

BICM

OK
GA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

PAULA NAIANE BRAGA PEREIRA

**“EFEITO DO ANESTÉSICO EUGENOL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DO
SÊMEN DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).”**

**FORTALEZA
2011**

PAULA NAIANE BRAGA PEREIRA

**“EFEITO DO ANESTÉSICO EUGENOL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DO
SÊMEN DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).”**

Trabalho supervisionado (modalidade A).
Monografia submetida ao Departamento de
Curso de Graduação em Engenharia de
Pesca, da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Engenheira de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura.

Orientador: Prof^º. Dr. Wladimir Ronald Lobo
Farias.

**FORTALEZA
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

P494e Pereira, Paula Náiane Braga.
Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / . – 2011.
40 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias
Coorientação : Profa. Ms. Erivânia Gomes Teixeira

1. Aquicultura 2. Tilápia. 3. Qualidade. I. Título.

CDD 639.2

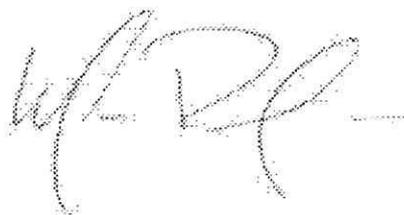
PAULA NAIANE BRAGA PEREIRA

**“EFEITO DO ANESTÉSICO EUGENOL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DO
SÊMEN DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).”**

Monografia submetida ao Departamento do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira de Pesca. Área de concentração: Aquicultura.

Aprovado em: 22 / 11 / 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. WLADIMIR RONALD LOBO FARIAS. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Eng. Pesca RENATO MOREIRA TEIXEIRA, Msc. (Membro)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Eng. Pesca RICARDO LAFAIETE MOREIRA, Msc. (Membro)
Universidade Federal do Ceará – UFC

À minha mãe, **Francisca**, por sempre ter acreditado e apostado em cada passo que dei, pelo seu exemplo de força, garra e perseverança, por ter me ajudado a superar cada dificuldade e compartilhar ao meu lado todas as alegrias. E ao meu querido pai, **Augusto**, que mesmo não estando fisicamente comigo, nosso amor nos liga em qualquer tempo e lugar, e cada lição que aprendi com a sua humanidade, sensibilidade e carinho, foram muito valiosas para a minha trajetória. Nada do que eu faça ou diga expressariam a minha gratidão e amor por vocês...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por inspirar-me serenidade, guiando-me sempre pelo melhor caminho.

Aos meus pais, pelo amor, auxílio financeiro, apoio, e por cada ensinamento digno, que ajudou a moldar meu caráter.

Às minhas irmãs, que sempre se preocuparam com meu progresso, me cercando de carinho e cuidado.

Ao Rafael Martins, meu grande companheiro de sempre, pelo auxílio, força, incentivo e ânimo nas horas difíceis.

Ao Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, pelo acolhimento e receptividade em momentos decisivos da minha vida acadêmica, além da confiança depositada em mim, pelo incentivo e orientação durante a execução deste trabalho.

Aos colaboradores que trabalham na Estação de Piscicultura Prof^o Raimundo Saraiva da Costa e CEBIAQUA, pelo auxílio nos manejos, e em cada procedimento que realizei durante a fase experimental, em especial à Prof^a Erivânia Gomes Teixeira, pelo auxílio e co-orientação em todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Angelita Costa, Glaydson Lima (Tidy), Oscar Pacheco, Plácido Soares, Fellipy Holanda, Perila Maciel, e Roberto Lima, por toda a ajuda, prestatividade e incentivo.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões dadas, que engrandeceram ainda mais este trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca, pelos ensinamentos adquiridos no período de graduação.

Aos amigos que fiz durante a graduação, pelas boas horas de alegrias compartilhadas e auxílio nas dificuldades acadêmicas.

Ao Goulart, pelos sábios conselhos que levarei sempre comigo, e Rafaela Rocha, pela atenção e prestatividade sempre.

E a todos que participaram, direta ou indiretamente deste trabalho.

“A pedra colocada em disciplina é o agente que te assegura a firmeza na construção.”
(Emmanuel)

RESUMO

A utilização de gametas de alta qualidade em reprodutores de peixes cultivados é um fator indispensável para garantir a excelência na produção de descendentes para a aquicultura. Neste trabalho foi avaliada a influência do anestésico natural eugenol sobre a qualidade do sêmen de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*), por meio da determinação da taxa de motilidade espermática, pH, volume de sêmen produzido e do tempo de motilidade dos espermatozoides de amostras de sêmen coletadas de peixes ($n = 10$) anestesiados com 120 mg L^{-1} de eugenol, bem como de animais não submetidos ao anestésico. Além disso, a influência do anestésico na morfologia dos gametas masculinos também foi avaliada, através da observação de 150 espermatozoides de cada peixe, nos dois tratamentos ($n = 8$), visando à viabilidade da utilização deste agente anestésico em procedimentos experimentais. A média da taxa de motilidade espermática do sêmen dos peixes não-anestesiados foi significativamente superior ($91 \pm 9,944\%$) a observada no material coletado dos espécimes anestesiados que foi de $81,5 \pm 7,835\%$, revelando que a taxa de motilidade espermática diminuiu com o uso do anestésico. A variação de pH foi de $8,4 \pm 0,699$ no tratamento controle e de $8,3 \pm 0,483$ nos peixes que passaram por indução anestésica, não havendo assim diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Não houve diferença entre o tratamento controle e o grupo de peixes anestesiados quanto ao volume de sêmen produzido que foi de $310 \pm 137 \mu\text{L}$ e $260 \pm 142 \mu\text{L}$, respectivamente. Os animais do grupo controle apresentaram um tempo médio de motilidade espermática de $588,9 \pm 320$ segundos, enquanto para os espermatozoides dos peixes anestesiados esta média foi de $534,7 \pm 310$ segundos, porém não houve variação estatística significativa entre os dois tratamentos. Nos testes de morfologia espermática, houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos: os peixes do grupo controle apresentaram uma média de $117,50 \pm 3,0$ espermatozoides sem nenhuma deformidade, enquanto que no outro grupo os espermatozoides com ausência de deformidades foram $88 \pm 2,08$. Portanto o anestésico eugenol não é indicado para o uso em reprodutores, pois de acordo com os dados obtidos há prejuízo na produção de gametas masculinos viáveis.

