



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

CARLOS RIEDEL PORTO CARREIRO

INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NA SEXAGEM, MANEJO REPRODUTIVO
E CRESCIMENTO DO PIRARUCU, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822),
(ACTINOPTERYGII, ARAPAIMIDAE) CULTIVADO NO CENTRO DE
PESQUISAS EM AQUICULTURA RODOLPHO VON IHERING (CPA) DO
DNOCS, PENTECOSTE, ESTADO DO CEARÁ

FORTALEZA
2012

CARREIRO

INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NA SEXAGEM, MANEJO REPRODUTIVO E CRESCIMENTO DO PIRARUCU, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822). (ACTINOPTERYGII, ARAPAIMIDAE) CULTIVADO NO CENTRO DE PESQUISAS EM AQUICULTURA RODOLPHO VON IHERING (CPA) DO DNOCs, PENTECOSTE, CEARÁ

2012
v. 1

CARLOS RIEDEL PORTO CARREIRO

INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NA SEXAGEM, MANEJO REPRODUTIVO E
CRESCIMENTO DO PIRARUCU, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822),
(ACTINOPTERYGII, ARAPAIMIDAE) CULTIVADO NO CENTRO DE
PESQUISAS EM AQUICULTURA RODOLPHO VON IHERING (CPA) DO
DNOCS, PENTECOSTE, ESTADO DO CEARÁ

Tese de doutorado submetida à coordenação do programa de pós-graduação em engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em engenharia de pesca. Área de concentração: Recursos pesqueiros em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, Ph.D.

FORTALEZA
2012

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

C311i Carreiro, Carlos Riedel Porto.
Inovações tecnológicas na sexagem, manejo reprodutivo e crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822), (Actinopterygii, Arapaimidae) cultivado no Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolfo von Ihering (CPA) do DNOCS, Pentecoste, Estado do Ceará / Carlos Riedel Porto Carreiro. – 2012.
153 f. : il., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientação: Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto.

1. Pirarucu (Peixe) – Reprodução. 2. Pirarucu (Peixe) – Crescimento. I. Título.

CARLOS RIEDEL PORTO CARREIRO

INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NA SEXAGEM, MANEJO REPRODUTIVO
E CRESCIMENTO DO PIRARUCU, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822),
(ACTINOPTERYGII, ARAPAIMIDAE) CULTIVADO NO CENTRO DE
PESQUISAS EM AQUICULTURA RODOLPHO VON IHERING (CPA) DO
DNOCS, PENTECOSTE, ESTADO DO CEARÁ

Esta tese foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos pesqueiros e Engenharia de Pesca

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, Ph.D. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Cassiano Monteiro Neto, Ph.D.
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof. Alberto Jorge Pinto Nunes, Ph.D.
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Haroldo Gomes Barroso, D.Sc.
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof. Thales Passos de Andrade, Ph.D.
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Elizabeth, Marilene e Letícia: razão, causa
e consequência da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP) do Governo do Estado do Ceará, e ao Centro de Aperfeiçoamento Pessoal do Ensino Superior (CAPES) do Ministério da Educação pelos auxílios concedidos na forma de Bolsa de Doutorado, no período de março de 2007 a março de 2011.

Ao Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), pelo apoio financeiro ao Projeto Pirarucu, desenvolvido no Centro de Pesquisa em Aquicultura Rodolpho von Ihering (CPA) do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS).

Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) pela concessão de toda estrutura física, logística e laboratorial, sem a qual não seria possível a execução desta Tese.

Ao professor, orientador e amigo, Manuel Furtado, por suas valiosas orientações nas mais diversas áreas de conhecimentos.

Em especial ao Mestre em Engenharia de Pesca *Pedro Eymard*, Coordenador de Pesquisas em Aquicultura do DNOCS, pelo apoio científico e logístico, assim como, pelo entusiasmo com que acompanhou a realização deste estudo.

Ao tecnólogo em aquicultura, Tácito Araújo, por compartilhar seus valiosos conhecimentos.

Ao Tio Osvaldo Riedel, por suas inspiradoras colaborações.

Ao meu irmão Fernando, por seus aconselhamentos ao longo de minha vida.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa em Aquicultura CPA/DNOCS, pelo convívio harmonioso. Finalmente, agradeço àqueles que, de uma ou outra forma, colaboraram para a concretização deste estudo.

“All those moments will be lost in the time, like tears in the rain”

Philip Kendrick

RESUMO

A tese trata da sexagem, reprodução, alevinagem e crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas*. No primeiro capítulo foram revelados aspectos históricos da introdução e reintrodução do pirarucu nos açudes do nordeste do Brasil objetivando o desenvolvimento de pesquisas de manejo, crescimento e reprodução voltadas à produção aquícola. No segundo capítulo foram desenvolvidas diferentes tecnologias para a identificação sexual do pirarucu: ultrassom, que gerou imagens distintas para gônadas masculinas e femininas; a laparoscopia que gerou imagens nítidas das gônadas, distinguindo-se inclusive estágios de ovócitos. Testou-se ainda as variações nos níveis de estradiol e testosterona em alevinos e juvenis de pirarucu, não sendo possível a utilização deste método para determinação do sexo, em virtude de não haver correlação entre a concentração dos hormônios e o comprimento dos pirarucus. Reações de RAPD foram utilizadas buscando determinar polimorfismos entre sexo de espécimes de pirarucu, indicando a necessidade de estudos mais profundos e testes com novos *primers*. No terceiro capítulo foram estudados alguns aspectos do manejo reprodutivo: As precipitações pluviais apresentaram correlação positiva com a frequência de desovas do pirarucu no Ceará, sendo março o mês de maior ocorrência. Ainda neste capítulo, descreve-se a implantação de *transponders* eletrônicos em pirarucus; A introdução dos *transponders* revelou uma nova dinâmica comportamental de cortejo, com formação de novos casais. Outro aspecto foi o treinamento alimentar. Foram observados dois sistemas de treinamento alimentar, o primeiro com utilização de transição gradual de alimento vivo para ração comercial seca e o segundo com alevinos deixados nos viveiros de reprodução com cuidado parental, estes sofreram maior mortalidade apresentando ainda comprimento e peso superiores aos exemplares submetidos ao regime de transição alimentar. O regime de transição alimentar mostrou índices de sobrevivência superiores ao cuidado parental apresentando, porém, crescimento e peso inferiores. Foi testado o uso anestésicos (Mentol e clorofórmio); O mentol foi utilizado com sucesso em juvenis e adultos. O clorofórmio apresentou efeito anestésico imediato após a inalação, levando o espécime diretamente ao estágio de anestesia cirúrgica. No quarto capítulo foram realizados estudos de crescimento e peso de alevinos e juvenis até o tamanho comercial, utilizando inicialmente exemplares com peso médio de 1g, finalizando, após 18 meses de cultivo, com peso médio de 10kg.

Palavras chave: *Arapaima gigas*, identificação sexual, marcadores moleculares, manejo reprodutivo.

ABSTRACT

The present study deals with aspects of sexing, breeding, nursery and growth of *pirarucu*, *Arapaima gigas*, presented in four chapters. The first chapter revealed historical aspects of introduction and reintroduction of *pirarucu*. Now, the reintroduction of *pirarucu* in the past decade had another purpose, which was the development of studies in research management, growth and reproduction. In the second chapter we have developed different technologies for *pirarucu* sex identification: ultrasound, which generated different images for male and female gonads; laparoscopy that generated clear images of the gonads, and can distinguish gonadal stages. Was a tested variation in levels of estradiol and testosterone hormones in fingerling and juvenile, not being able to use this methodology to determine the sex because there is no correlation between the concentration of hormones and the length of *pirarucus*. RAPD reactions were used to determine polymorphisms with sex of *Arapaima gigas*, indicating the need for further studys. In third chapter we studied some of the many aspects that helped the reproduction management: The rainfall showed a positive correlation with the frequency of spawn *pirarucu* in Ceara state, Brazil; This chapter also describes the utilization of electronic transponders; No mortality was recorded during two years study, the introduction of electronic transponders also revealed a new dynamic of courtship behavior, with resultant formation of new *pirarucu* couples. Another aspect described in the third chapter was the *pirarucu* food training, step of importance in *pirarucu* fish farming. There were two systems of training food – The first one use gradual transition from live food to commercial food and seconds left fingerling in parental care. The system of weaning showed lower survival rates, however, righter growth and weight. The gradual transition showed higher survival and lower growth and weight. Anesthetics were tested (chloroform and menthol); Menthol has been used successfully in adults and juveniles with administration by spray gills. The chloroform was effective anesthetics immediately after inhalation, running directly to the stage of surgical anesthesia. The fourth chapter studies were performed growth and weight of *pirarucu* fry and juveniles to commercial size, initially using samples with an average weight of 1g, ending after 19 months of cultivation, with an average weight of 10,000 g.

