela 5). Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre larvas cultivadas no pH 7.67 e pH 7.46 mas ambos apresentaram maior taxa de sobrevivência que as larvas no pH mais baixo pH 7.29 (Figura 8).

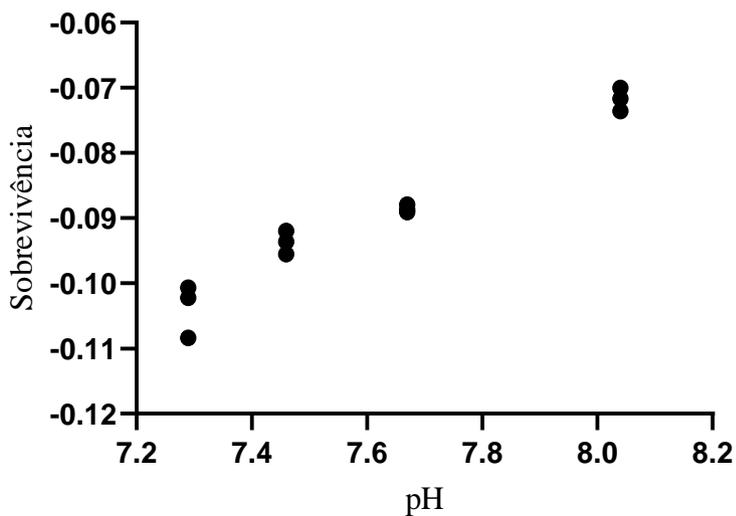


Figura 8. Relação entre a taxa de sobrevivência de larvas de *T. gratilla* e o pH.

9.3. Taxa de crescimento de larvas de *T. gratilla*

O pH elevado da água do mar teve um impacto negativo na taxa de crescimento de larvas (Anova, $P < 0.05$, Tabela 4). As larvas cultivadas no pH mais alto (pH 8.04) apresentaram maior taxa de crescimento que os restantes tratamentos (Tukey, $P < 0.05$, Tabela 7). Não houve diferença na taxa de crescimento entre larvas cultivadas no pH 7.67 e pH 7.46 mas ambos apresentaram maior taxa de crescimento que as larvas no pH mais baixo pH 7.29 (Figura 9 e Figura 10).

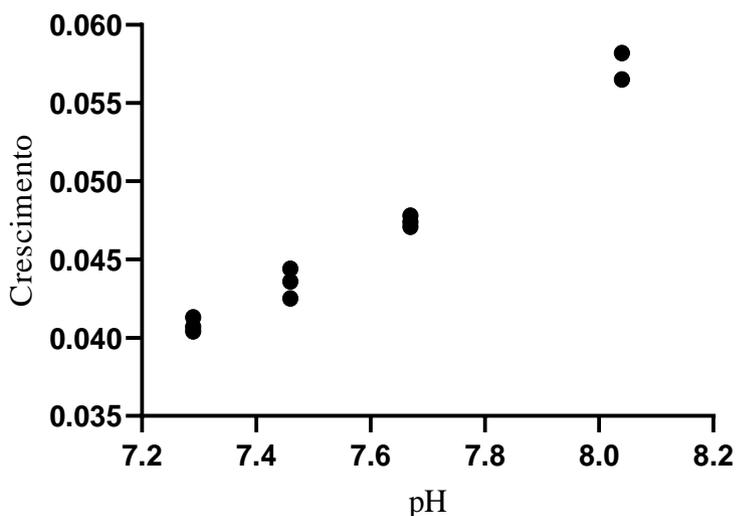


Figura 9. Relação entre a taxa do crescimento de larvas de *T. gratilla* e o pH.

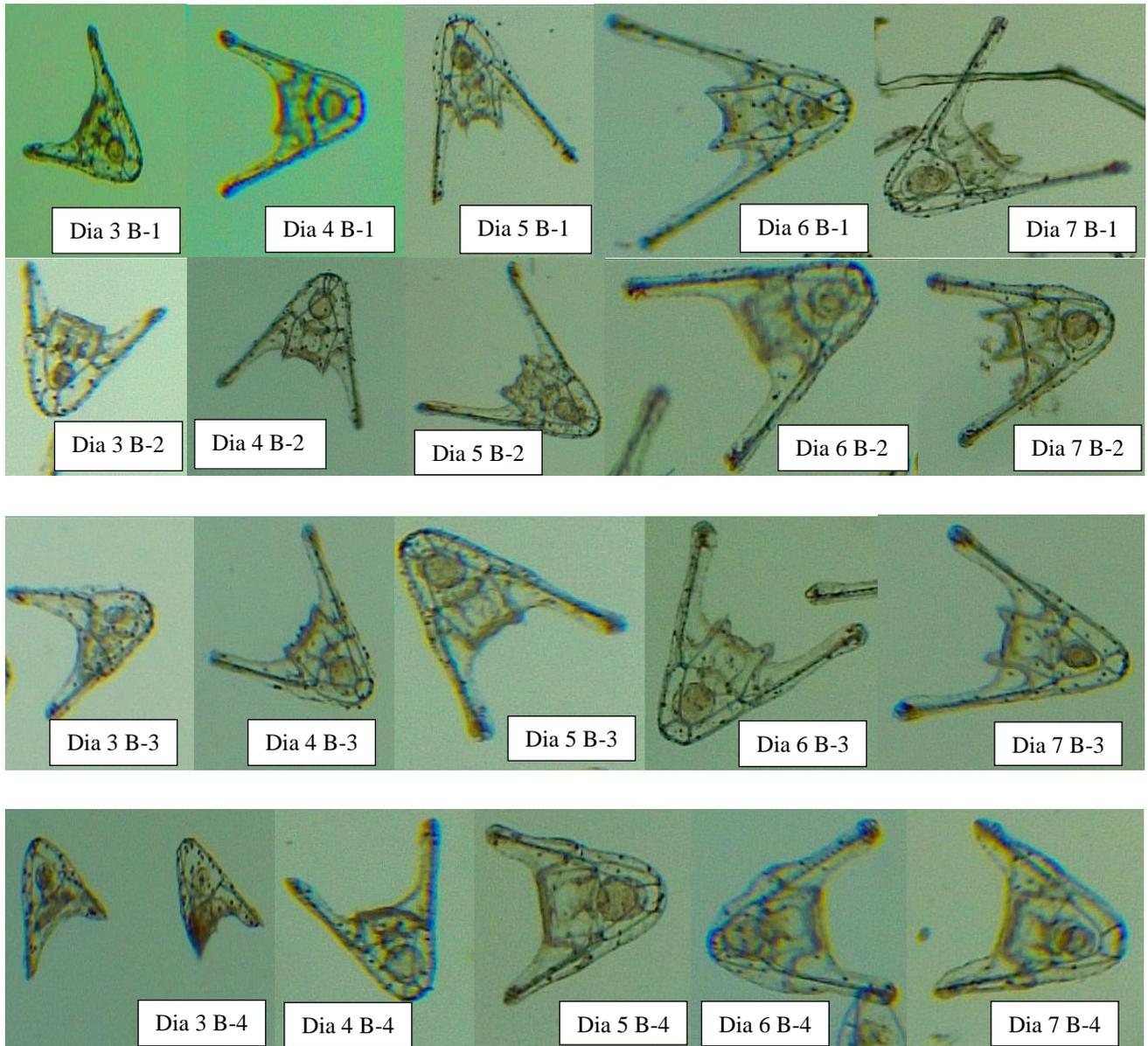


Figura 10. Desenvolvimento larval de *T. gratilla* (crescimento e desenvolvimento dos braços das larvas) nos 4 tratamentos durante os 7 dias de cultivo. B-1 controle (pH 8.04); B-2 (pH 7.67); B-3 (pH 7.46) e B-4 (pH 7.29).

9.4. Taxa de comprimento dos braços grandes de larvas de *T. gratilla*

O pH elevado da água do mar teve um impacto negativo na taxa de comprimento dos braços grandes de larvas (Anova, $P < 0.05$, Tabela 4). As larvas cultivadas no pH mais alto (pH 8.04) apresentaram maior taxa de comprimento dos braços grandes que nos restantes tratamentos (Tukey, $P < 0.05$, Tabela 9). Não houve diferença na taxa de comprimento dos braços grandes entre larvas cultivadas no pH 7.67 e pH 7.46, mas ambos apresentaram maior taxa de comprimento dos braços grandes que as larvas no pH mais baixo pH 7.29 (Figura 10 e Figura 11).