Palavras-chave: Aquicultura, tilápia, eugenol, sêmen, parâmetros e morfologia.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Tilápia em anestesia profunda sob efeito anestésico do eugenol	18
FIGURA 2 Coleta de sêmen. (A) Retirada de sêmen com o auxílio de pipeta após a compressão anteroposterior da região abdominal. (B) Armazenamento do sêmen em tubo de microcentrífuga.	19
FIGURA 3 Microscopia apresentando os defeitos morfológicos mais comuns nos espermatozoides de Tilápia (<i>O. niloticus</i>). A) defeito na região anterior (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração na forma; B) peça intermediária em forma de saca rolha; C) defeitos na região anterior; D) espermatozóide sem cauda (seta) e E) peça intermediária em posição retro-axial.	21
FIGURA 4 Percentual da ausência e presença dos vários tipos de anormalidades morfológicas dos espermatozoides (A, B, C, D e E) dos peixes submetidos ou não à anestesia com eugenol.	27

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 Parâmetros de qualidade do sêmen de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) submetidos ao anestésico eugenol. Médias com $p < 0,05$ apresentam diferença estatística, de acordo com o teste t de Student.	22
TABELA 2 Análise morfológica dos espermatozoides de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) submetidos ou não ao anestésico eugenol. A: Defeitos na região anterior (irregularidade da membrana) e peças intermediárias mal formadas; B: Peças intermediárias em forma de saca rolha; C: Defeitos na região anterior; D: Espermatozoides sem cauda (seta) e E: Peças intermediárias em posição retro-axial. Médias com $p < 0,05$ apresentam diferença estatística, de acordo com o teste t de Student.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Cultivo de tilápias e seu contexto na Aqüicultura mundial	11
1.2 Tilapicultura no Brasil: linhagens introduzidas, produção e qualidade genética	11
1.3 Técnicas de melhoramento genético	12
1.4 Estresse e uso de anestésicos durante o manejo de peixes	13
1.5 Relevância das características seminais para a fertilização	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 Instalações e material biológico	17
2.2 Indução anestésica	17
2.3 Coleta de sêmen	18
2.4 Determinação da taxa de motilidade espermática	19
2.5 pH e volume de sêmen coletado	19
2.6 Tempo de motilidade espermática	20
2.7 Morfologia	20
2.8 Análises estatísticas	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 Parâmetros de qualidade do sêmen de tilápia anestesiada	22
3.2 Morfologia dos espermatozóides	25
4. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cultivo de tilápias e seu contexto na Aqüicultura mundial

Segundo a FAO (2009), o pescado tem se globalizado, e cerca de 40% de toda a produção pesqueira (53 milhões de toneladas) é comercializada em nível internacional. Em 2008, as exportações de pescados geraram 102.000 milhões de dólares. Outra informação importante é que 60% do pescado comercializado se originam em países em desenvolvimento, representando 80% do valor monetário. É neste contexto que o Brasil, com seu potencial hídrico e ambiental, pode se inserir como um grande fornecedor de pescado para o mundo (SCORVO FILHO *et al.*, 2010).

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma espécie de alto interesse comercial, apresentando uma carne de excelente sabor e com boa aceitação no mercado consumidor (HAYASHI *et al.*, 1999). Em sistemas intensivos de produção, a tilápia nilótica se destaca por apresentar rápido crescimento em comparação às demais espécies utilizadas na piscicultura brasileira (FURUYA *et al.*, 2010) e o crescimento mundial de sua produção foi de aproximadamente 2,8 milhões de toneladas em 2008 (FITZSIMMONS, 2010).

1.2 Tilapicultura no Brasil: linhagens introduzidas, produção e qualidade genética

A primeira espécie de tilápia trazida ao Brasil foi a *Tilapia rendalli*, em 1952 (GURGEL 1998), seguida da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em 1971, introduzida mais especificamente no Nordeste, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), que formou um pequeno plantel de reprodutores e suas sucessivas gerações foram utilizadas para peixamentos de açudes e cultivos comerciais. Com o passar do tempo foi observado que os espécimes perderam algumas características essenciais em cultivos intensivos e super-intensivos, como o rápido crescimento e conversão alimentar satisfatória. Este fato ocorreu principalmente devido a ausência de trabalhos e pesquisas relacionadas à seleção de indivíduos de elevado patrimônio genético (LIMA, 1999). Com o objetivo de melhorar a qualidade genética do plantel de tilápias no Brasil, foram importadas da Tailândia,

em 1996, matrizes da linhagem chitralada, conhecida também como tailandesa (ZIMMERMANN, 2000). Em 2002, para suprir a insatisfação dos piscicultores nordestinos com os resultados anteriores da produção de tilápias, o Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) importou um novo lote de tilápias tailandesas da variedade chitralada para formar um plantel de reprodutores de qualidade genética garantida. Havendo, além disso, a intenção de manter um banco de germoplasma visando manter a pureza da linhagem original importada da Tailândia (CAJADO, 2004).

1.3 Técnicas de melhoramento genético

Atualmente há diversos programas de melhoramento genético para a tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Dentre estes, podemos citar: 1) “GIFT” ou Genetic Improvement of Farmed Tilapia, que consiste no desenvolvimento de um estoque através de combinações de espécies e seleções intra-específicas, que englobam o GIFT-GST ou GIFT-Genomar Supreme Tilapia (EKNATH *et al.*, 1993; ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005); 2) GMT ou Genetically Male Tilapia, composto por um estoque de machos modificados em um processo de feminilização, que pode ser obtido através do uso de hormônios feminilizantes, e teste de descendência (MAIR *et al.*, 1995; ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005); 3) FAST ou Freshwater Aquaculture Center-Selected Tilapia, um estoque desenvolvido através de seleção intra-específica (BOLIVAR; NEWKIRK, 2002); 4) GET-EXCEL ou Genetically Enhanced Tilapia, onde há um cruzamento entre os estoques GIFT e FAST; e 5) SEAFDEC - Selected of Southeast Asian Fisheries Development Center, um estoque desenvolvido através de seleção simples em larga escala (BASIAO; DOYLE, 1999). Animais oriundos dos programas GIFT - GST e GMT estão sendo atualmente disseminados pelo mundo, enquanto os demais programas estão sendo aplicados apenas na aqüicultura desenvolvida nas Filipinas (ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005).

Bancos de germoplasma são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro. A formação destes bancos tem contribuído para o desenvolvimento e aplicação de novos métodos de controle reprodutivo, favorecendo a manipulação genética e a seleção de reprodutores, além da redução do estoque de machos, uma vez que os gametas podem ser mantidos por um período de tempo indeterminado (SENHORINI *et al.*, 2006).