Key works: *Arapaima gigas*, sexual identification, molecular marks, reproductive management.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Semelhança entre coloração e forma das escamas do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , com as sementes do urucu, <i>Bixa orellana</i>	03
Figura 2 -	Vista aérea de parte da área de ocorrência do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , onde lagos e rios intercomunicam-se. Estado do Amazonas.....	04
Figura 3 -	Visita de autoridades a Estação de Piscicultura Lima Campos-CE, onde ocorreu a primeira desova de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	08
Figura 4 -	Exemplar de alevino de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em biometria nas instalações do Serviço de Piscicultura do IFOCS, em Fortaleza/CE.....	08
Figura 5 -	Instalações preservadas de parte dos tanques utilizados, nos anos 40 do século passado, para a reprodução de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , na antiga Estação de Piscicultura de Lima Campos, em Icó/CE.....	09
Figura 6 -	Caminhão utilizado pelo IFOCS/Comissão de Piscicultura nos peixamentos de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	10
Figura 7 -	Primeira desova de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em cativeiro no Estado do Ceará na Estação de Piscicultura de Lima Campos em Icó, no ano de 1944, com um total de 5.341 ovos.....	11
Figura 8 -	Alevino de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em biometria inicial na estação móvel, após a chegada ao <i>Campus II</i> do CPA/DNOCS. (b) detalhe do procedimento de biometria.....	15
Figura 9 -	Caminhão pertencente ao CPA/DNOCS destinado ao transporte de alevinos e reprodutores de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	16
Figura 10 -	Procedimento para captura de reprodutor de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em tanque com volume de água intencionalmente reduzido. Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo, em Icó/CE.....	17
Figura 11 -	Reprodutor de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , sendo conduzido à caixa de transporte de peixes na Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo, em Icó/CE.....	17
Figura 12 -	Estados e municípios do Ceará que adquiriram alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , produzidos no <i>Campus II</i> do CPA/DNOCS.....	19
Figura 13 -	A esquerda e de baixo para cima: (a) Citoscópio, utilizado para fornecimento de luz e filmagem; (b) <i>Trocater</i> , utilizado para introdução da ótica; (c) Agulha de <i>Veress</i> , utilizada para inflar ar na cavidade abdominal. A direita: (a) monitor para visualização de imagem; (b) fonte e unidade de processamento de imagem.	28
Figura 14 -	Procedimentos para laparoscopia de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	30
Figura 15 -	Extração de escamas de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , para exame com ultrassom: (a) extração em exemplar anestesiado. (b) transdutor realizando leitura.....	32
Figura 16 -	Unidade portátil de ultrassom (ALOKA modelo SSD-500) e a sonda de 7.5MHz (acima da unidade portátil).	33
Figura 17 -	Coleta de sangue em pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	35
Figura 18 -	Suposição do padrão de coloração de escamas.	36
Figura 19 -	Isolamento de DNA genômico.....	39
Figura 20 -	Sequenciamento de DNA do pirarucu, <i>Arapaima giga</i>	43
Figura 21 -	Detalhe do exame laparoscópio das gonadas de pirarucu.....	45
Figura 22 -	(a) imagem de gônada masculina. A região entre a marca “x”, assinalada com setas amarelas, indica a espessura da gônada(0,8cm). (b) imagem de gônada feminina, com largura indicada pelas setas (3,2 cm).....	46

Figura 23 -	Exemplar de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , evidenciando, em dois momentos (2007 e 2009), diferenças nos padrões de coloração de escamas. A figura encontra-se segmentada para facilitar a observação.....	49
Figura 24 -	Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose a 0,8%.....	50
Figura 25 -	Padrão de RAPD em exemplares machos e fêmeas de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	51
Figura 26 -	Eletroforese da reação de amplificação do gene 18S.....	51
Figura 27 -	Árvore de similaridade genética do gene 18S do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	53
Figura 28 -	Vista aérea do <i>Campus II</i> - CPA/DNOCS.....	62
Figura 29 -	Número de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , nascidos no CPA/DNOCS durante os anos de 2006 a 2010.....	67
Figura 30 -	Índices de precipitação pluvial no município de Pentecoste/CE, no período 06-10.....	67
Figura 31 -	Rede de coleta de zooplâncton armada em canal de irrigação que percorre parte da área do CPA/DNOCS.....	71
Figura 32 -	Copépodo visualizado em lupa ótica no LabGeM do CPA/DNOCS com ampliação de 100x.	72
Figura 33 -	Alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , capturados em viveiro de reprodução do <i>Campus II</i> do CPA/DNOCS transportados em sacos plásticos para o treinamento alimentar.....	73
Figura 34 -	(a) Adaptação térmica de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em banho de imersão na incubadora. (b) contagem de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em incubadora com sistema de auto sintonamento.....	73
Figura 35 -	Exemplares de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , pertencentes a uma mesma desova.....	76
Figura 36 -	<i>Transponder</i> eletrônico para identificação de exemplares de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> e unidade de leitura em operação nos estudos desenvolvidos no CPA/DNOCS.	80
Figura 37 -	Exemplar de pré-reprodutor de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em maca de transporte.....	82
Figura 38 -	Alicate adaptado com luva de borracha estéril para extração de escama de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , indicando posição de extração. Detalhe da escama extraída onde se encontra inserida, em posição subcutânea, a marca eletrônica.....	83
Figura 39 -	Maca com reprodutor de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , durante pesagem em balança digital.....	84
Figura 40 -	Máscara anestésica utilizada em alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , onde se pode observar: o corpo da máscara, o envoltório isolador, o compartimento para anestésico e a ventilação forçada de ar.	93
Figura 41 -	Juvenil de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em balança eletrônica, antes do procedimento de anestesia.	95
Figura 42 -	Anestesia de juvenil de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , através de aspersão direta nas gueltras com solução de mentol.	95
Figura 43 -	Região do palato de exemplar de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , na qual se visualiza a musculatura e seta azul indicando o orifício de inalação (respiráculo).....	97
Figura 44 -	Biometria inicial de alevino de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> (Etapa I).....	104
Figura 45 -	(a) gaiolas utilizadas na etapa II dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em tanques de concreto no CPA/DNOCS. (b) exemplar de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , durante biometria.	105
Figura 46 -	Biometria de exemplar de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> : (a) preparação da calha; (b) manobra para medição. (c) exemplar em medição na calha.....	106
Figura 47 -	Ração comercial utilizada para alimentação de juvenis e reprodutores de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	108
Figura 48 -	Moagem em moinho elétrico.....	109
Figura 49 -	(a) recipiente metálico com água para auxiliar na homogeneização da pasta de peixe; (b) ração.....	110