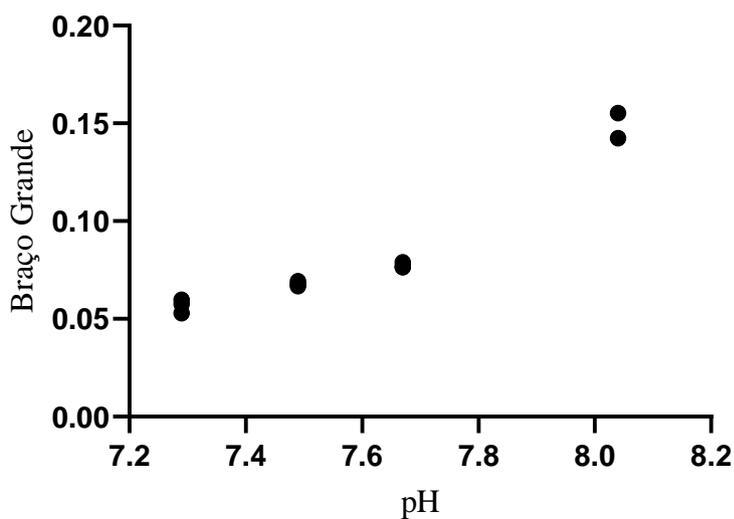


Figura 11. Relação entre a taxa do comprimento dos braços grandes de larvas de *T. gratilla* e o pH.

9.5. Índice de simetria dos braços de larvas de *T. gratilla*

O pH elevado da água do mar teve um impacto negativo no índice de simetria entre os braços de larvas (Anova, $P < 0.05$, Tabela 4). As larvas cultivadas no pH mais alto (pH 8.04) apresentaram maior índice de simetria dos braços que os restantes tratamentos (Tukey, $P < 0.05$, Tabela 11). Não houve diferença no índice de simetria dos braços entre larvas cultivadas no pH 7.67 e pH 7.46 mas ambos apresentaram maior índice de simetria dos braços que as larvas no pH mais baixo pH 7.29 (Figura 10 e Figura 12).

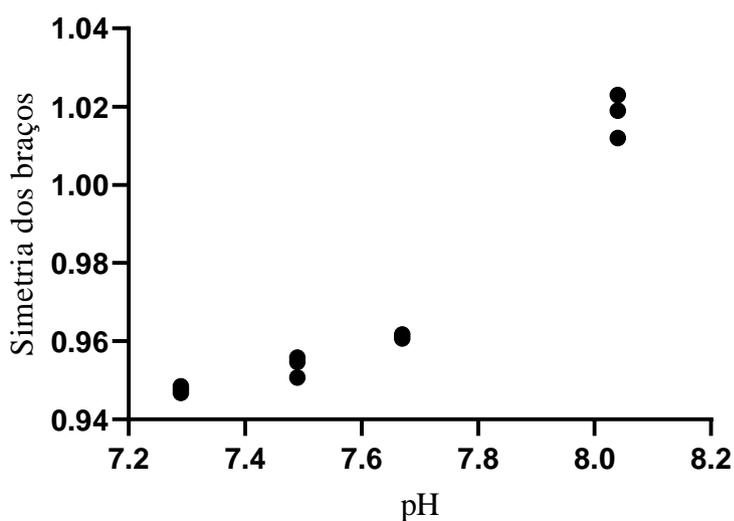


Figura 12. Relação entre o índice de simetria dos braços de larvas de *T. gratilla* e o pH.

9.6. Calcificação de larvas de *T. gratilla*

O pH elevado da água do mar teve um impacto negativo na taxa de calcificação de larvas (Anova, $P < 0.05$, Tabela 4). As larvas cultivadas no pH mais alto (pH 8.04) apresentaram maior taxa de calcificação que os restantes tratamentos (Tukey, $P < 0.05$, Tabela 13). Não houve diferença na taxa de calcificação entre larvas cultivadas no pH 7.67 e pH 7.46, mas ambos apresentaram maior taxa de calcificação que as larvas no pH mais baixo pH 7.29 (Figura 13 e Figura 14).

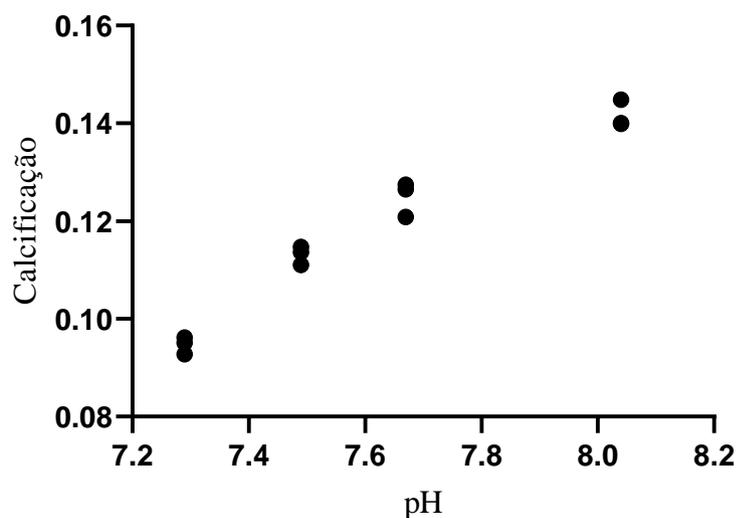
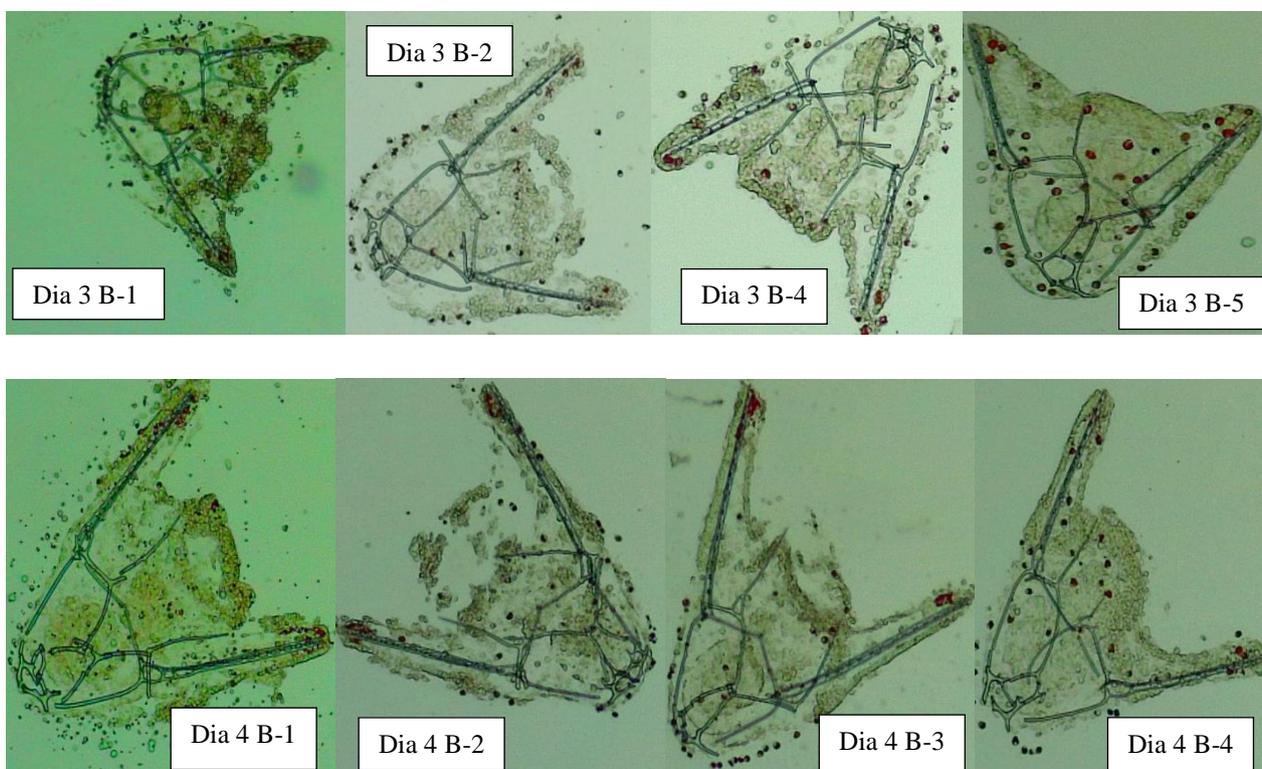


Figura 13. Relação entre a taxa de calcificação de larvas de *T. gratilla* e o pH.