A crioconservação permite o armazenamento do sêmen em nitrogênio líquido, a -196 °C, mantendo-se, assim, a permanente viabilidade das células reprodutivas. Dessa forma, o sêmen pode ser utilizado em reproduções futuras, possibilitando reduzir o estoque de machos na piscicultura intensiva e racionalizar o uso de reprodutores geneticamente selecionados (FELIZARDO, 2008). No tocante à atividade produtiva da piscicultura, há muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes (CARNEIRO, 2007). Além disso, a crioconservação facilita um dos grandes objetivos do piscicultor, que é eliminar indivíduos inapropriados para a reprodução e praticar a seleção genética combinando as qualidades desejáveis de diferentes variedades de peixes da mesma espécie, e/ou espécies diferentes (ROSA *et al.*, 1994).

1.4 Estresse e uso de anestésicos durante o manejo de peixes

Em sistemas intensivos de criação de peixes, os espécimes ficam expostos a diversas situações estressantes. Além das altas densidades a que são submetidos durante o cultivo, alguns procedimentos rotineiros da piscicultura como biometria, transporte, reprodução induzida e coleta de ovos são fontes de estresse para estes animais (MOREIRA *et al.*, 2011). Como conseqüências, podem originar desde a perda de apetite e peso, à redução no crescimento, aparecimento de doenças ou até mesmo a morte dos peixes (BARCELLOS *et al.*, 2000).

O conhecimento de métodos que permitam intervenções com o mínimo de alteração nas funções vitais e fisiológicas dos peixes é de suma importância para que a mortalidade seja mínima durante o transporte ou manejo (CUNHA, 2007). Com o intuito de auxiliar nesses procedimentos, visando amenizar a intensidade do estresse destas atividades, têm-se utilizado anestésicos. A escolha do anestésico para peixes, geralmente, está relacionada com a sua viabilidade econômica e considerações legais (IWANA; ACKERMAN, 1994). De acordo com Sylvester (1975), um anestésico deve apresentar uma rápida ação sobre o sistema nervoso, sem complicações posteriores para o peixe. Como cada anestésico exige uma concentração diferente para induzir o estágio anestésico desejado, é necessário atentar para a concentração adequada a ser utilizada no tratamento, para que não haja mortalidades pela exposição indevida ao fármaco (ROUBACH; GOMES, 2001).

A utilização de anestésicos, durante o manejo dos reprodutores, pode aliviar a maioria dos efeitos indesejados do estresse (ROSS; ROSS, 2008), além de reduzir a motilidade e facilitar o manuseio dos peixes (INOUE *et al.*, 2005).

No manejo realizado no congelamento do sêmen de peixes para a preservação do material genético dos reprodutores, os animais são submetidos há uma série de fatores estressantes, desde a captura no tanque até a retirada do líquido seminal (CARNEIRO, 2007; MOREIRA *et al.*, 2011). Nesse contexto, a utilização de anestésicos, durante o manejo dos reprodutores, pode aliviar a maioria dos efeitos do estresse (ROSS; ROSS, 2008), além de reduzir a motilidade dos peixes e facilitar seu manuseio (INOUE *et al.*, 2005).

Existem diversos tipos de anestésicos sintéticos, como a tricafina metano sulfonato (MS 222), o sulfato de quinaldina, a benzocaína e o fenoxietanol, produtos químicos usados extensamente, mas que podem causar perda de muco, irritação das brânquias e danos na córnea (INOUE *et al.*, 2003). Outras inconveniências a cerca do uso de anestésicos sintéticos são a dificuldade de obtenção dos mesmos e o alto custo (INOUE *et al.*, 2005). Deste modo, tem aumentado a procura por anestésicos de fontes naturais que são menos residuais e agressivos, mais viáveis face à dificuldade de obtenção dos químicos utilizados e economicamente compensatórios (FAÇANHA; GOMES, 2005; CUNHA, 2007).

O óleo de cravo é um anestésico derivado da destilação de partes da planta do gênero *Eugenia* que tem como princípio ativo o eugenol, um depressor do sistema nervoso central (SNC) (ANDERSON *et al.*, 1997). Esse composto natural tem sido utilizado como um anestésico alternativo para peixes (MUNDAY; WILSON, 1997; CHO; HEATH, 2000; WOODY *et al.*, 2002; INOUE *et al.*, 2003; ROUBACH *et al.*, 2005). Até o momento, não foram encontrados traços tóxicos deste produto após sua exposição a animais aquáticos, além do fato de ter vasto uso em produtos para os seres humanos em outras áreas como a odontologia, a indústria de alimentos e a fabricação de perfumes, sem a constatação de nenhum risco, inclusive ambiental. O eugenol é um composto orgânico seguro e não-mutagênico e totalmente eliminado da corrente sanguínea e do tecido muscular de peixes em menos de dois dias após o seu uso (SLADKY *et al.*, 2001; WOODY *et al.*, 2002). De acordo com os autores Soto e Burhanuddin (1995), Tort *et al.* (2002) e Inoue *et al.* (2005), o eugenol pode, além de reduzir o estresse em peixes, apresentar um efeito anti-séptico.

1.5 Relevância das características seminais para a fertilização

Em cultivos de peixes, há um grande risco de reproduções com alto nível de consangüinidade entre os espécimes, produzindo linhagens homozigotas de baixa qualidade reprodutiva. Quando se utiliza um número reduzido de reprodutores do sexo masculino, o acompanhamento do plantel é favorecido e fica garantido que os espécimes da população estão contribuindo para o “pool” genético da prole (WILLIOT *et al.*, 2000). A indústria do cultivo de peixes vem direcionando suas pesquisas em torno da qualidade dos ovos e larvas. No entanto, é também necessário atentar para a qualidade do esperma, já que pode afetar diretamente a produção de larvas saudáveis. A preservação do sêmen de peixes tem se tornado uma alternativa indispensável na seleção de espécimes com melhores características genéticas que produzem gametas de melhor qualidade (RURANGWA *et al.*, 2004).

A utilização de gametas de alta qualidade em reprodutores de peixes cultivados é um fator indispensável para garantir a excelência na produção de descendentes para a aqüicultura (KJØRSVIK *et al.*, 1990; BROMAGE; ROBERTS, 1995).

A qualidade do sêmen pode ser definida pela análise de parâmetros como a motilidade espermática, o vigor espermático, o pH, a concentração de espermatozóides e a morfologia espermática (STREIT JR., 2006). Dentre os parâmetros avaliados, a motilidade espermática é um fator preponderante para determinação da qualidade do sêmen (BILLARD *et al.*, 1995; COSSON *et al.*, 1999; RURANGAWA *et al.*, 2004). O vigor espermático, caracterizado pela velocidade com que os espermatozóides se movimentam, é outro parâmetro essencial na avaliação das condições dos gametas masculinos de peixes (COSSON *et al.*, 1999; VERMEIRSSSEN *et al.*, 2003). Já o tempo de vida dos espermatozóides, para Stoss (1983) e Cosson *et al.* (1999), varia entre as espécies de peixes e coincide, geralmente, com o período de fertilização dos ovócitos, relacionando-se diretamente ao tempo de intensidade da motilidade. De acordo com Cosson *et al.* (1999), anormalidades morfológicas nas células espermáticas são responsáveis pela diminuição na motilidade espermática, ocasionando uma redução na fertilização.