Figura 50 -	Preparação de alimento semiúmido para reprodutores de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , no CPA/DNOCS.....	110
Figura 51 -	Curva de crescimento em peso para alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , etapa I.....	113
Figura 52 -	Curva de crescimento em peso para alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , etapa II.....	114
Figura 53 -	Curva de crescimento em peso para alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , etapa III.....	115
Figura 54 -	Correlação peso comprimento de exemplares de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , cultivados no Ceará.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Introdução de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em açudes públicos do Nordeste do Brasil.....	10
Tabela 2 -	Comparativo da introdução e reintrodução de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , realizadas, respectivamente, pelo IFOCS e DNOCS, no Nordeste do Brasil.....	20
Tabela 3 -	Códigos e sequências dos marcadores moleculares do tipo RAPD usados nos experimentos de identificação de polimorfismo sexual em exemplares de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	40
Tabela 4 -	Concentração, volume final e reagentes utilizados nas reações de RAPD (*) de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	41
Tabela 5 -	Descrição do programa térmico(*) utilizado nas reações de RAPD para o pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	41
Tabela 6 -	Descrição do programa térmico utilizado na reação de sequenciamento do gene 18S do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	42
Tabela 7 -	Método imunoensaio enzimático de esteroides sexuais(*) para a determinação de estradiol e testosterona em amostras de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i>	48
Tabela 8	Viveiros com ocorrências de desovas de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , no Campus II do CPA/DNOCS durante o período de 2006-2011.....	66
Tabela 9 -	Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , em regime de transição gradual de zooplâncton para ração comercial seca, no Campus II do CPA/DNOCS.....	74
Tabela 10 -	Capturas médias de zooplâncton em rede de arrasto no canal do CPA/DNOCS...	75
Tabela 11 -	Peso e comprimento médio final de exemplares de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , submetidos a tratamentos alimentares em incubadoras e viveiros do CPA/DNOCS.....	76
Tabela 12 -	Médias de parâmetros de qualidade de água para os três tratamentos em treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , com zooplâncton cultivado e coletado no Campus II do CPA/DNOCS.....	77
Tabela 13 -	Tratamento alimentar, sobrevivência e percentual de consumidores de ração de alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , no Campus II do CPA/DNOCS.....	77
Tabela 14 -	Dinâmica migratória dos reprodutores de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , nos viveiros do CPA/DNOCS após enchente.....	87
Tabela 15 -	Estágios de anestesia em peixes.....	92
Tabela 16 -	Tempo de indução anestésica (em minutos) para alevinos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , (1±0,2g e 4±0,5cm) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.....	97
Tabela 17 -	Tempo de indução anestésica (em minutos) para juvenis de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , (4±0,5kg e 80±3cm) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.....	98
Tabela 18 -	Tempo de indução anestésica (em minutos) para adultos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , (60kg±3 e 170±5cm) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.....	99
Tabela 19 -	Tempo de indução anestésica (em minutos) para adultos de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , (60kg±3 e 170±5cm) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.....	99
Tabela 20 -	Dados de qualidade de água para os três ambientes de crescimento do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , no CPA/DNOCS.....	111
Tabela 21 -	Índices zootécnicos da primeira etapa dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , realizados no CPA/DNOCS.....	112

Tabela 22 -	Índices zootécnicos da segunda etapa dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , realizados no CPA/DNOCS	113
Tabela 23 -	Índices zootécnicos da terceira etapa dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , realizados no CPA/DNOCS.....	114
Tabela 24 -	Índices zootécnicos dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , realizados no CPA/DNOCS.....	115
Tabela 25 -	Características zootécnicas de reprodutores de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> , submetidos a três tratamentos alimentares, no CPA/DNOCS.....	117

LISTA DE SIGLAS

CPA	Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolfo von Ihering do DNOCS
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFOCS	Inspetoria Federal de Obras Contra as Secas
LabGeM	Laboratório de Genética Molecular do CPA/DNOCS
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral da Universidade Vale do Acaraú
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UVA	Universidade Vale do Acaraú

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 - HISTÓRICO E SITUAÇÃO ATUAL DO PIRARUCU, <i>Arapaima gigas</i>, NO NORDESTE DO BRASIL.....	03
1.1	Introdução geral: O pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> (Schinz,1822).....	03
1.2	Material e Métodos.....	06
1.3	Resultados.....	07
1.4	Conclusões.....	21
2	CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA SEXAGEM DO PIRARUCU, <i>Arapaima gigas</i>.....	22
2.1	Introdução.....	22
2.2	Objetivos.....	26
2.3	Material e Métodos.....	26
2.3.1	Laparoscopia.....	26
2.3.2	Ultrassom.....	31
2.3.3	Hormônios.....	34
2.3.4	Marcadores moleculares.....	36
2.4	Resultados.....	44
2.5	Discussão.....	54
2.6	Conclusões.....	60
3	CAPÍTULO 3 - ASPECTOS DA REPRODUÇÃO E ALEVINAGEM DO PIRARUCU, <i>Arapaima gigas</i>, CULTIVADO..	62
3.1	Observações do comportamento reprodutivo do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> .	63
3.2	Alevinagem.....	69
3.3	Uso de anestésicos em pirarucu.....	91
4	CAPÍTULO 4 - CURVA DE CRESCIMENTO E RESPOSTAS ALIMENTARES DO PIRARUCU, <i>Arapaima gigas</i>, EM CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	102
4.1	Introdução.....	102
4.2	Material e Métodos.....	102
4.3	Resultados.....	111
4.4	Conclusões.....	120
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
6	ANEXOS.....	122
7	REFERENCIAS.....	128

1 INTRODUÇÃO

Esta Tese de Doutorado apresenta um estudo sobre a sexagem, reprodução, alevinagem e crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), peixe oriundo da Bacia Amazônica com destacada presença histórica na pesca e crescente importância na aquicultura, em cultivos realizados em instalações de piscicultura no Nordeste do Brasil.

O estudo foi motivado pela escassez de informações sobre o cultivo de pirarucu no Nordeste e pela necessidade de desenvolver o “Projeto Pirarucu” no Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolpho von Ihering (CPA) do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), a partir de uma demanda da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República (SEAP/PR), atual Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA).

A Tese está apresentada em quatro capítulos. O primeiro capítulo relata a introdução do pirarucu, *Arapaima gigas*, nas décadas de 30 e 40 do século passado, em reservatórios públicos do Nordeste do Brasil, com exemplares importados da bacia Amazônica. São abordadas as principais implicações, sob os pontos de vista técnico, econômico e ecológico, resgatando informações da pesca e das estruturas construídas para a reprodução deste peixe. Este capítulo também descreve a reintrodução do pirarucu na região no ano de 2005, que teve como objetivo o desenvolvimento de procedimentos de manejo e reprodução, essenciais a geração de pacotes tecnológicos, que contribuiriam para implementar a cadeia produtiva do cultivo de pirarucu no Nordeste.

O segundo capítulo apresenta descrições e resultados obtidos com a utilização de técnicas invasivas e não-invasivas, desenvolvidas objetivando a precoce identificação sexual do pirarucu¹ tais como: ultrassonografia (interpretação de imagens que permite distinguir as gônadas masculina e feminina); laparoscopia (processo cirúrgico de baixa invasão que permite identificar o sexo, visualizar e gravar imagens dos estágios de maturação dos ovócitos); ferramentas biotecnológicas: exames de níveis de dosagens hormonais no plasma sanguíneo comparados aos níveis de estradiol no sangue de espécimes juvenis e adultos; marcadores moleculares do tipo RAPD e o sequenciamento do gene 18S, que também permite a detecção de polimorfismos.

O terceiro capítulo apresenta o manejo reprodutivo do pirarucu, descrevendo o desenvolvimento de técnicas de cultivo desta espécie sob as condições climáticas e

¹ O pirarucu, *Arapaima gigas*, não apresenta, sobretudo na fase juvenil, caracteres sexuais externos seguros, apesar de possuir nítidas diferenças anatômicas internas.

limnológicas do Nordeste do Brasil. São descritos os diferenciados estilos de instalações para abrigar reprodutores, as observações do comportamento reprodutivo e os processos de elaboração de rações para alevinos, juvenis e reprodutores. Também no capítulo constam os protocolos desenvolvidos para coleta de sangue visando análises biotecnológicas e procedimentos anestésicos para espécimes juvenis e adultos, de grande utilidade para a realização de pequenas intervenções cirúrgicas, a exemplo das apresentadas no segundo capítulo.