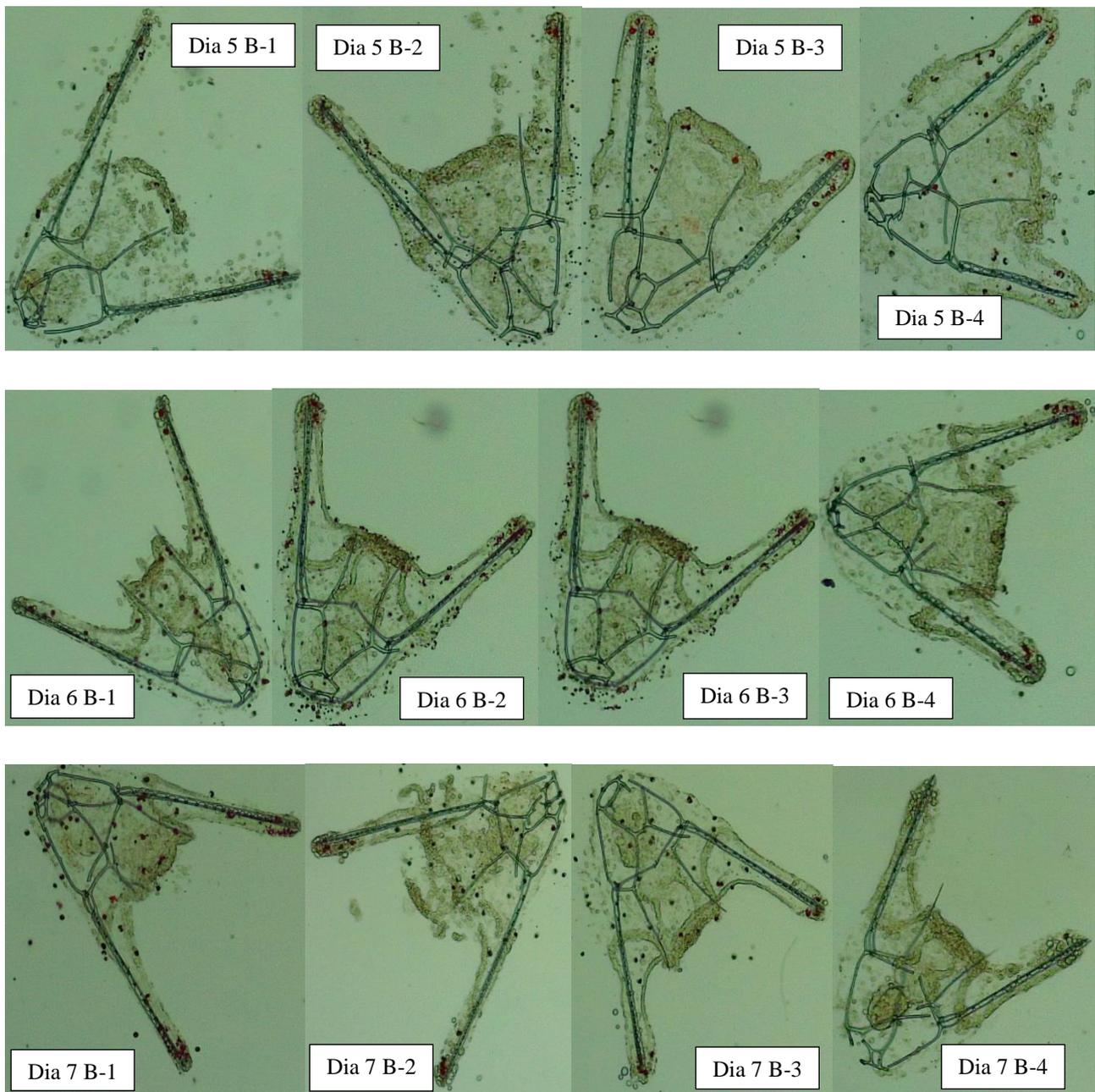


Figura 14. *T. gratilla*. Calcificação de larvas de *T. gratilla* durante os 7 dias de cultivo. B-1 controle (pH 8.04); B-2 (pH 7.67); B-3 (pH 7.46) e B-4 (pH 7.29).

10. Discussão

10.1. Sobrevivência de larvas de *T. gratilla*

A acidificação induzida por CO₂ teve um impacto negativo na taxa de sobrevivência de larvas de *T. gratilla*. Os resultados mostraram altas taxas de sobrevivência das larvas no tratamento controle (pH 8.04) em relação a larvas cultivadas nos outros tratamentos, no entanto, o tratamento mais baixo (pH 7.29) a taxa de sobrevivência era a mais baixa que larvas cultivadas nos outros tratamentos.

Resultados semelhantes foram encontrados por (Kurihara e Shirayama, 2004; Kurihara, 2008; Clark *et al.*, 2009; Brennand *et al.*, 2010; Stumpp *et al.*, 2011b; Mos *et al.*, 2016) no cultivo de larvas de *T. gratilla* sob condições antrópicas de acidificação (ou seja, borbulhamento direto de CO₂). No entanto, (Dupont *et al.*, 2008) em seus experimentos, constataram que a acidificação induzida por CO₂ teve um impacto dramático na sobrevivência e no desenvolvimento das larvas de *Ophiothrix fragilis* e após apenas 8 dias de cultivo, todas as larvas em pH reduzido (7,9 e 7,7) estavam mortas, enquanto, as larvas de controle (pH 8,1) mostraram apenas 30% de mortalidade.

10.2. Crescimento de larvas de *T. gratilla*

O comprimento do corpo de larvas foi menor em pH baixo (pH 7.29), em comparação aos outros tratamentos e principalmente ao controle (pH 8.04). Esses resultados estão de acordo com publicações anteriores mostrando que larvas cultivadas em pH baixo, resultaram em larvas menores ao mesmo tempo após a fertilização (Kurihara e Shirayama, 2004; Kurihara, 2008; Clark *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2010, Mos *et al.*, 2016).

O crescimento larval foi negativamente correlacionado com o aumento da acidez (pH) e diminuição da saturação de calcita e aragonita, resultando em larvas menores em várias outras espécies de ouriços-do-mar (*O. fragilis*, *P. huttoni*, *E. chloroticus*, *S. neumayeri*, *E. mathaei*, *H. erythrogramma*, *H. pulcherrimus*: Kurihara e Shirayama, 2004; Kurihara, 2008; Clark *et al.*, 2009; Brennand *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2010), muito provavelmente potencializam a suscetibilidade dos estágios larvais devido à alta pressão de predação no ambiente pelágico (Hare e Cowen, 1997; Allen, 2008; Dupont *et al.*, 2010a) e/ou têm efeito negativo na fenologia, por exemplo, retardando a oportunidade de se estabelecer em um habitat favorável com condições de alta qualidade (por exemplo, condições sazonais de alimentação) (Miner, 2005; Elkin e Marshall, 2007). Isso pode influenciar o recrutamento de adultos e a estrutura comunitária das populações no futuro. Se nossos oceanos continuarem a ficar cada vez mais ácidos como o esperado, as larvas de *T. gratilla* não conseguirão escapar dessas condições deletérias. As larvas de *T. gratilla* têm baixa capacidade de natação e agem como partículas passivas sem migração vertical diária (Toha *et al.*, 2017).

10.3. Comprimento dos braços grandes de larvas de *T. gratilla*

As larvas cultivadas em pH controle (8.04) tiveram braços grandes mais longos que as larvas cultivadas em pH 7.67 e pH 7.46 e as larvas cultivadas em baixo pH (7.29), tiveram um tamanho significativamente mais curto dos braços grande do que aqueles criados em pH controle (8.04), sugerindo a ocorrência de calcificação suprimida. Esta redução no tamanho dos braços grandes é provavelmente devido à supressão hipercápnica do metabolismo causando atraso no desenvolvimento e diminuição da disponibilidade de CaCO_3 para esqueletogênese. A diminuição da biomineralização em resposta à acidificação de um futuro próximo é relatada para outras larvas equinoides (Kurihara e Shirayama, 2004; Kurihara, 2008; Clark *et al.*, 2009; Brennand *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Brennand *et al.*, 2010 e eles constataram que o aumento da acidez oceânica, a hipercapnia e a diminuição da saturação mineral de carbonato estão intricavelmente ligados e provavelmente exercem efeitos negativos sobre as larvas de *T. gratilla*.