O interesse em desenvolver ferramentas para avaliar a qualidade dos espermatozóides em peixes tem sido motivado por vários objetivos, dentre eles a preservação de gametas masculinos que apresentem potencial reprodutivo e o estudo do impacto da exposição dos indivíduos em contato com outras substâncias, tais como durante a indução hormonal e anestésica (RURANGWA *et al.*, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do anestésico eugenol sobre a qualidade do sêmen de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por meio da determinação da taxa de motilidade espermática, pH e volume de sêmen produzido, bem como tempo de motilidade e morfologia dos gametas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Instalações e material biológico

Os testes foram realizados nas dependências da Estação de Piscicultura Prof. Dr. Raimundo Saraiva da Costa, pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Os peixes, provenientes do mesmo local, foram alimentados, com ração extrusada contendo 28% de proteína bruta, fornecida a 2% da biomassa, duas vezes ao dia.

Foram selecionados 28 exemplares adultos ($559,25 \pm 162,12$ g; $30,87 \pm 2,37$ cm) de tilápia, *O. niloticus*, pertencentes ao plantel de reprodutores da própria Estação. Os espécimes foram submetidos à biometria e, em seguida, estocados em um tanque de alvenaria com capacidade para 5.000 L com renovação contínua de água. A alimentação foi suspensa 12 horas antes dos procedimentos experimentais.

2.2 Indução anestésica

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol), devido sua natureza hidrofóbica, foi diluído em álcool etílico P.A., resultando em uma solução estoque na concentração de 1000 mg mL^{-1} , em conformidade com a metodologia proposta por Vidal *et al.* (2008). A concentração de anestésico utilizada foi de 120 mg mL^{-1} , recomendada para anestesia profunda e ideal para manejos rápidos. O estágio de anestesia profunda foi atingido em um tempo aproximado de 147,2 segundos (MOREIRA *et al.*, 2010).

Para a indução anestésica, foi utilizado um aquário com volume útil de 60 L com 30 L de água acrescidos de 3,6 mL de solução estoque de eugenol. Em seguida, os espécimes foram divididos em dois grupos. No primeiro, cada peixe foi exposto individualmente ao anestésico e ao atingir o estágio de anestesia profunda, foram transferidos para a bancada de procedimentos para a coleta de sêmen. Já os peixes do segundo grupo (controle) não passaram por exposição anestésica.

2.3 Coleta de sêmen

Entre os animais selecionados, dez machos foram expostos individualmente ao anestésico, em aquários com volume útil de 30 L, onde permaneceram até atingirem o estágio de anestesia profunda (Figura 1).



Figura 1: Tilápia em anestesia profunda sob efeito anestésico do eugenol

Os peixes anestesiados foram individualmente transferidos para a bancada de manejo, onde cada espécime foi envolvido em toalha úmida e sua região urogenital foi seca com uso de papel toalha. O sêmen foi coletado sem nenhum contato com qualquer tipo de líquido (urina, água ou muco), evitando sua ativação precoce. Para isso, foram realizadas suaves compressões na região abdominal do peixe, no sentido anteroposterior e o sêmen foi coletado com o auxílio de micropipeta (Figura 2A) e imediatamente transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 mL (Figura 2B). As amostras coletadas foram acondicionadas em caixa térmica sob temperatura de 6 °C até o momento de seu uso no laboratório. O intervalo de tempo entre a coleta de sêmen do primeiro peixe até a última coleta foi de aproximadamente vinte minutos.

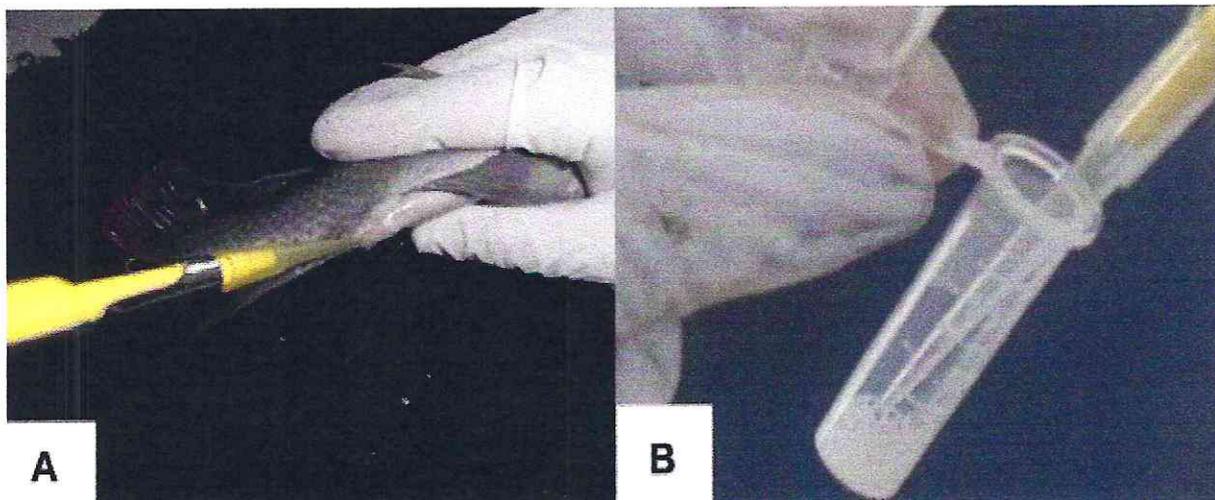


Figura 2: Coleta de sêmen. (A) Retirada de sêmen com o auxílio de pipeta após a compressão anteroposterior da região abdominal. (B) Armazenamento do sêmen em tubo de microcentrífuga.

2.4 Determinação da taxa de motilidade espermática

Para determinação da taxa de motilidade espermática, uma alíquota de 2 μL de sêmen fresco de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina ao microscópio óptico focalizado no momento, com um aumento de 400x.

Em seguida os espermatozóides foram ativados através da adição de 20 μL de água destilada e a motilidade foi determinada através da estimativa da taxa de espermatozóides móveis, utilizando uma escala arbitrária de 0 a 100%, estimada por um único observador e conforme a metodologia usada por Maria *et al.*, (2004).

2.5 pH e volume de sêmen coletado

No momento da coleta do sêmen, uma alíquota de aproximadamente 50 μL de cada amostra foi colocada sobre uma fita de papel de pH da marca Merck, e o valor foi aferido de acordo com a escala de cores do fabricante. Já o volume individual de sêmen foi determinado durante a coleta com auxílio de micropipetas automáticas com variação de 2 a 100 μL .