No quarto capítulo estão relatados os resultados de pesquisas, realizadas em diferentes estruturas (tanques e viveiros) e condições limnológicas de cultivo no Nordeste do Brasil, sobre o crescimento e o peso do pirarucu em cativeiro, desde o nascimento dos indivíduos até o limite de seu peso comercial (10 kg).²

Finalmente constam: uma abordagem geral dos assuntos apresentados na tese; uma análise das perspectivas tecnológicas da reprodução do pirarucu no Estado do Ceará; considerações e recomendações para a difusão do cultivo deste peixe; e sugestões para a continuidade e o aprofundamento de temas para o desenvolvimento de futuros estudos.

O objetivo geral desta tese de doutorado foi desenvolver protocolos para prover a região Nordeste do Brasil, e em especial o Estado do Ceará, de tecnologia de reprodução do pirarucu, *Arapaima gigas*, a partir de pesquisas realizadas no CPA, instituições parceiras e produtores. Os objetivos específicos desta Tese, foram: descrever os aspectos históricos relativos à introdução do pirarucu no Nordeste brasileiro, nas décadas de 30 e 40 do século XX e sua reintrodução na década passada a partir de 2005; avaliar diferentes técnicas para a identificação sexual do pirarucu, tais como: ultrassonografia, laparoscopia e ferramentas biotecnológicas; reportar aspectos da reprodução e alevinagem em cativeiro; e determinar curvas de crescimento e peso do pirarucu em condições de cultivo.

² Estudos de crescimento e peso são ferramentas de vital importância, sobretudo na análise da viabilidade econômica do cultivo e reprodução, bem como base de dados de inofismável utilização no desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

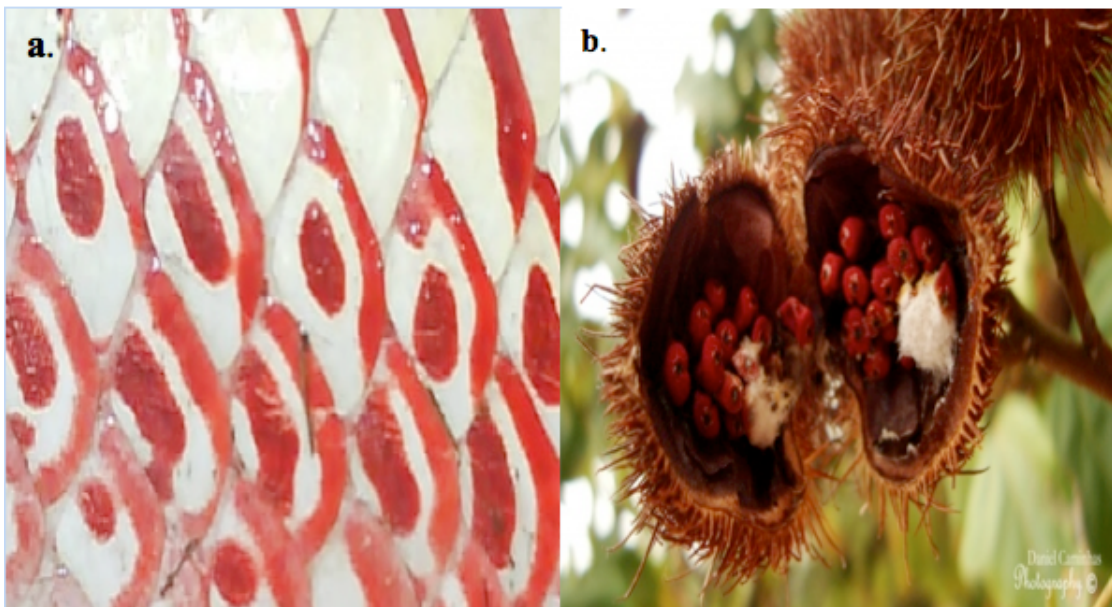
CAPÍTULO 1 - HISTÓRICO E SITUAÇÃO ATUAL DO PIRARUCU, *Arapaima gigas*, NO NORDESTE DO BRASIL

Este capítulo descreve a introdução do pirarucu, *Arapaima gigas*, ocorrida no Nordeste do Brasil, nas décadas de 1930 e 1940 do século passado, e a reintrodução da espécie, a partir de 2005.

1.1 O pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz,1822)

O nome vulgar “*pirarucu*”, designado para este peixe, deriva do fato dele possuir bordas e centro das escamas de determinadas regiões do corpo com forma e coloração vermelha semelhante a da semente do “*urucu*”, *Bixa orellana*.³ (FONTENELE, 1948; CHU-KOO *et al*, 2008).

Figura 1 – Semelhança entre coloração e forma das escamas do pirarucu, *Arapaima gigas*, com as sementes do urucu, *Bixa orellana*.



Fonte: Carlos Riedel (a) e Daniel Caminhas (2011) (b).

O pirarucu é encontrado no Brasil, Guianas, Bolívia e Peru, sendo exclusivo das águas interiores de clima equatorial, com médias anuais de temperatura elevadas. Este peixe

³ A palavra “pirarucu” tem origem no idioma Tupi (“pira” significa peixe e “rucu” refere-se à coloração da semente do “urucu”, *Bixa orellana*, ou seja, peixe com cor de urucu).

habita rios, lagos, e estreitos canais principalmente na área de ocorrência do ecossistema da Bacia Amazônica (figura 2) (FONTENELE, 1948).

Figura 2 – Vista aérea de parte da área de ocorrência do pirarucu, *Arapaima gigas*, onde lagos e rios intercomunicam-se. Estado do Amazonas.



Fonte: Araújo (2005).

A classificação taxonômica do pirarucu é a seguinte:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Sub-filo: Vertebrata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Osteoglossiformes

Sub-ordem: Osteoglossoidei

Família: Arapaimidae

Sub-família: Heterotidinae

Gênero: *Arapaima*

Espécie: *Arapaima gigas*

Os pirarucus pertencentes à ordem dos Osteoglossiformes, são peixes, em sua grande maioria, de água doce, que possuem como principal característica uma língua óssea e nadadeiras dorsal e anal alongadas. (LI e WILSON, 1996). A ordem dos Osteoglossiformes

está dividida em seis famílias, 26 gêneros e cerca de 210 espécies sendo o pirarucu o único representante de seu gênero (GREENWOOD *et al.*, 1966).

O pirarucu pode alcançar até três metros de comprimento e pesar até 200 kg, sendo considerado o maior peixe de escamas de águas interiores do planeta (SAINT-PAUL, 1986; IMBIRIBA *et al.*, 1986; BOCANEGRA, 2006). Esta espécie possui importância histórica, cultural e econômica na região Norte do País. (CASTELLO, 2004; ANDRADE, 2007).

A captura e a comercialização do pirarucu no Norte brasileiro são monitoradas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que para controlar a exploração da espécie e evitar a sobrepesca determinou, para a Bacia Amazônica, o tamanho mínimo de captura em 150 cm, de acordo com a portaria nº. 08/96 (QUEIROZ e SARDINHA, 1999).

O pirarucu é um peixe carnívoro, que quando alevino se alimenta de plâncton, enquanto que nas fases de transição de juvenil à adulta altera sua dieta, passando a se alimentar de pequenos peixes, crustáceos e insetos (QUEIROZ e SARDINHA, 1999). Apesar de possuir este hábito alimentar carnívoro, o que pode levar a uma exigência elevada de proteína, o pirarucu pode se habituar a alimentação com ração comercial, desde que submetido a um treinamento alimentar (CAVERO, 2003).

A carne do pirarucu é apreciada por não possuir espinhas pequenas. A língua óssea e áspera é utilizada para ralar sementes de guaraná e de mandioca. O estômago e a bexiga natatória, após secagem ao sol, são utilizados como cola. O couro, quando curtido, é aproveitado para elaboração de peças artísticas (CASCUDO, 1968).