10.4. Índice de simetria dos braços de larvas de *T. gratilla*

Os resultados mostraram que as larvas cultivadas no tratamento controle (pH 8.04) apresentaram alto índice de simetria dos braços comparando com larvas cultivadas nos outros tratamentos e o pH baixo (pH 7.29) apresentou baixo índice de simetria. Resultados similares foram verificados por (Brennand *et al.*, 2010; Mos *et al.*, 2016). Os mecanismos de transporte de iões controlam a assimetria em ouriços-do-mar, assim como em várias espécies de vertebrados (Hibino *et al.*, 2006), esses processos são altamente sensíveis a variações de pH (Mignen e Shuttleworth 2000 e Dupont *et al.*, 2008). As finas hastes do braço da larva (plúteus) são essenciais para a natação, a proteção contra a predação e o sucesso na alimentação estão relacionados ao comprimento dos braços. Larvas menores com uma duração planctônica mais longa são mais vulneráveis à predação em um oceano em mudança, diminuindo chances de sobrevivência e recrutamento. Projectado para um futuro próximo a mudança do oceano pode resultar em um grande gargalo para a vida marinha, histórias com fluxo negativo em efeitos para a integridade das populações e comunidades bentônicas (Dupont *et al.*, 2008; Brennand *et al.*, 2010).

10.5. Calcificação de larvas de *T. gratilla*

As larvas de *T. gratilla*, foram afectadas pela acidificação oceânica, principalmente a calcificação. A calcificação em larvas de ouriço-do-mar ocorre internamente, sob um ambiente químico diferente do que a água do mar circundante através de uma fase amorfa de CaCO_3 que se dissolveria exposto à água do mar de baixo pH. Equinodermes e outros invertebrados ajustam o pH interno através do acúmulo de iões de bicarbonato, que alterariam a calcita interna (Stumpp *et al.*, 2011b; Mos *et al.*,

2016). Alguns equinodermes e outros calcificadores bentônicos podem ser capazes de manter um ambiente alcalino no interior local de mineralização apesar da redução do pH externo. O que é mal compreendido é como a disponibilidade de íons carbonato no oceano afecta este processo. Os efeitos da acidificação do oceano em calcificadores marinhos variam entre filos, espécies, estágios da história de vida e latitudes/habitats (Dupont *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2010; Stumpp *et al.*, 2011b; Mos *et al.*, 2016).

Proavelmente, as alterações induzidas pelo pH na esqueletogênese (anormalidades, assimetria, alterações morfométricas) sejam devido à interrupção de um ou mais mecanismos moleculares envolvidos na calcificação (Livingston *et al.*, 2006), além da interferência na química básica da calcificação (Dupont *et al.*, 2008). Além disso, os mecanismos de transporte de íons controlam a assimetria em ouriços-do-mar, assim como em várias espécies de vertebrados (Hibino *et al.*, 2006); esses processos são altamente sensíveis a variações de pH (Mignen e Shuttleworth 2000).

11. Limitações

As limitações do estudo foram:

- Dificuldade em continuar com a experiência por mais dias devido a falta de fundos para manter o laboratório e a acomodação, uma vez que, a experiência decorreu na Ilha de Inhaca nos laboratórios da EBMI. Por este motivo, não foi possível observar o efeito do pH nos estágios juvenis e de adultos de ouriços-do-mar;
- Dificuldade em manter a temperatura do laboratório devido as condições do laboratório o que pode ter interferido nos resultados obtidos;
- Dificuldades em encontrar trabalhos científicos recentes, informação e artigos relacionados ao estudo, por falta de experiências e pesquisas sobre o tema no Mundo em geral e principalmente na zona costeira da África (Moçambique).

12. Conclusão

Os impactos da acidificação dos oceanos nas larvas de *T. gratilla* são geralmente negativos. Os efeitos incluem baixa sobrevivência, crescimento e desenvolvimento lento, maior número de larvas anormais, deletérias, assimétrica e calcificação retardada.

O efeito da acidificação dos oceanos nas taxas de sobrevivência, crescimento do corpo e dos braços, calcificação e índice de simetria dos braços de larvas de *T. gratilla* foi negativo nos tratamentos de pH 7.46 e pH 7.29 e positivo nos tratamentos de pH 7.67 e pH 8.04.

O limite fisiológico de tolerância á acidificação oceânica de larvas de *T. gratilla* ao pH marinho situou-se entre o pH 7.67 e pH 8.04, pois, nesses tratamentos as larvas desenvolveram mais, com um bom "fitness", maior número de larvas normais, simétricas com braços bem formados. E larvas cultivadas nos pH 7.46 e pH 7.29, mostraram-se mais sensíveis com maior número de larvas anormais, menos desenvolvidas, deletérias e assimétrica.

Se o pH do mar continuar a diminuir conforme sugerido pelos cientistas, espécies como a *T. gratilla* e outros calcificadores serão obrigadas a sofrer mudanças na sua estrutura, morfologia, fisiologia, metabolismo para puderem adaptar se aos níveis do pH mais baixos, caso não, essas espécies estarão susceptíveis a extinção no futuro.

13. Recomendações

Pesquisas futuras poderão utilizar esses resultados como base para realizar experiências com tratamentos de pH mais ácidos que os do presente estudo, para compreender melhor o efeito da acidificação nesses organismos contudo, recomenda-se ainda:

- Que haja mais pesquisas científicas a cerca da acidificação do mar (implicações das mudanças do pH) em outros organismos calcificadores.
- Mais pesquisas científicas sobre o efeito da acidificação do mar, aquecimento do mar, no crescimento e calcificação de todos estágios de vida dos ouriços-do-mar, *T. gratilla* para melhor percepção dos efeitos. Todas as fases de vida, as transições entre estas fases e os efeitos de transmissão devem ser considerados, pois poucas informações existem sobre a vida dos ouriços-do-mar.
- Mais pesquisas acerca do efeito do pH no desenvolvimento e calcificação de larvas de ouriços-do-mar, *T. gratilla* e outros organismos calcificadores, estudos comparativos.
- A consciencialização da sociedade acerca dos efeitos da acidificação oceânica no ecossistema marinho em particular nos organismos calcificadores, a importância da diminuição das emissões de CO₂ na atmosfera e necessidade de cuidarmos melhor dos nossos oceanos.

14. Referências Bibliográficas

- Alcoverro, T. e S., Mariani (2002). Effects of the pasture of sea urchins in sea beds (*Thalassodendron ciliatum*) of a pond in Kenya. *Mar Ecol Prog Ser* 226: 255-263.
- Allen, J. D. (2008). Size-Specific Predation on Marine Invertebrate Larvae. *Boi Biol* 214: 42– 49.
- Aziz, A. (1993). Some notes on the fishing of the sea urchin. *Oceania* 18 (2): 65-75.-
- Barbosa F.M.A., (1995). *Uma avaliação do valor das árvores para população da Ilha da Inhaca*. Universidade Eduardo Mondlane. Maputo: Moçambique,1995. 85p.
- Bernstein, L.; P., Bosch; O., Canziani; Z., Chen e R., Crist (2007). *Climate Change: Synthesis Report. Summary for Policymakers*, 22pp.
- Bonaviri, C.; F.T., Veja; F., Badalamenti; P., Gianzugga; M., Di Lorenza e S., Riggio (2009). Predation of fish and sea stars in the control of sea gold population on the rocky coasts of the Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* 382: 129-138.
- Branch, G. F.; E. A., Hanushek e S. G., Rivkin (2012). Estimating the effect of leaders on public sector productivity: The case of school principals. *Research Gate*.
- Brennan, H.; N., Soars; S. A., Dworjanyn; A. R., Davis e M., Byrne (2010). Impact of Ocean Warming and Ocean Acidification on Larval Development and Calcification of the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *PLoS ONE* 5 (6): e11372. doi: 10.1371 / *journal.pone*.0011372.-
- Bruce, C. A., (1988). *Sea Urchins*. *Infotish Intl* 3: 32-34.
- Byrne, M.; T. A. A., Prowse; M. A., Sewell; S., Dworjanyn; J. E., Williamson e D., Vätilingon (2008a). Maternal provision for larvae and provision of juvenile larvae in the toxopneustymian sea urchin, *Tripneustes gratilla*. *Mar Biol* 155: 473-482.
- Byrne, M.; M. A., Sewell e T. A. A., Prowse (2008b). Nutritional Ecology of sea urchin larvae: Influence of endogen and exogenous nutrition on the luteth growth of echinops and phenotypic plasticity in *Tripneustes gratilla*. *Funct Ecol* 22: 643-648.
- Byrne, M.; N. A., Soares; M. A., Ho; E., Ong; D., McElroy; P., Selvakumaraswamy; S. A., Dorjanyn e A. R., Davis (2010a). Fertilization in a coastal suite invertebrate marine in southeastern Australia and robust for the heating and acidification of the ocean in the next future. *Mar Biol* 157: 2061-2069.