2.6 Tempo de motilidade espermática

Uma alíquota de 2 μL de cada amostra de sêmen foi depositada sob uma lâmina de vidro e levada ao microscópio óptico para certificação da ausência de contaminação durante a coleta. De cada amostra livre de contaminação, uma segunda alíquota de mesmo volume foi misturada com 20 μL de água destilada para induzir a ativação dos espermatozóides. Em seguida, o tempo de motilidade foi cronometrado e registrado a partir do momento da ativação dos espermatozóides até o momento em que todas as células se tornaram imóveis.

Os indivíduos do grupo controle ($n = 10$), que não passaram pela exposição ao anestésico, foram submetidos aos mesmos procedimentos de coleta para a determinação do pH, volume de sêmen coletado, taxa e tempo de motilidade espermática.

2.7 Morfologia

Para a verificação da morfologia dos espermatozóides, o sêmen foi diluído em uma solução de formol-salino tamponado a 1%, na proporção de 1:100 (sêmen:diluidor). Em seguida, foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, utilizando uma alíquota de 10 μL de sêmen diluído e 10 μL dos corantes eosina-nigrosina, conforme Murgas et al. (2003).

Após a secagem da lâmina em corrente de ar durante cinco minutos, a mesma foi levada ao microscópio óptico para observação com um aumento de 400x. As anormalidades morfológicas observadas, de acordo com Kavamoto et al. (1999), foram as seguintes: defeito na região anterior do espermatozóide (irregularidade na membrana) e na peça intermediária (Figura 3A); peça intermediária em forma de saca rolha (Figura 3B); defeitos na região anterior do espermatozóide (Figura 3C); espermatozóide sem cauda (Figura 3D) e gameta contendo peça intermediária em posição retro-axial (Figura 3E). A classificação dos espermatozóides, dentro das anormalidades, foi realizada em um total de 150 espermatozóides por lâmina.

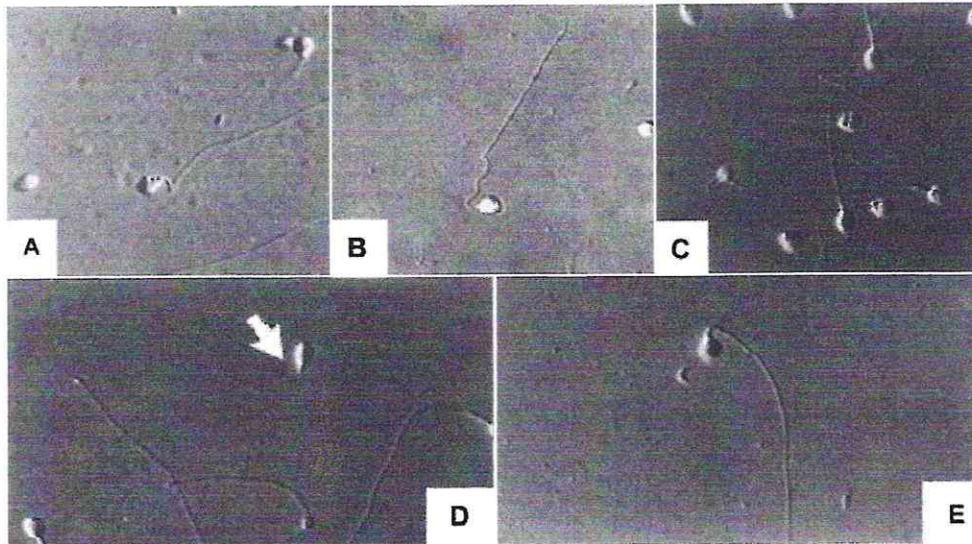


Figura 3: Microscopia apresentando os defeitos morfológicos mais comuns nos espermatozoides de Tilápia (*O. niloticus*). A) defeito na região anterior do espermatozóide (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração na forma; B) peça intermediária em forma de saca rolha; C) defeitos na região anterior do espermatozóide; D) espermatozóide sem cauda (seta) e E) peça intermediária em posição retro-axial (KAVAMOTO et al., 1999).

2.8 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de teste de t de Student a 5% de probabilidade, para verificação das diferenças entre as médias das amostras independentes. As análises foram realizadas utilizando o software BIOESTAT 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros de qualidade do sêmen de tilápia anestesiada

A análise dos parâmetros de qualidade do sêmen revelou diferenças significativas entre as taxas de motilidade espermática dos reprodutores do grupo controle e dos peixes anestesiados. No entanto, não houve variações estatisticamente significativas entre os dois tratamentos com relação ao pH, volume de sêmen coletado e tempo de motilidade espermática (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de qualidade do sêmen de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ao anestésico eugenol.

Parâmetros de qualidade do sêmen	Tratamentos		p-valor
	Controle	Anestesiados	
Taxa de motilidade (%)	91 ± 9,944	81,5 ± 7,835	<0,05
pH	8,4 ± 0,699	8,3 ± 0,483	Ns
Volume de sêmen (µL)	310 ± 137	260 ± 142	Ns
Tempo de motilidade (s)	588,9 ± 320	534,7 ± 310	Ns

Médias com $p < 0,05$ apresentam diferença estatística, de acordo com o teste t de Student.

A motilidade espermática é um dos principais requisitos a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes (GODINHO, 2000) e é influenciada por inúmeros fatores como temperatura, estado nutricional, condições de análise, manejo e estresse dos doadores.

No presente trabalho, a taxa de motilidade espermática em peixes não-anestesiados ficou em torno de 91%. Valores similares (97,77%) foram encontrados por Murgas *et al.* (2003) para a Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), enquanto que Cruz (2001) verificou uma taxa de motilidade espermática de 90% para *Prochilodus lineatus*. Já Matavelli *et al.* (2007) registraram, para a tilápia do Nilo, uma taxa de aproximadamente 81%.

A taxa de motilidade espermática dos espécimes submetidos ao efeito do anestésico foi significativamente inferior ($81,5 \pm 7,835\%$) (Tabela 1). O mesmo teste foi realizado por Wagner *et al.* (2002) em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) e seus resultados diferiram dos obtidos no presente estudo, tendo em vista que a porcentagem de espermatozóides móveis não foi afetada pelo tratamento anestésico dos reprodutores.

De acordo com os dados obtidos, pode-se afirmar que a anestesia dos peixes com eugenol influenciou negativamente na taxa de motilidade espermática da tilápia do Nilo (*O. niloticus*), de modo a comprometer significativamente a movimentação dos espermatozóides.