A rusticidade ao manejo, bem como a respiração aérea obrigatória desse peixe, propicia vantagens em relação ao cultivo de outras espécies. Isto porquê o pirarucu apresenta tolerância a baixos níveis de oxigênio dissolvido e altos níveis de amônia, propiciando cultivos com grandes densidades de estocagens, sem prejuízos para o seu desempenho zootécnico, e sua sobrevivência (IMBIRIBA, 2001).

O cultivo do pirarucu carece de pleno desenvolvimento em virtude da escassez de informações científicas, especialmente sobre sua biologia reprodutiva, principal obstáculo à produção de alevinos em escala comercial (CAVERO, 2003).

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Informações disponíveis para os anos 30 e 40 do Século XX

As informações relativas a introdução do pirarucu no Nordeste do Brasil, nas décadas de 30 e 40 do século XX, resultaram de consultas ao acervo das bibliotecas do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em Fortaleza/CE, e do Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolpho von Ihering (CPA/DNOCS), em Pentecoste/CE.

A principal fonte encontrada na biblioteca do CPA/DNOCS foi um álbum, com 253 fotografias, que registra as primeiras expedições aos açudes nordestinos da Comissão de Piscicultura da Inspeção Federal de Obras Contra as Secas (IFOCS).⁴ Tais expedições foram lideradas pelo naturalista Rodolpho von Ihering, sendo que algumas delas relatam a introdução de exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*, em açudes do Nordeste do Brasil.⁵

1.2.2 Informações disponíveis para a primeira década do Século XXI (Situação atual)

A reintrodução do pirarucu realizada pelo DNOCS a partir do ano de 2005 é descrita a partir de relatos e documentos do DNOCS.

Esse levantamento foi realizado com participação direta na elaboração, orientação e acompanhamento de pesquisas desenvolvidas no CPA/DNOCS. As pesquisas envolveram estudos de crescimento, anestesia, biologia molecular e processamento do pescado.

Na compreensão do processo de reintrodução da espécie foram aplicados questionários e realizadas entrevistas aos principais atores do processo, bem como realizados foto-registros em máquina fotográfica digital (Sony DSC-S85).

São apresentadas as quantidades iniciais de alevinos e reprodutores importados e os meios de transporte utilizados na importação de exemplares de pirarucu; são descritas as tecnologias desenvolvidas auxiliares no processo de reprodução em cativeiro, os aspectos zootécnicos como também os tipos de cultivo e alimentação utilizadas, além de impactos na mídia e abrangência geográfica e científica.

⁴ O IFOCS sucedeu, em 1919, a Inspeção de Obras Contra as Secas – IOCS (criada pelo Decreto 7.619, de 21 de outubro de 1909) e foi sucedido, a partir de 28/12/1945 (Decreto-Lei 8.846), pelo DNOCS.

⁵ As fotografias do álbum foram digitalizadas, em impressora multifuncional Epson TX-105 e armazenadas em meio magnético, e integradas ao acervo da biblioteca do CPA/DNOCS com o título “Arquivo de imagens CPA/DNOCS”.

1.3 Resultados

1.3.1 Introdução do pirarucu no Nordeste do Brasil – anos 30 e 40 do século XX

1.3.1.1 Considerações Iniciais

No final da década de 30 do século passado, a Inspetoria Federal de Obras Contra as Secas (IFOCS) criou programas de povoamento e repovoamento de peixes, que tinham como objetivos reduzir as populações de piranhas (*Serrasalmus piraya*) e pirambebas (*Serrasalmus rhombeus*) nos açudes do Nordeste do Brasil, proporcionar uma fonte de pescado alternativa ao bacalhau (*Gadus morrhua*) importado da Europa, e contribuir para a melhoria da produção pesqueira em açudes públicos e particulares (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982).

Nesta época, para o povoamento de seus reservatórios, o IFOCS selecionou, além de outras duas espécies da Bacia Amazônica (tucunaré, *Cichla temensis* e apaiari, *Astronotus ocellatus*), o pirarucu (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982).

O processo de introdução do pirarucu no Nordeste do Brasil foi iniciado pelo IFOCS a partir de estudos pioneiros sobre a reprodução do pirarucu em cativeiro que estavam sendo desenvolvidos, desde os primeiros anos da década de 30, em Belém/PA, por pesquisadores do Museu Emílio Goeldi (OLIVEIRA, 1944).

O IFOCS enviou, em maio de 1939, para que se integrasse à equipe paraense do Museu, o biólogo Antônio Carlos Estevão de Oliveira, responsável pelo envio ao Ceará, no mesmo mês, vias marítima e aérea, dos primeiros exemplares de pirarucu: 50 reprodutores, 19 destes com comprimento total médio de 1,20m, e cerca de 5.000 alevinos, com comprimento médio de 20 cm (figuras 3 e 4) (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982).

Figura 3 – Visita de autoridades a Estação de Piscicultura Lima Campos-CE, onde ocorreu a primeira desova de pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: CPA/DNOCS.

Figura 4 – Exemplar de alevino de pirarucu, *Arapaima gigas*, em biometria nas instalações do Serviço de Piscicultura do IFOCS, em Fortaleza/CE.



Fonte: CPA/DNOCS.

Ao chegarem ao Ceará, esses exemplares provenientes de Belém foram conduzidos para as instalações do Serviço de Piscicultura do IFOCS, na capital cearense. Posteriormente, em 1942, 19 exemplares foram transferidos para a recém-construída Estação de Lima Campos⁶ no município de Icó/CE.

A Estação de Piscicultura de Lima Campos possuía, naquela época, doze tanques, com 24m de comprimento por 6,3m de largura, paredes revestidas de tijolos e pisos em terreno natural, profundidades entre 80cm até 180cm e se intercomunicavam por meio de aberturas de 1m² (figura 5).

Figura 5 – Instalações preservadas de parte dos tanques utilizados, nos anos 40 do século passado, para a reprodução de pirarucu, *Arapaima gigas*, na antiga Estação de Piscicultura de Lima Campos, em Icó/CE.



Fonte: Carlos Riedel.

A partir das instalações do Serviço de Piscicultura do IFOCS, em Fortaleza, foram distribuídos, em três anos (1940-43), nos açudes públicos do Nordeste do Brasil, 4.654 exemplares de pirarucu, oriundos da importação dos 5.000 exemplares de 20cm de comprimento (figura 6).

⁶ A Estação de Piscicultura de Lima Campos, atualmente chamada Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo encontra-se no perímetro irrigado do Açude Lima Campos, localizado no distrito de Lima Campos, município de Icó/CE.

Nesta distribuição foram contemplados sete reservatórios administrados pelo IFOCS (tabela I). No açude de Riacho do Sangue (CE) foi constatada, em 1944, a primeira reprodução de pirarucu em açudes do Nordeste do Brasil, em condições ambientais muito diferentes daquelas encontradas na Amazônia, de onde o peixe originalmente fora trazido. (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982).

Figura 6 – Caminhão utilizado pelo IFOCS/Comissão de Piscicultura nos peixamentos de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: Carlos Riedel.

Tabela 1 – Introdução de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, em açudes públicos do Nordeste do Brasil.

Açudes	Ano	Nº de Alevinos
Aires de Sousa (CE)	1940	568
Curemas (PB)	1941	900
General Sampaio (CE)	1940	1.050
Itans (RN)	1943	552
Piranhas (PB)	1941	1.153
Riacho do Sangue (CE)	1941	248
São Gonçalo (PB)	1940	183

Nota: Comprimento médio inicial de 300 mm.

Fonte: FONTENELLE e VASCONCELOS, 1982.

Ainda no ano de 1944 foi observada a primeira reprodução em cativeiro de pirarucu no Nordeste do Brasil que ocorreu na Estação de Piscicultura de Lima Campos, em Icó/CE (figura 07) (FONTENELE, 1948). Nos quatros anos seguintes à primeira reprodução (1944-1948), foram registradas vinte desovas, com frequência predominante nos meses de dezembro a maio. Cada desova produziu em média três mil alevinos.