- Caldeira, K. e M. E., Wickett (2003). Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365.
- Caldeira, K. e M. E., Wickett (2005). Mechanical model of chemical change model from carbon dioxide to atmosphere and ocean. *Geophys Res Lett* 110, C09S04, doi:10.1029/2004JC002671.
- Cao, L.; K., Caldeira e A. K., Jain (2007). Effects of carbon dioxide and climate change on ocean acidification and carbonate mineral saturation. *Geophys Res Lett* 34, L05607, doi: 10.1029/2006GL028605.
- Clark, H. L. (1946). *The echinoderm fauna of Australia*. The Carnegie. Publication of the Washington constitution 566: 1-567.
- Clark, D.; M., Lamare e M., Barker (2009). Response of sea urchin pluteus larvae (*Echinodermata: Echinoidea*) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Mar Biol* 156: 1125– 1137.
- Csirke, J. (2005). Global Production and State of Marine Fishery Resources. In: Review of the State of World Marine Fishery Resources. FAO Fisheries Technical Paper. *Journal of Marine science*. p. 457.
- Dafni, J. e R., Tobol (1986). Population structure patterns of a common red sea echinoid (*Tripneustes gratilla elatensis*). *Israel J Zool* 34: 191-204.
- Dafni, J. (1992). Sea urchin *Tripneustes gratilla elatensis* rate. *Israel J Zool* 38:25-33.
- Davoult, D.; F., Gounin e A., Richard (1990). *Dynamique et reproduction de la population d'Ophiothrix fragilis (Abildgaard) du détroit du Pas de Calais (Manche orientale)*.
- Dickson, A.; C. L., Sabine e J. R., Christian (2007). *Guide to best practices for ocean CO2 measurements*. (PICES Special Publication 3; 191pp.
- Dorey, N.; P., Lancon; M., Thorndyke e S., Dupont (2013). Assessing physiological tipping point of sea urchin larvae exposed to a broad range of pH. *Glob. Change Biol.* 19, 3355– 3367.
- Dupont, S.; J., Havenhand; W., Thorndyke; L., Peck e M. C., Thorndyke (2008). CO₂ -driven ocean acidification radically affect larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 285 – 294 juvenile. *Sci. Rep.* 12, 5557.

- Dupont, S.; O., Orega-Martnez e M., Thorndyke (2010a). *Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. Ecotoxicology* 19: 449 – 462.
- Dupont, S. (em preparação). *Fertilization assays to study ocean acidification*, University of Gothenburg.
- Ebert, T. A. (1982). Longevity, life history and relative body wall size in the sea urchins. *Ecol Monogr* 52: 353-394.
- EBMI (2021). *Ilha de Inhaca provincia de Maputo*. <https://www.bing.com/ck/a?!&&p=fd135c30f7b121b8JmltdHM9MTcxMzY1NzYwMCZpZ3VpZD0xM2IzZTBhOC1IMzc0LTZjUtMWJINC1mMGNkZTI0NzYyZjMmaW5zaWQ9NTE3Nw&ptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=13b3e0a8-e374-63f5-1be4-f0cde24762f3&psq=EBMI+2021+&u=a1aHR0cHM6Ly93d3cuZWJtaS51ZW0ubXovaW5kZXgucGhwL2VuL2Fib3V0LWVibWlicmUtYS11Ym1pL3dlbGNvbWUtdG8taW5oYWVhLXMtbnVlWjpb2xvZ3k3RhdGlvg&ntb=1> Acessado no dia 23/06/2022.
- Eklof, S.; M., de la Torre-Castro; M., Gullstrom; J., Uku; N., Muthiga; T., Lyimo e S. O., Bandeira (2008). Seagrass overgrazing by sea urchins: na overview of current knowledge on causes, consequences and management. *Estuar Coast Shelf Sci* 79 (4): 569-580.
- Eklof, J. S.; S., Frocklin; A., Lindvall; N., Stadlinger; A., Kimathi; J. N., Uku; T. R., McClanahan (2009). How effective are AMPs? Predation control and 'spillover effect' in seagrass lagoons and coral reefs under contrasting fisheries management. *Mar Ecol Prog Ser* 384: 83-96.
- Elkin, C. e D. J., Marshall (2007). Desperate larvae: influence of deferred costs and habitat requirements on habitat selection. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 335, 143 – 153.
- Emllet, R. B. (1983). Calcite echinoderm: a mechanical and larval spicule analysis. *Biol Bull* 163:264 – 275.
- Fabry, V. J.; B. A., Seibel; R. A., Feely e J. C., Orr (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. ICES. *Journal of Marine Science*. V.65:414–432pp.
- Fernando, S. C. (2011). *The sea-urchin Tripneustes gratilla in the Western Indian Ocean: a social-ecological*. Tese de Mestrado em Biologia Aquática e Ecossistemas Costeiros. UEM, Mocambique.
- Gazeau, F.; L.M., Parker; S., Comeau; J. P., Gattuso; W. A., Connor; S., Martin; H., Portner; P., Ross (2013). Impacts so ocean acidification on marine shrilled molluscs. *Journal of Marine science* 160:2207-2245pp.

- Gonzalez R. C. e R. E., Woods (2009). *Processamento Digital de Imagens*. 3 ed. [S.l.]: Pearson.
- Guillard, R. R. L e J. H., Ryther (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8, 229–239.
- Hare, J. A. e R. K., Cowen (1997). Size, growth, development and survival of planktonic larvae of *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae). *Ecology* 78, 2415–2431.
- Hibino, T.; Y., Ishii; M., Levin e A., Nishino (2006). Ion flow regulates the left-right asymmetry in sea urchin development. *Dev Genes Evolution* 216:265 – 276.
- Hofmann, G.; M., Werum e H., Lange-Bertalot (2011). *Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie*. pp. [1]–908, 133 pls. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G.
- Horstadius, S. (1939). The mechanics of sea urchin development, studied using operational methods. *Biol Rev Camb Phil Soc* 14:132 – 179.
- James, P. J. P. e M. J., Unwin (2007). *The effects of season, temperature and initial gonad condition on roe enhancement of the sea urchin *Evechinus chloroticus**. *Aquaculture* 270: 115-131.
- Juinio-Meñes, M. A.; D., Pastor e H. G., Bangi (2008b). *Indications of increased recruitment in sea urchin *Tripneustes gratilla* due to stock restoration effect*. Proceedings of the 11^o Internacional coral reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida, 1018-1021.
- Kasim, M. (2009). Sea urchin activity *Tripneustes gratilla*, in tropical seagrass beds of Buton Island, Southeast Sulawesi, Indonesia. *J Coast Dev* 13: 19-27.
- Kroh, A. (2013). *Tripneustes gratilla*. World Echinoidea Database. Acessado em: World Register of Marine species no https://www.bing.com/ck/a?!&&p=33ea22fcd4f85a33JmltdHM9MTcxMzY1NzYwMCZpZ3VpZD0xM2IzZTBhOC1IMzc0LTZjZjUtMWJlNC1mMGNkZTI0NzYyZjMmaW5zaWQ9NTEzNw&ptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=13b3e0a8-e374-63f5-1be4-f0cde24762f3&u=a1L2ltYWdlcy9zZWZyY2g_cT1rcm9oYSsyMDEzLit0cmllwV1c3RlcytncmF0aWxsYSZxCHZ0PUtyb2glMmMrOQsyMDEzLitUcmllwV1c3RlcytncmF0aWxsYSZGT1JNPUIHUkU&ntb=1 acessado no dia 01/08/2021.