As médias dos valores de pH do sêmen dos peixes não anestesiados e anestesiados com eugenol foram, aproximadamente, 8.4 e 8.3, respectivamente (Tabela 1). Não havendo, portanto, diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados que apresentaram valores de pH levemente básicos.

Valores semelhantes aos encontrados neste estudo, foram obtidos por Alavi *et al.* (2005) para *Parasalmo mykiss* (7.8). Enquanto que para o *Carassius gibelio* o valor médio encontrado foi de 8.7 (TAATI *et al.*, 2010). Estudos realizados por Chao *et al.*, (2006) registraram valores de pH que variaram de 6.2 a 8.2 para sêmen de diferentes espécies de tilápia. O pH do sêmen de *Labeo calbasu* foi de 8.1 (VERMA, 2009) e para os sêmens de *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* foram encontrados valores de 8.0, 8.0 e 8.5, respectivamente (MOJICA, 2004), enquanto para o sêmen do tambaqui, *Colossoma macropomum*, foi encontrado um pH médio de 8.2 (VIEIRA, 2010).

O pH do sêmen tem pouco efeito sobre a ativação dos espermatozóides de peixes (CHRISTEN *et al.*, 1983), no entanto estudos realizados por Lahnsteiner *et al.* (1996) relataram uma significativa relação entre o pH do sêmen e espermatozóides móveis em *Alburnus alburnus* (Ciprinidae), sugerindo que este parâmetro é uma característica importante do plasma seminal e que pode influenciar no potencial de mobilidade dos espermatozóides (ALAVI; COSSON, 2005).

Outro parâmetro importante é o volume de sêmen coletado dos reprodutores. Este valor varia intra e interespecificamente, podendo ser influenciado por fatores bióticos e abióticos.

Nos resultados obtidos neste trabalho, o volume médio de sêmen coletado pelos animais do grupo controle foi de $310 \pm 137 \mu\text{L}$ (Tabela 1), bem semelhante ao valor médio de $300 \mu\text{L}$ encontrado por Chao *et al.* (2006) para a mesma espécie e sem diferença do obtido dos espécimes que foram submetidos ao anestésico eugenol ($260 \pm 142 \mu\text{L}$). De acordo com

Mataveli *et al.* (2007), o valor médio estimado para tilápia tratada com ração suplementada com vitamina C foi de 350 μ L.

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais comuns empregados no estudo da biologia do sêmen de peixes e é um requisito importante na determinação da qualidade e capacidade de fertilização do sêmen (BILLARD, 1978; STOSS, 1983). Dentre os requisitos utilizados para avaliação desta motilidade, um dos mais aplicados é a sua duração, período de tempo necessário para cessar completamente a mobilidade dos espermatozoides a partir de sua ativação (BILLARD, 1986).

Nessa pesquisa, os espécimes que não foram anestesiados com o eugenol (controle) apresentaram tempo médio de motilidade espermática de $588,9 \pm 320$ segundos e, para o grupo de animais submetidos ao tratamento com anestésico, o tempo médio foi de $534,7 \pm 310$ segundos (Tabela 1). Estes números foram superiores aos encontrados para o suruvi, *Steindachmeridion scripta*, (LUZ *et al.*, 2001) e para o jundiá, *Rhandia quelen*, (FERREIRA *et al.*, 2001), cujas médias foram de 132 e 62 segundos, respectivamente. Ao passo que Franciscatto *et al.* (2002) registraram um tempo de motilidade de 96 segundos para *Prochilodus lineatus* e Amorim (2002) observou para o sêmen de tilápia do Nilo, linhagem Thai-Chitralada, tempos de motilidade variando de 9 ± 22 a $261 \pm 91,8$ segundos após a utilização de diferentes crioprotetores.

Os espermatozoides esgotam suas reservas energéticas rapidamente e o conhecimento desse tempo é fundamental para cada espécie. De acordo com Carneiro (2007), espermatozoides de salmão e truta nadam vigorosamente por alguns segundos enquanto que outras espécies como dourado (*Salminus maxillosus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e tilápia (*O. niloticus*) produzem espermatozoides que permanecem ativos por alguns minutos.

Nesse trabalho, embora possa ser verificada uma tendência de diminuição no tempo médio de motilidade espermática no grupo dos peixes anestesiados, em relação ao grupo controle, não houve variação estatística significativa entre os dois tratamentos (Tabela 1). No entanto, nos testes feitos com truta arco íris, utilizando eugenol, a duração da motilidade espermática diminuiu significativamente à medida que houve um aumento na concentração do agente anestésico (WAGNER *et al.*, 2002).

3.2 Morfologia dos espermatozoides

Os espermatozoides podem apresentar alterações morfológicas de origem xenobiótica, genética ou por envelhecimento e degradação que podem ser provocadas por protocolos de conservação e manejo inadequados (FAUVEL *et al.*, 2010). Estudos sobre a morfologia das células espermáticas e sua interferência na capacidade de fertilização despertaram um grande interesse com o advento da inseminação artificial em mamíferos (KAVAMOTO *et al.*, 1999). Em peixes, as alterações morfológicas das células espermáticas podem interferir nos resultados da propagação artificial de espécies de piracema, no sucesso de programas de melhoramento genético e na qualidade de bancos de sêmen criopreservados. Gwo, Kurokura e Hirano (1993) estudaram a capacidade de fertilização e a motilidade dos espermatozoides descongelados de truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, da carpa, *Cyprinus carpio*, e do baiacu, *Fugu niphobles*, relacionando-as com suas alterações morfológicas.

No presente trabalho, o grupo de tilápias que não recebeu o anestésico apresentou um número expressivo de espermatozoides morfológicamente normais, quando comparados com grupo de peixes anestesiados, que mostrou diversas alterações na morfologia espermática, diferindo estatisticamente do controle quanto aos defeitos na região anterior (C) e na posição da peça intermediária (E) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise morfológica dos espermatozoides de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ou não ao anestésico eugenol.

Defeitos morfológicos*	Tratamentos		p-valor
	Controle	Anestesiados	
Ausência	117,50 ± 3,0	88,5 ± 2,08	<0,05
A	1,75 ± 0,96	3,75 ± 2,99	Ns
B	14,25 ± 7,18	19,75 ± 2,50	Ns
C	3,25 ± 1,71	12,0 ± 5,48	<0,05
D	5,75 ± 0,96	8,25 ± 4,57	Ns
E	8,0 ± 3,37	17,75 ± 3,86	<0,05

* A: Defeitos na região anterior do espermatozoide (irregularidade da membrana) e peças intermediárias mal formadas; B: Peças intermediárias em forma de saca rolha; C: Defeitos na região anterior do espermatozoide; D: Espermatozoides sem cauda (seta) e E: Peças intermediárias em posição retro-axial. Médias com $p < 0,05$ apresentam diferença estatística, de acordo com o teste t de Student.