Figura 7 – Primeira desova de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro no Estado do Ceará na Estação de Piscicultura de Lima Campos em Icó, no ano de 1944, com um total de 5.341 ovos.



Fonte: CPA/DNOCS.

Os exemplares de pirarucu originados dos peixamentos realizados pelo IFOCS em açudes do Nordeste brasileiro na década de 40 se reproduziram nas condições climáticas e limnológicas regionais. Entretanto, estes espécimes estavam sujeitos a pesca predatória, o que gerou uma continuada diminuição da população de pirarucu nos açudes.

Objetivando minimizar os efeitos desta pesca predatória, o IFOCS editou a portaria nº114, de 17.12.1946, que fixou o período de defeso do pirarucu entre os meses de novembro a junho estabelecendo o tamanho mínimo de sua captura em 1m (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982). Entretanto, a portaria nº114/1946 não produziu o efeito esperado, pois somente em 1948 é que o IFOCS iniciou a fiscalização da pesca de pirarucu. O fato de que a instalação dos Postos de Fiscalização da Pesca Local se arrastou por anos, sendo concluídos apenas doze anos depois, também contribuiu para a diminuição do número de exemplares das espécies nos açudes (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982).

1.3.1.2 Pesca do pirarucu

A pesca do pirarucu, na década de 40, nas águas de reservatórios públicos nordestinos foi consequência direta de ações do IFOCS. Por ser o peixe de maior porte nessas águas despertou rapidamente a atenção dos pescadores, que desenvolveram diversas técnicas de captura – muitas dessas aproveitando-se da respiração aérea obrigatória (que faz o peixe emergir na superfície em intervalos regulares de tempo), quando pode ser facilmente visualizado e capturado. As técnicas de pesca mais utilizadas resumiam-se a linha de mão, bóia, espinhéis, redes de espera e raramente, pesca com arpão (FONTENELE e VASCONCELOS, 1982).

As artes de pesca, bem como as técnicas utilizadas pelos pescadores na captura do pirarucu, não possuíam rendimento adequado, o que resultou em um esforço-de-pesca mal empregado e predatório, conforme demonstra o seguinte trecho extraído de um relatório de pesca do DNOCS: *“Na realidade, ainda não existe um processo de pesca de pirarucu que ofereça bom rendimento, nos açudes do Nordeste.”* Outro trecho deste relatório de pesca já fazia referência à queda na produção e diminuição do estoque capturável do pirarucu: *“Se persistirem os abusos a que está exposto o pirarucu, nossos vindouros vão sentir a sua carência, a dificuldade de obter tão valioso pescado. Entregam-se os mariscadores a um verdadeiro tripúdio. A obsessão é matar o peixe, pequeno ou grande. Tal seja a seca matam-no até a cacete.”* (MENEZES, 1951).

1.3.1.3 Comercialização do Pirarucu

Na década de 40 do século passado o pirarucu era normalmente comercializado na forma de mantas submetidas ao processamento pelo método da salga. Este procedimento tinha como objetivo aumentar a abrangência da área de comercialização de carne de pirarucu, sobretudo para as regiões brasileiras Norte e Nordeste (MENEZES, 1951).

O processo de salga consistia - geralmente às margens dos açudes - em logo após a captura, eviscerar o espécime para em seguida cortar a região lombar para retirar grandes porções do peixe (as chamadas mantas), que eram salgadas e postas em varais para a secagem ao sol. Por ser um peixe relativamente abundante em açudes de águas interiores, sua carne era pouco valorizada, com preços extremamente baixos (CASCUDO, 1968).

A comercialização de mantas de pirarucu nas regiões brasileiras Norte e Nordeste representava quedas nos lucros dos comerciantes de bacalhau, *Gadus morrhua*, que em resposta a esta “ameaça aos seus ganhos”, patrocinavam a publicação de artigos nos jornais da época mencionando contaminações sofridas em adultos e crianças e até mesmo citando mortes em razão do consumo de pirarucu. Divulgavam ademais que o processo de salga realizado nos açudes, sem condições sanitárias mínimas adequadas, representava altos riscos para a saúde dos consumidores (MENEZES, 1951).

1.3.4 Reintrodução do pirarucu no Nordeste do Brasil – A primeira década do século XXI (Situação Presente)

1.3.4.1 Considerações Iniciais

A reintrodução do pirarucu no Nordeste do Brasil pelo DNOCS foi consequência de inovações tecnológicas ocorridas no setor aquícola na década passada (2001-2010) e ao crescimento exponencial da produção da aquicultura, aliadas a uma conjuntura política favorável nas esferas governamentais federal e estadual.

Diferentemente da introdução ocorrida nas décadas de 30 e de 40 do século XX, quando o principal propósito foi o de utilizar o pirarucu para a erradicação de piranhas, a reintrodução no século XXI visou o desenvolvimento de pesquisas para a produção de alevinos e o cultivo em viveiros e tanques-redes, funcionando desta forma como uma alternativa/complementação de renda para os produtores rurais.

Para executar tal estratégia de ação foi criado o “Projeto Pirarucu”, resultante de convênio celebrado entre a extinta Secretaria Especial da Aquicultura e Pesca da Presidência da República (SEAP/PR) (atual Ministério da Pesca e Aquicultura-MPA) e o Departamento Nacional de Obras Contra as Secas/DNOCS, em outubro de 2004.

Os objetivos específicos do “Projeto Pirarucu” foram: a) desenvolver técnicas eficientes de manejo reprodutivo – com ênfase na produção de alevinos e treinamento alimentar; b) realizar estudos de crescimento e peso em viveiros, tanques e tanques-rede; c) desenvolver técnicas para a identificação sexual; e d) realizar análises econômicas para implantação de estruturas-modelo de cultivo.

As atividades do “Projeto Pirarucu” foram efetivamente iniciadas quando a diretoria do DNOCS adquiriu no ano de 2005, para o Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolph von Ihering (CPA/DNOCS), do Projeto Pacu, empresa privada do Estado do Mato

Grosso do Sul, (MS), 33 juvenis de pirarucu ($1\pm 0,6\text{m}$ e peso $20\pm 3\text{kg}$) e 750 alevinos ($41\pm 8\text{ cm}$ e $400\pm 60\text{g}$).

Comparada com a introdução realizada nas décadas de 30 e 40 do século passado nos açudes nordestinos, a reintrodução de 2005 apresenta 19 juvenis a mais e 4.250 alevinos a menos de pirarucu.

1.3.4.2 Transporte dos reprodutores e alevinos

Para o transporte dos reprodutores e alevinos de pirarucu adquiridos em 2005 foi utilizado um caminhão contendo quatro caixas de fibra com capacidade de 4.000 mil litros cada.

Os reprodutores foram transportados, por uma empresa privada de transporte rodoviário, de Campo Grande/MS para o CPA/DNOCS, em Pentecoste/CE. O tempo total de transporte foi de 96 horas, tendo sido realizadas quatro paradas do caminhão para troca parcial de água e verificação do estado geral dos peixes.

Os 33 reprodutores foram distribuídos em duas caixas de transporte (16 e 17 exemplares em cada uma), enquanto que os 750 alevinos foram igualmente distribuídos: 375 em cada uma das caixas restantes. Cada caixa de transporte possuía um sistema de injeção de oxigênio puro, além disto, eram dotadas de câmara de ar inflada na superfície da água. As câmaras de ar tinham a função de minimizar o efeito do movimento ondulatório da água resultante da inércia da aceleração do caminhão, e com isto, minimizar os riscos de inalação acidental de água no momento da respiração do pirarucu.