- Kurihara, H. e Y., Shirayama (2004). Effects of rising CO₂ spherical atmosphere on early sea urchin development. *Mar Ecol Prog Ser* 274:161 – 169.
- Kurihara, H.; S., Shimode e Y., Shirayama (2004). Sublethal effects of high concentration of CO₂, on planktonic copepods and sea urchins. *J Oceanogr* 60:743 – 750.
- Kurihara, H.; S., Kato e A., Ishimatsu (2007). Effects of increasing seawater pCO₂ on the initial development of the oyster *Cras sotreia gigas*. *Aquat Biol* 1:91 – 98.
- Kurihara, H. e A., Ishimatsu (2008). Effects of seawater with high CO₂ content on copepods *Acartia tsuensi* in all life stages and subsequent generations. *Mar Pollut Bull* 56:1086 – 1090.
- Lawrence, J. M. e Y., Agatsuma (2013). *Tripneustes gratilla*. In: Lawrence JM (ed.). Sea Urchins: Biology and Ecology, 3^a ed. Academic Press, Croydon, UK.
- Lefebvre, A.; C., Ellien; D., Davoult; E., Thiébault e J. C., Salomon (2003). *Dispersion of pelagic larvae from Ophiothrix fragilis in a megatidal area (Canal Mancha, France)*. Examined using advection/diffusion model.
- Levitan, D. R. (2004). Density-dependent sexual selection in external fertilizers: Variations in male and female fertilization success across sperm limitation for sexual conflict in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Am Nat* 164 (3).
- Levitan, D. R. (2005). The distribution of male and female reproductive success in a transmitted-spawning marine invertebrate. *Integrat Compar. Biol* 45: 848-855.
- Levitan, D. R. (2006). The relationship between egg size and fertilization success in broadcast-spawning marine invertebrates. *Integrat Compar. Biol* 46: 298-311.
- Livingston, B. T.; C. E., Killian; F., Wilt e A., Cameron (2006). A genoma analysis of proteins related to biomining in sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300:335 – 348.
- Lopes, H. (2011). *Inhaca, Moçambique*. De Alma de Viajante.
- Lyimo, T. J.; F., Mamboya; M., Hamisi e C., Lugomela (2011). Food preference of sea urchin *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) in tropical seagrass habitats in Dar es Salaam, Tanzania. *J Ecol Nat Environ* 3 (13): 415-423.

- Maharavo, J.; R., Marie-Berthe e A. T., Bernard (1994). Food preference of *Tripneustes gratilla* (L) (Echinoidea) on offshore reef fringesem NW the Madagascar (SW Indian Ocean). Equinoderms através do tempo: proceedings of the eighth International Conference on Equinoderms. *CRC Press*, UK.
- Mahon, R. e C., Parker (1999). *Barbados sea eggs, past, present, future*. Fisheries Management Plan, Public Information Document No. 1, Fisheries Division, Ministry of Aquaculture and Rural Development, Barbados.
- Marsh, A. G. e D. T., Manahan (1999). A method for accurate measurements of the respiration rates of marine invertebrate embryos and larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 184, 1–10.
- Mignen, O. e T. J., Shuttleworth (2000). IARC a new non-capacitative regulated canal Ca₂₊ entry channel. *J Chem* 275:9114 – 9119.
- Miner, B. G. (2005). Evolution of food structure plasticity in marine invertebrate larvae: a possible compensation between arm length and stomach size. *Exp. Mar Biol. Eco.* 315, 117 – 125.
- Moreira, M. E. (2005). *A Dinâmica dos Sistemas Litorais do Sul de Moçambique durante os últimos 30 anos*. In Finisterra, XL, 79, 126pp.
- Mortensen, T. (1943). *A monograph of the Echinoidea*. 11.2. Camarodonta. I. Copenhagen. CA Reitzel, Copenhagen.
- Mos, B.; M., Byrne e S. A., Dworjanyn (2016). Biogenic acidification reduces sea urchin gonad growth and increases the susceptibility of aquaculture to ocean acidification. Marine environmental research, *J Marenvres* 113, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.11.001>.
- Mullin, M. M.; P. R., Sloan e R. W., Eppley (1966). Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 11, 307–311.
- Nakagawa, Y.; A., Ueda; Y., Kaneko e S., Harashima (2003). Merging of multiple signals regulating delta9 fatty acid denaturize gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Moll Genet Genomics. *Journal Article* 269 (3): 370-80.
- Nojima, S.; H., Mukai (1985). A preliminary report on the distribution pattern, daily activity and movement pattern of a marine herbivore, *Tripneustes gratilla* (L) (Echinodermata:

- Echinoidea), in seagrass beds of Papua New Guinea. *Spec Publ Mukaishima Mar Biol Sta* 1989: 173-183.
- O'Donnell, M. J.; A. E., Todgham; M. A., Sewell; M. H., LaTisha e K., Ruggiero (2010). Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in sea urchin larvae. *Mar Ecol Prog Ser* 398: 157 – 171.
 - Ogden, N., S. C., Ogden e I. A., Abade (1989). Distribution, abundance and feeding of sea urchins on a leeward Hawaiian reef. *Bull Mar Sci* 45: 539-549.
 - Okazaki, K. (1956). Skeleton formation of sea urchin larvae. Effect of Ca concentration. *Boi Biol* 110:320 – 333.
 - Orr, J. C.; V. J., Fabry; O., Aumont; L., Bopp; S. C., Doney; R. A., Feely; A., Gnanadesikan; N., Gruber; A., Ishida; F., Joos; R. M., Key; K., Lindsay; E., Maier-Reimer; R., Matear; P., Monfray; A., Mouchet; R. G., Najjar; G., Plattner; K. B., Rodgers; C. L., Sabine; J. L., Sarmiento; R., Schlitzer; R. D., Slater; I. J., Totterdell; M., Weirig; Y., Yamanaka e A., Yool (2005). Anthropogenic acidification of the oceans throughout the XXI century and its impacts on calcifying organisms. *Nature*. v. 437 doi: 10.1038-04095.
 - Pennington, J. T. e R. R., Strathmann (1990). Consequences of calcite skeletons of planktonic echinoderm larvae for orientation, swimming and shape. *Biol Bull* 179:121 – 133.
 - Porter, H. O.; M., Langebuch e A., Reipschlagler (2004). Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology an earth history. *Journal of Oceanography*. v. 60, p.705-718.
 - Radjab, A. W. (2004). Distribution and density of sea urchin in the Padaido Island, Biak, Irian Jaya. In: Setyawan W.B.; Y., Witasari; Z., Arifin; O.S.R., Ongkosongo e S., Bureau (eds). *Pros Sem National Sea III*, Jakarta.
 - Rasband, W. S. (1997–2012). *ImageJ*. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA. Available at: <http://imagej.nih.gov/ij/> (acessado 25/05/ 2023).
 - Ricklefs, R. E. (2010). *A Economia da Natureza*. Eds. Guanabara Koogan. Brasil.
 - Rockstrom, J.; W., Steffen; K., Noone e A., Persson (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, v. 431, p. 472 - 475.
 - Rogers-Bennett, L. (2007). The ecology of the *Strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus purpuratus*. In: Lawrence JM. (ed). Ouriços-do-mar comestíveis: Biology and Ecology. *Elsevier*, Amsterdã.