A média de espermatozoides com ausência de defeitos morfológicos foi de $117,50 \pm 3,0$ no grupo controle, mas decresceu significativamente no grupo dos peixes submetidos ao anestésico, apresentado valores médios de $88,5 \pm 2,08$ espermatozoides (Tabela 2). A média de espermatozoides com defeitos em sua região anterior e peças intermediárias mal formadas (A) aumentou de $1,75 \pm 0,96$ no grupo controle, para $3,75 \pm 2,99$ nos peixes anestesiados, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos. O valor médio de células com peças intermediárias na forma de saca-rolha (B) cresceu de $14,25 \pm 7,18$ no tratamento controle para $19,75 \pm 2,50$ no grupo dos peixes anestesiados, embora também não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre estes. O número de espermatozoides com defeitos em sua região anterior (C) apresentou expressiva diferença entre os tratamentos, sendo $3,25 \pm 1,71$ no controle e $12,0 \pm 5,48$ nos peixes induzidos à anestesia. Houve uma pequena variação na quantidade de células sem cauda (D) nos grupos testados com uma média de $5,75 \pm 0,96$ no controle, enquanto nos anestesiados foi de $8,25 \pm 4,57$. Apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos, o maior desvio foi observado nos animais anestesiados. O número de espermatozoides com peças intermediárias em posição retro-axial (E) diferiu estatisticamente entre os tratamentos, passando de $8,0 \pm 3,37$ no grupo controle para $17,75 \pm 3,86$ nos peixes submetidos à anestesia.

Kavamoto *et al.* (1998) avaliou as anormalidades morfológicas dos espermatozoides do curimatá (*Prochilodus scrofa*) e, após reunir todos os defeitos, obteve em média 9,54% de anormalidades. Segundo os autores, as que ocorreram com mais frequência foram caudas dobradas ou enroladas e ausência de cauda. No presente estudo, as anormalidades encontradas no conjunto de espermatozoides do grupo controle resultaram em um total de 22%, enquanto que nos peixes anestesiados esse percentual cresceu para 41% (Figura 4). As anormalidades mais frequentes foram peças intermediárias em forma de saca rolha (ocorrência nos dois tratamentos); defeitos na região anterior, mais evidenciados no tratamento com peixes anestesiados; espermatozoides sem cauda (ocorrência nos dois tratamentos) e peças intermediárias em posição retro-axial (cauda dobrada), que foi mais evidente no grupo de peixes anestesiados.

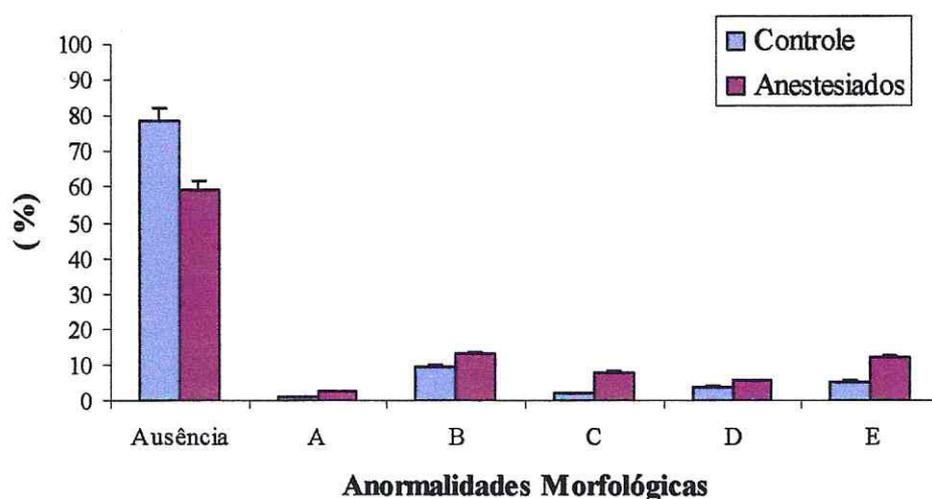


Figura 4. Percentual da ausência e presença dos vários tipos de anormalidades morfológicas dos espermatozoides (A, B, C, D e E) dos peixes submetidos ou não à anestesia com eugenol.

Bombardelli *et al.* (2010) mostraram que o aumento no nível de energia nas rações de reprodutores de tilápia do Nilo diminuiu os índices de anormalidade morfológica nos espermatozoides. Por outro lado, Mataveli *et al.* (2007) verificaram que a vitamina C não influenciou na morfologia dos espermatozoides saudáveis da tilápia do Nilo, porém, houve um aumento do aparecimento de células com defeitos na cabeça e surgimento de deformidades na cauda (deformidades primárias) e uma diminuição de espermatozoides sem

cauda e com gota citoplasmática proximal ou distal (deformidades secundárias). Estes resultados podem ser um indicativo de que a exposição de peixes desta espécie a agentes externos como anestésicos e outros fármacos pode influenciar na morfologia dos espermatozóides, podendo afetar na fertilização.

Apesar da realização de alguns estudos sobre a morfologia espermática em peixes (BOMBARDELLI *et al.*, 2006a; STREIT Jr. *et al.*, 2006), ainda falta uma definição a cerca do índice de anormalidade aceitável para reprodutores em estações comerciais de cultivo. Em mamíferos, animais com índices de anormalidade espermática superiores a 30% são considerados inadequados para o uso em fertilização artificial ou monta natural (CBRA, 1998).

4. CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados obtidos pelo presente estudo, conclui-se que:

1. O uso do anestésico eugenol reduz a taxa de motilidade espermática, porém, não interfere no pH, volume de sêmen produzido e tempo de motilidade espermática.
2. O agente anestésico pode influenciar na morfologia dos espermatozóides, de modo a contribuir para o aumento de deformidades.

Os resultados sugerem ainda que o uso de eugenol como anestésico para reprodutores de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) pode comprometer a qualidade dos espermatozóides, o que, conseqüentemente, poderá influenciar na fertilização. As pesquisas sobre os efeitos da anestesia em relação à viabilidade de gametas são limitadas, fazendo-se necessário a realização de estudos mais aprofundados para estes fins.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I. Effects of pH and temperature: a review. **Cell Biology International**, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.
- AMORIM, V. M. C. **Criopreservação do sêmen de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), variedade chitralada**. 64 f. 2002. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 17, n. 2, p. 301-307, 1997.
- BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G. de; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BASIAO, Z. U.; DOYLE R, W. Test of size-specific mass selection for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. cage farming in the Philippines. **Aquaculture Research**, v. 30, n. 5, p. 373-378, 1999.
- BILLARD, R. *et al.* Broodstock management and seed quality - General considerations. *In*: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 1-24.
- BILLARD, R. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. **Aquaculture**, v. 14, n. 3, p. 98-187, 1978.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.
- BOLIVAR, R. B.; NEWKIRK G. F. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. **Aquaculture**, v. 204, n. 3/4, p. 371-381, 2002.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 941-949, 2010.

BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARDM, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006a.

BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995.

CAJADO, F. J. L. **Avaliação dos procedimentos de introdução de tilápias tailandesas (*Oreochromis niloticus* var *chitralada*) no Estado do Ceará**. 59 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.

CHAO, N. H. *et al.* The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. **Journal of Fish Biology**, v. 30, n. 2, p. 107-118, 2006.

CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, n. 6, p. 537-546, 2000.

CHRISTEN, R.; SCHACKMANN, R.; SHAPIRO, B. M. Metabolism of sea urchin sperm: interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. **The Journal Biological Chemistry**, v. 258, p. 258-5392, 1983.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte, 1998. p. 49.

COSSON, J. *et al.* Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. *In*: GAGNON, C. **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Paris: Cache River, 1999. p. 161-186.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CUNHA, M. A. **Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007. p. 10.

ROMANA-EGUIA et al. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquaculture Research**, p. 36, 69-78, 2005.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

FAUVEL1, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 636–643, 2010.

FELIZARDO, V. O. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyianus*): Congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FERREIRA, A. A. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

FITZSIMMONS, K. **Tilapia: 2009 - State of the Industry Report, 2010**, San Diego, CA. Disponível em: <<https://www.was.org/WasMeetings/Meetings/SessionAbstracts.aspx?Code=AQ2010&Session=31>>. Acesso em: 27 jun. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **El estado mundial de La pesca y La acuicultura**. 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/a1495e/a1495e00.htm>>. Acesso em: 17 jul. 2011.

FRANCISCATTO, R. T. *et al.* Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após o resfriamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

FURUYA, W. M. *et al.* Exigências nutricionais. In: FURUYA, W. M. *et al.* (Ed.). **Tabelas brasileiras para nutrição de tilápias**. GFM, Toledo. p. 25-42. 2010.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 203, p. 6-20, 2000.

GURGEL, J. J. S. Potencialidade do cultivo de tilápia no Brasil. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1998. p. 345 - 352.

GWO, J. C.; KUROKURA, H.; HIRANO, R. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp and marine puffer. **Nippon Suissan Gakkaishi**, v. 59, n. 5, p. 777-821, 1993.

HAYASHI, C. *et al.* Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 21, n. 3, p. 733-737, 1999.

INOUE, L. A. K. A. *et al.* Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 2, p. 289-295, 2005.

INOUE, L. A. K. A. *et al.* Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

IWANA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. *In*: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier Science, 1994. cap. 1, p. 1-5. v. 3.

KAVAMOTO, E. T. *et al.* Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *prochilodus scrofa* (steindachner, 1881) (osteichthyes, characiformes, prochilodontidae), **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 61-66, 1998/1999.

KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Mudanças morfológicas dos testículos de curimatá *Prochilodus scrofa* (steindachner) (teleostei, prochilodontidae), submetido à indução hormonal. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 109 - 115, 1998.

KJØRSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg quality in fishes, **Advances in Marine Biology**, v. 26, p. 71-113, 1990.

LAHNSTEINER, F. *et al.* Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 167-179, 1996.

LIMA, F. M. **Estudo da variabilidade genética através de marcadores moleculares do tipo RAPD em algumas espécies e híbridos de tilápias (pisces, Cichlidae)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

LUZ, R. K.; FERREIRA.; REYNALTE, D. A. T.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachmeridion scripta* (Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2001.

MAIR G. C. *et al.* Growth performance trials of genetically male (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L. On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. **Aquaculture**, v. 137, n. 1/4, p. 313-322, 1995.

MARIA, A. N. *et al.* Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). **Ciência Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 191–194, 2004.

MATAVELI, M. *et al.* Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim Institucional da Pesca**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2007.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. Mestrado (Dissertação em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2004.

MOREIRA, A. G. L. *et al.* Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 12, n. 3, p. 794-804, 2011.

MOREIRA, A. G. L. *et al.* Eficácia do eugenol extraído da planta *Eugenia aromatica* como anestésico para realização de biometrias em adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 4, p. 419-423, 2010.

MUNDAY, P. L.; WILSON, S. K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinesnsis*, a coral reef fish. **Jornal Fish Biology**. v. 51, p. 931-938, 1997.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação Espermiática Pós-Descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003. Suplemento 2.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z.; TANIGUCHI, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquaculture Research**. v. 36, n. 1, p. 69-78, 2005.

ROSA, J. C. S.; SILVA, J. W. B.; OLIVEIRA, J. W. B. Propagação artificial do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) GUNTHER, 1870, com extrato de hipófise. **Ciência agrônômica**, v. 25, n. 1/2, p. 44-52, 1994.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 2008.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.

ROUBACH, R. *et al.* Eugenol as an efficacious anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

RURANGWA, E. *et al.* The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1, p. 1-28, 2004.

SCORVO FILHO, J. D. *et al.* A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 112-118, 2010.

SENHORINI, A. *et al.* Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in Matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

SLADKY, K. *et al.* Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anaesthetic in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

SOTO, C.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p. 149-152, 1995.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. *In*: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. Orlando: Academic, 1983. p. 305-350.

STREIT JR. D. P. *et al.* Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 3, p. 119-125, 2006.

SYLVESTER, J. R. Factors influencing the efficacy of MS-222 to striped mullet (*Mugil cephalus*). **Aquaculture**, v. 6, n. 2, p. 163-169, 1975.

TAATI, M. M. *et al.* Correlation between chemical composition of seminal plasma and sperm motility characteristics of Prussian carp (*Carassius gibelio*). **AAFL Bioflux**, v. 3, n. 3, p. 3, 2010.

TORT, L. *et al.* Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.

VERMA, D. K. *et al.* Physical and Biochemical Characteristics of Semen and Ultrastructure of Spermatozoa in Six Carp Species. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 67-76, 2009.

VERMEIRSEN, E. L. M. *et al.* Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin releasing hormone agonist implant. **Aquaculture**, v. 230, n. 3, p. 547-567, 2003.

VIDAL, L. V. O. *et al.* Eugenol como anestésico para tilápia do Nilo. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43 n. 8, p. 1069-1074, 2008.

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de coco em pó (ACP - 104).** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, n. 1/4, p. 353-366, 2002.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E. F.; GONCHARO, B. F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) Brandt. **Aquaculture**, v. 189, n. 1/2, p. 53-61, 2000.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347, 2002.

ZIMMERMANN, S. Bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 10, n. 60, p. 15-19, 2000.