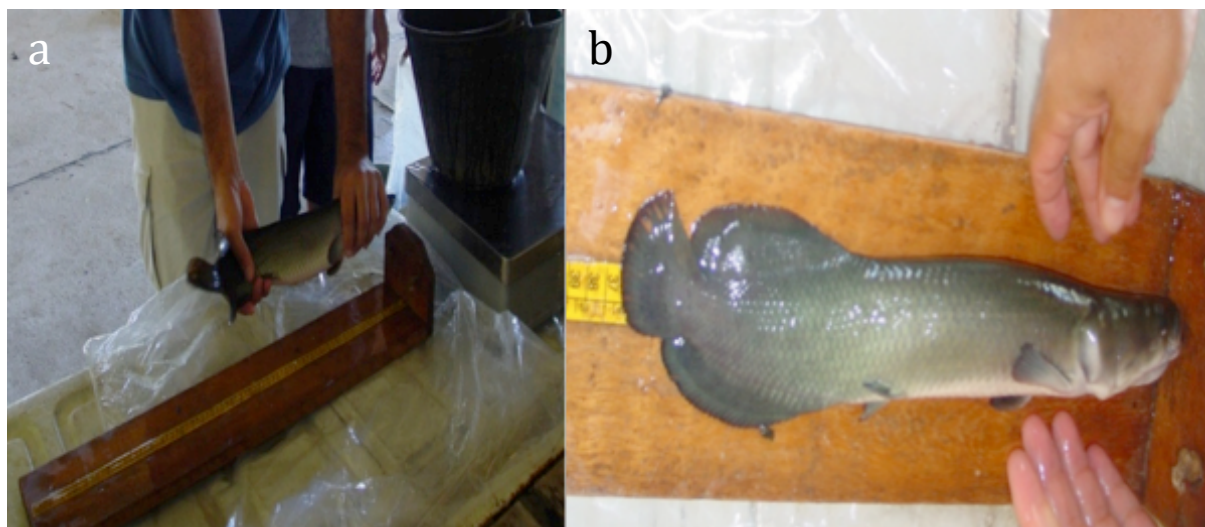
Os 750 alevinos de pirarucu chegaram ao *Campus II* do CPA/DNOCS no dia 11 de maio de 2005, oportunidade em que, após a realização de procedimento biométrico parcial, foram transferidos para dois tanques de concreto de 250 m^2 de área, com renovação parcial de água, compensando apenas perdas por evaporação.

1.3.4.3 Biometria dos Alevinos

No *Campus II* do CPA/DNOCS todos os alevinos foram contados no momento do desembarque e em 15% desses foi realizada biometria (figuras 8a e 8b). Para realização das biometrias foram utilizados um ictiômetro e uma balança eletrônica digital com capacidade máxima de 20 kg. Os exemplares foram cuidadosamente retirados das caixas de transporte com auxílio de um puçá e imediatamente conduzidos à estação de biometria, adaptada na

carroceria de uma caminhonete utilitária e estrategicamente posicionada a fim de facilitar a operação de biometria e o posterior transporte ao viveiro de quarentena. Ao término das biometrias os exemplares foram imediatamente conduzidos para os viveiros, e iniciado o período de quarentena, onde aspectos gerais do comportamento foram observados.

Figura 8 - (a) Alevino de pirarucu, *Arapaima gigas*, em biometria inicial na estação móvel, após a chegada ao *Campus II* do CPA/DNOCS. (b) detalhe do procedimento de biometria.



Fonte: Carlos Riedel.

1.3.4.4 Quarentena de alevinos

Foi realizada uma quarentena para os alevinos e reprodutores recém-importados visando avaliar a adaptação dos espécimes às condições climáticas e limnológicas. A quarentena ocorreu, em um período de trinta dias, para todos os 750 alevinos que foram estocados em tanques de 350m², na densidade de 3 peixes/m², e alimentados com ração comercial para carnívoros (Nutron, 45% de proteína bruta).

Os tanques da área da quarentena possuíam renovação constante de água ajustada para compensar as perdas por evaporação. Durante o período de quarentena foi ofertada ração para peixes carnívoros, quatro vezes ao dia, e observados dados de qualidade de água (utilizando sonda eletrônica limnológica Marca YSI, modelo 6600), bem como aspectos comportamentais do cardume (natação e alimentação).

1.3.4.5 Permutas de reprodutores

Como medida para auxiliar na formação do plantel de pirarucus do *Campus II* do CPA/DNOCS foram utilizados espécimes remanescentes de outras estações de piscicultura do

DNOCS, em especial da Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo, de Lima Campos/Icó/CE, além dos importados do Projeto Pacu. Para tanto foi necessária a captura, transporte e readaptação dos espécimes nos novos tanques. Este foi, possivelmente, o primeiro transporte de reprodutores vivos em idade de maturação sexual do Estado do Ceará.

Inicialmente foi bombeada água dos tanques para o caminhão de transporte (figura 09). Em cada caixa de transporte, que comportava 4.000 litros (com volume útil de 3.500 litros), foi adicionada uma câmara de ar inflada.

Figura 9 – Caminhão pertencente ao CPA/DNOCS destinado ao transporte de alevinos e reprodutores de pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: Carlos Riedel.

Para captura dos reprodutores nos tanques em que estavam originalmente, foi drenada água de cada tanque com o objetivo de alcançar uma lâmina de 50cm (figura 10). Com isto, as possibilidades de saltos de um exemplar, por redução da área de natação e consequente capacidade de impulso, eram reduzidas. Um salto de um exemplar de pirarucu poderia dificultar seriamente o processo de captura, além de causar lesões indesejadas, tanto nos animais como nas pessoas envolvidas diretamente na captura dos mesmos.

Figura 10 – Procedimento para captura de reprodutor de pirarucu, *Arapaima gigas*, em tanque com volume de água intencionalmente reduzido. Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo, em Icó/CE.



Fonte: Carlos Riedel.

Os reprodutores foram manualmente conduzidos em maca de lona, especialmente fabricada para este fim, e acomodados no caminhão: um exemplar por caixa de transporte. (figura 11). A maca teve por função básica manter cada exemplar imobilizado na posição horizontal para evitar possíveis traumas.

Figura 11 – Reprodutor de pirarucu, *Arapaima gigas*, sendo conduzido à caixa de transporte de peixes na Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo, em Icó/CE.



Fonte: Carlos Riedel.

Em seguida á acomodação do reprodutor uma câmara de ar foi colocada em cada caixa de transporte. Nos primeiros 15 minutos de confinamento na caixa de transporte, cada reprodutor dava fortes pancadas, chegando, por vezes a balançar o caminhão transportador.

O transporte dos reprodutores, no trecho Icó–Pentecoste, de 535km, durou aproximadamente nove horas, com paradas para verificação do estado geral dos peixes (equilíbrio de natação e presença de lesões). Neste transporte não foi realizada troca de água.

Os reprodutores transportados ao chegarem no *Campus* II do CPA/DNOCS, foram identificados com marcas eletrônicas e em seguida cuidadosamente transportados para um viveiro de 5.000m², onde foram observados aspectos comportamentais.

A primeira desova de pirarucu nas instalações do CPA/DNOCS foi registrada em outubro de 2006 e gerou 240 alevinos. O casal recém-formado responsável pela desova era composto por um exemplar trazido da Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo, de Lima Campos/Icó/CE e outro exemplar proveniente de Campo Grande/MS. Em fevereiro de 2007 esse mesmo casal apresentou uma segunda desova com 3.648 alevinos.