- Royal Society (2005). Ocean acidification due to increased atmospheric carbon dioxide. Policy document 12/05, The Royal Society, London.
- Schneider, C.; W., Rasband; K., Eliceiri (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, vol. 9 (7), pp: 671-675.
- Shears, N. T. e R. C., Babcock (2002). Marine reserves demonstrate top-down control of community structure on temperate reefs. *The ecology* 132: 131-142.
- Shimabukuro, S. (1991). *Tripneustes gratilla (sea urchin)*. In: Shokita S.; K., Kakazu; A., Tomori; T. (eds), Toma e M., Yamaguchi (English ed). Aquacultura in tropical areas. Midori Shobo Co, Ltd, Tokyo.
- Shokita, S.; K., Kakazu; A., Tomori e T. (eds), Toma (1991). *Aquaculture in Tropical Areas*. Midori Shobo Co. Ltd., Tokyo, Japan.
- Silahooly, V.; A. H., Toha e L., Hakin (2013). Spatial distribution of *Tripneustes gratilla* on Ambon Island. *Journal of Tropical Life Science*. V.3. 17-181pp.
- Silveira, J. C.; N., Busato; A., Costa e E. Costa Junior (2014). Levantamento e análise de métodos de extração de Óleos Essenciais. *Enciclopedia Biosfera*. Eds. Vol. 08 (15). <https://www.bing.com/ck/a?!&p=4579346828fc2bc4JmltdHM9MTcxMzY1NzYwMCZpZ3VpZD0xM2IzZTBhOC11Mzc0LTZyZjUtMWJjNC1mMGNkZTI0NzYyZjMmaW5zaWQ9NTI2Nw&ptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=13b3e0a8-e374-63f5-1be4-f0cde24762f3&psq=silveira+et+al+2014.+levantamento+e+analise+m%c3%a9todos+de+extra%c3%a7%c3%a3o+de+%c3%93leos+Essenciais&u=a1aHR0cHM6Ly93d3cuc2NpZWxvLmJyL2ovZWFnemkvYS9ZemJaclk2WVRyZm1HTkNHQmc1bkNnaC8&ntb=1> Acessado no dia 21/08/2022.
- Steffen, W.; K., Richardson; J., Rockstrom e S. E., Cornell (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, v. 347.
- Stimson, J.; T., Cunha e J., Philippoff (2007). Food preferences and related behaviour. The sea urchin *Tripneustes gratilla* (Linnaeus) and potential for use as biological control agent. *Marine Biology*, 151, 1761-1772.
- Stump, M.; S., Dupont; M. C., Thorndyke e F., Melzner (2011b). CO₂- induced seawater acidification affects sea urchin larval development II: gene expression patterns in pluteus larvae. *Comp. Bioquim. Physiol. A*. 160, 320 – 330.

- Stumpp, M.; K., Trübenbach; D., Brennecke; M. Y., Hu; F., Melzner (2012a). Resource allocation and extracellular acid-base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO₂ induced seawater acidification. *Aquat Toxicol.* 2012 Apr; 110-111:194-207. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.12.020. Epub 2012 Jan 21. PMID: 22343465.
- Stumpp, M.; M. Y., Hu; F., Melzner; M. A., Gutowska; N., Dorey; N., Himmerkus e M., Bleich (2012b). Acidified seawater impacts sea urchin larvae pH regulatory systems relevant for calcification. Proceedings of the *National Academy of Sciences*, 109(44), 18192-18197.
- Stumpp, M.; M., Hu; I., Casties; R., Saborowski; M., Bleich; F., Melzner e S., Dupont (2013). Digestion in sea urchin larvae impaired under ocean acidification. *Nature climate change*, 3(12), 1044-1049.
- Syam, A. R.; I. N., Edrus e R., Andamari (2002). Population and utilization rate of sea urchins (Echinoidea) in seagrass beds on Osi Island, West Seram, Maluku Central. *JPPI Resources and Arrest*. Edition 8 (4): 31-37.
- Takei, N.; H., Nakagawa; A., Kimura e K., Endo (1991). A toxic substance from sea urchin *Toxopneustes pileolus* induces the release of histamine from rat peritoneal mast cells. *Inflam Res* 32 (3-4): 224-228.
- Tertschnig, W. P. (1989). Diet activity patterns and foraging dynamics of sea urchin *Tripneustes ventricosus* in tropical seagrass community and a reef environment (Virgin Islands). *Mar Ecol* 10 (1): 3-21.
- Toha, A. H. A. e Z., Fadli (2008). Diversity of sea urchin species (Echinoidea) in Manokwari waters. *Fishing and maritime affairs journal*. Marine and fishing scientific research journals 4 (1):13-30.
- Toha, A. H. A.; S. B., Sumitro; L., Hakim; K., Widodo (2012). *Habitat conditions of sea urchin Tripneustes gratilla (Linnaeus, 1758) in Cenderawasih Bay*. Berk Penel Hayati 17 (2): 139-145.
- Toha, A. H. A.; S. B., Sumitro; L., Hakim; N., Widodo; R., Binur; B., Suhaemi e A. W., Anggoro (2017). Review: Biology of the commercially used sea urchin *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) (Echinoidea: Echinodermata). *Ocean Life* 1: 1-10.
- Tomascik, T. (1997). The ecology of the seas of Indonesia (Part 2). *Tuttle* Publication, United Kingdom.

15. Anexos

Tabela 3: Resultados da análise de regressão da sobrevivência de larvas de *T. gratilla* sob controle (pH 8.04) e condições elevadas de pH (7.67; 7.46 e 7.29).

Réplicas	Declive	Intersecção	R ²	pH	P-value	Df	F-value
B.1.1	-0.07	1.1736	0.7844	8.04	0.0456	3	10.912
B.1.2	-0.0736	1.2461	0.9565	8.04	0.0039	3	65.894
B.1.3	-0.0717	1.2644	0.7913	8.04	0.0433	3	11.375
B.3.1	-0.0891	1.2223	0.9309	7.67	0.0079	3	40.417
B.3.2	-0.0879	1.2936	0.936	7.67	0.007	3	43.896
B.3.3	-0.0887	1.3131	0.8803	7.67	0.0183	3	22.064
B.4.1	-0.0955	1.3365	0.8813	7.46	0.018	3	22.278
B.4.2	-0.0936	1.3272	0.8893	7.46	0.0162	3	24.103
B.4.3	-0.092	1.2929	0.9372	7.46	0.0068	3	44.808
B.5.1	-0.104	1.3599	0.911	7.29	0.0116	3	20.72
B.5.2	-0.1022	1.3445	0.8713	7.29	0.0204	3	20.302
B.5.3	-0.1007	1.314	0.9536	7.29	0.0043	3	61.629

Tabela 4. ANOVA dos dados dos parâmetros observados (sobrevivência, crescimento, comprimento do braço grande, simetria dos braços e calcificação) e das réplicas dos tratamentos (8.04, 7.67, 7.46, 7.29) de larvas de *T. gratilla* criadas em tratamentos (como factores fixos).

	SS - Effect	Df - Effect	MS - Effect	SS - Error	df - Error	MS - Error	F	P
Sobrevivência	0.001488	3	0.000496	0.000019	8	0.000002	210.7445	0.0000001
Réplicas								
8.04	0.00	0	-	0.000006	2	0.000003	0.00	-
7.67	0.00	0	-	0.000001	2	0.000000	0.00	-
7.46	0.00	0	-	0.000006	2	0.000003	0.00	-
7.29	0.00	0	-	0.000005	2	0.000003	0.00	-

Crescimento	0.000362	3	0.000121	0.000004	7	0.000001	215.0122	0.000001
Réplicas								
8.04	0.00	0	-	0.000001	1	0.000001	0.00	-
7.67	0.00	0	-	0.000000	2	0.000000	0.00	-
7.46	0.00	0	-	0.000002	2	0.000001	0.00	-
7.29	0.00	0	-	0.000000	2	0.000000	0.00	-
Braço Grande	148.6677	3	49.55588	2.784704	7	0.397815	124.5702	0.000002
Réplicas								
8.04	0.00	0	-	0.163656	1	0.163656	0.00	-
7.67	-	0	-	0.093417	2	0.046708	-0.000000	-
7.46	0.00	0	-	0.154368	2	0.077184	0.00	-
7.29	0.00	0	-	2.373263	2	1.186632	0.00	-
Simetria dos braços	118.9115	3	39.63717	7.146755	8	0.893344	44.36942	0.000025
Réplicas								
8.04	0.00	0	-	2.173394	2	1.086697	0.00	-
7.67	0.00	0	-	1091.992	2	545.958	0.00	-
7.46	0.00	0	-	1.647635	2	0.823818	0.00	-
7.29	0.00	0	-	1.615680	2	0.807840	0.00	-
Calcificação	0.003506	3	0.0001169	0.000055	8	0.000007	171.3928	0.0000001
Réplicas			-					-
8.04	0.00	0	-	0.000016	2	0.000008	0.00	-
7.67	0.00	0	-	0.000026	2	0.000013	0.00	-
7.46	0.00	0	-	0.000007	2	0.000004	-0.000000	-
7.29	0.00	0	-	0.000006	2	0.000003	0.00	-

Tabela 5. Teste de Tukey dos dados de sobrevivência de larvas de *T. gratilla* cultivadas em tratamentos (como factores fixos).

Tratamento (pH)	(8.04) - M=-0.0718	(7.67) - M=-0.0886	(7.46) - M=-0.0937	(7.26) - M=-0.1023
8.04		0.000231	0.000231	0.000231
7.67	0.000231		0.014743	0.000237
7.46	0.000231	0.014743		0.000762
7.29	0.000231	0.000237	0.000762	

Tabela 6: Resultados da análise de regressão do crescimento de larvas de *T. gratilla* sob controle (pH 8.04) e condições elevadas de pH (7.67; 7.46 e 7.29).

Réplicas	Declive	Intersecção	R ²	pH	P-value	Df	F-value
B.1.1	-0.0952	1.0717	0.4323	8.04	0.000001	1.48	36.547
B.1.2	0.0582	0.8727	0.5644	8.04	0.000001	1.48	62.191
B.1.3	0.0565	0.8885	0.4907	8.04	0.000001	1.48	46.241
B.3.1	0.0471	0.8708	0.8711	7.67	0.000001	1.48	324.33
B.3.2	0.0478	0.8758	0.8715	7.67	0.000001	1.48	325.56
B.3.3	0.0474	0.8821	0.5841	7.67	0.000001	1.48	67.412
B.4.1	0.0425	0.901	0.3538	7.46	0.000005	1.48	26.282
B.4.2	0.0436	0.8897	0.767	7.46	0.000001	1.48	158.01
B.4.3	0.0444	0.8758	0.9229	7.46	0.000001	1.48	574.36
B.5.1	0.0413	1.0148	0.1764	7.29	0.000001	1.48	10.28
B.5.2	0.0407	0.9388	0.2793	7.29	0.000001	1.48	18.603
B.5.3	0.0404	0.9016	0.3758	7.29	0.000002	1.48	28.9

Tabela 7. Teste de Tukey dos dados de crescimento de larvas de *T. gratilla* criadas em tratamentos (como factores fixos).

Tratamento (pH)	(8.04) - M=-0.0718	(7.67) - M=-0.0886	(7.46) - M=-0.0937	(7.26) - M=-0.1023
8.04		0.000253	0.000252	0.000252
7.67	0.000253		0.001707	0.000285
7.46	0.000252	0.001707		0.012937
7.29	0.000252	0.000285	0.012937	

Tabela 8: Resultados da análise de regressão do comprimento dos braços grandes de larvas de *T. gratilla* sob controle (pH 8.04) e condições elevadas de pH (7.67; 7.46 e 7.29).

Réplicas	Declive	Intersecção	R ²	pH	P-value	Df	F-value
B.1.1	-0.0532	0.9575	0.1959	8.04	0.00129	1.48	11.692
B.1.2	0.1552	0.6077	0.8777	8.04	0.000001	1.48	344.52
B.1.3	0.1425	0.602	0.9174	8.04	0.000001	1.48	533.11
B.3.1	0.0768	0.7877	0.9257	7.67	0.000001	1.48	598.04
B.3.2	0.0765	0.8463	0.5127	7.67	0.000001	1.48	50.501
B.3.3	0.0789	0.7641	0.7237	7.67	0.000001	1.48	125.74
B.4.1	0.0668	0.8024	0.7057	7.46	0.000001	1.48	115.11
B.4.2	0.0693	0.8074	0.6364	7.46	0.000001	1.48	84.005
B.4.3	0.0675	0.8106	0.8229	7.46	0.000001	1.48	223.03
B.5.1	0.053	0.9102	0.3457	7.29	0.000007	1.48	25.357
B.5.2	0.0576	0.8849	0.472	7.29	0.000001	1.48	42.914
B.5.3	0.0597	0.8948	0.4055	7.29	0.000001	1.48	32.735

Tabela 9. Teste de Tukey dos dados do comprimento dos braços grandes de larvas de *T. gratilla* criadas em tratamentos (como factores fixos).

Tratamento (pH)	(8.04) - M=-0.0718	(7.67) - M=-0.0886	(7.46) - M=-0.0937	(7.26) - M=-0.1023
8.04		0.000288	0.000253	0.000252
7.67	0.000288		0.038163	0.000370
7.46	0.000253	0.038163		0.003395
7.29	0.000252	0.000370	0.003395	

Tabela 10: Resultados da análise de regressão da simetria dos braços de larvas de *T. gratilla* sob controle (pH 8.04) e condições elevadas de pH (7.67; 7.46 e 7.29).

Réplicas	Declive	Intersecção	R ²	Ph	P-value	Df	F-value
B.1.1	1.023	-0.0243	0.9989	8.04	0.000001	1.48	45459
B.1.2	1.019	-0.0445	0.9813	8.04	0.000001	1.48	2524.4
B.1.3	1.012	-0.0513	0.9659	8.04	0.000001	1.48	1360.3
B.3.1	0.9617	0.037	0.9948	7.67	0.000001	1.48	9229.1

B.3.2	0.9615	0.0362	0.9954	7.67	0.000001	1.48	10470
B.3.3	0.9607	0.037	0.9964	7.67	0.000001	1.48	13288
B.4.1	0.9507	0.0495	0.9912	7.46	0.000001	1.48	5402
B.4.2	0.9547	0.0359	0.9814	7.46	0.000001	1.48	2535.4
B.4.3	0.9558	0.0401	0.9952	7.46	0.000001	1.48	9877.3
B.5.1	0.9476	0.0491	0.9984	7.29	0.000001	1.48	30758
B.5.2	0.9485	0.0499	0.9958	7.29	0.000001	1.48	11436
B.5.3	0.9468	0.0517	0.9958	7.29	0.000001	1.48	11472

Tabela 11. Teste de Tukey dos dados da simetria dos braços de larvas de *T. gratilla* criadas em tratamentos (como factores fixos).

Tratamento (pH)	(8.04) - M=-0.0718	(7.67) - M=-0.0886	(7.46) - M=-0.0937	(7.26) - M=-0.1023
8.04		0.019847	0.000519	0.000237
7.67	0.019847		0.030094	0.000644
7.46	0.000519	0.030094		0.031918
7.29	0.000237	0.000644	0.031918	

Tabela 12: Resultados da análise de regressão da calcificação de larvas de *T. gratilla* sob controle (pH 8.04) e condições elevadas de pH (7.67; 7.46 e 7.29).

Réplicas	Declive	Intersecção	R ²	pH	P-value	Df	F-value
B.1.1	0.1399	0.63	0.9396	8.04	0.000001	1.48	747.15
B.1.2	0.1448	0.611	0.9431	8.04	0.000001	1.48	796.04
B.1.3	0.14	0.6093	0.9485	8.04	0.000001	1.48	883.52
B.3.1	0.1265	0.6449	0.9665	7.67	0.000001	1.48	1385.7
B.3.2	0.1208	0.6721	0.9433	7.67	0.000001	1.48	798.93
B.3.3	0.1274	0.6436	0.9405	7.67	0.000001	1.48	758.15
B.4.1	0.1136	0.6786	0.963	7.46	0.000001	1.48	1250.01
B.4.2	0.111	0.7026	0.9462	7.46	0.000001	1.48	844.67
B.4.3	0.1147	0.6735	0.9761	7.46	0.000001	1.48	1961.5
B.5.1	0.0928	0.7829	0.8778	7.29	0.000001	1.48	344.86
B.5.2	0.0962	0.7594	0.9036	7.29	0.000001	1.48	449.1
B.5.3	0.0951	0.7585	0.926	7.29	0.000001	1.48	600.53

Tabela 13. Teste de Tukey dos dados da calcificação de larvas de *T. gratilla* criadas em tratamentos (como factores fixos).

Tratamento (pH)	(8.04) - M=-0.0718	(7.67) - M=-0.0886	(7.46) - M=-0.0937	(7.26) - M=-0.1023
8.04		0.000422	0.000231	0.000231
7.67	0.000422		0.002602	0.000231
7.46	0.000231	0.002602		0.000310
7.29	0.000231	0.000231	0.000310	