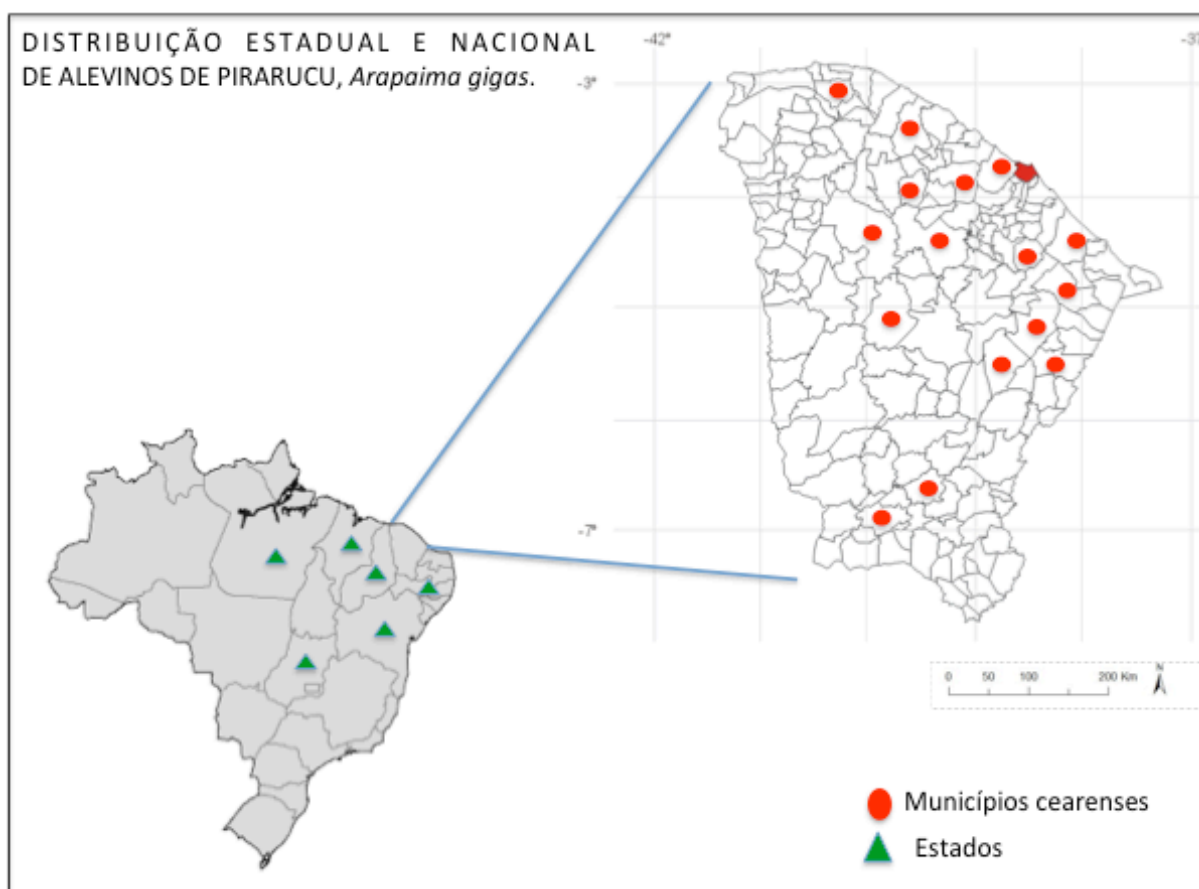
Durante o período de 2007 a 2010 foram produzidos no *Campus* II do CPA/DNOCS aproximadamente 21.000 alevinos de pirarucu provenientes das desovas de oito casais. De outros 30 supostos casais ainda não ocorreram desovas.

Os alevinos de pirarucu produzidos no *Campus* II do CPA/DNOCS despertaram o interesse, tanto de particulares como de instituições de pesquisa e universidades, sobretudo das regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste do País.⁷

Para cada grupo de alevinos comercializados foi preenchido um formulário contendo as seguintes informações: município de destino, quantidade, finalidade (engorda ou reprodução), valor, além do endereço. Os estados e municípios cearenses para os quais foram fornecidos alevinos de pirarucu e encontram-se representados na figura 12.

⁷As seguintes instituições adquiriram alevinos para realização de pesquisas: Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Pará.

Figura 12 – Estados e municípios do Ceará que adquiriram alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, produzidos no *Campus II* do CPA/DNOCS.



Fonte: Carlos Riedel.

A tabela 2 apresenta um comparativo entre a introdução e a reintrodução de pirarucu, *Arapaima gigas*, no Nordeste do Brasil, destacando os principais eventos.

Tabela 2 - Comparativo da introdução e reintrodução de pirarucu, *Arapaima gigas*, realizadas, respectivamente, pelo IFOCS e DNOCS, no Nordeste do Brasil.

Evento	Introdução^(*)	Reintrodução^(**)
Quantidade inicial de reprodutores	19	33
Quantidade inicial de alevinos	5.000	750
Transporte de reprodutores e alevinos	Aéreo e Marítimo	Rodoviário
Instituições que desenvolveram pesquisas	DNOCS	Universidade Federal do Ceará Universidade Estadual do Ceará Universidade Federal da Bahia Universidade Federal Rural de Pernambuco
Tecnologias desenvolvidas	Reprodução em cativeiro	Condicionamento alimentar para rações comerciais. Desenvolvimento de ferramentas para identificação sexual de juvenis (ultrassom, laparoscopia, marcadores bioquímicos), anestesia. Estudos de crescimento em tanques, viveiros e gaiolas.
Comercialização	Mantas salgadas sem condições mínimas de higiene (processo de salga realizado às margens do açudes)	<i>In natura</i> (mantas e cortes especiais, com base em tecnologias de processamento do pescado)
Impacto na mídia	Publicações em jornais e boletins técnicos especializados	Publicações em jornais, Programas de televisão
Impacto científico	Não há registro	Apresentações de monografias, dissertações, teses e participações em congressos
Tipo de alimentação	Peixes vivos	Ração comercial extrusada
Abrangência do projeto	Regional	Regional/nacional
Tipo de cultivo	Extensivo	Semi-intensivo/intensivo
Classificação do consumidor	Classes D e E	Classes A, B e C

Notas: (*) Introdução (Anos 30 e 40 do século XX). (**) Reintrodução (primeira década do século XXI - Situação Presente).

1.4 Conclusões

A introdução do pirarucu no Nordeste do Brasil, nos anos de 1930 e 1940 do século passado, foi marcada pelo propósito do IFOCS de povoamento e repovoamento de peixes nos açudes que administrava com o objetivo principal de reduzir a população de piranhas, (*Serrasalmus piraya*), e pirambebas, (*Serrasalmus rhombeus*), e também de proporcionar uma fonte alternativa ao bacalhau, (*Gadus morrhua*), importado da Europa contribuindo para a melhoria da produção pesqueira em açudes públicos e particulares.

Nesse período, a carência de fiscalização pelos órgãos competentes, e em consequência a persistência da pesca predatória, aliados a concorrência desleal dos comerciantes de bacalhau, foram fatores que contribuíram inicialmente para a crescente redução do consumo e, posteriormente, para a eliminação das populações de pirarucus em açudes do Nordeste do Brasil.

A reintrodução de exemplares de pirarucu na década passada (2001 a 2010) gerou interesse comercial de cultivo da espécie e o desenvolvimento de pesquisas de manejo, crescimento e reprodução voltadas à produção aquícola, não somente pelo CPA/DNOCS, mas por outras instituições públicas e privadas.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA SEXAGEM DO PIRARUCU, *Arapaima gigas*.

Este capítulo descreve o uso das inovações tecnológicas (laparoscopia, ultrasonografia, utilização de hormônios, marcadores moleculares do tipo RAPD e sequenciamento do gene 18S) utilizadas e os resultados obtidos nos estudos desenvolvidos para a determinação precoce do sexo do pirarucu, *Arapaima gigas*.⁸

2.1 INTRODUÇÃO

O pirarucu, conhecido como o “gigante da Bacia Amazônica”, *Arapaima gigas*, de respiração aérea e nativo desta região, é das espécies mais importantes, economicamente e culturalmente, da ictiofauna brasileira (CASTELLO, 2004; ANDRADE, 2007). Esta espécie pode alcançar até três metros de comprimento e pesar até 200 kg, e é capaz de viver mais de 50 anos (SAINT-PAUL, 1986). A palavra “pirarucu” tem origem no idioma tupi-guarani e significa “peixe de cor vermelha”, que é a cor que ambos os sexos adquirem durante a época de reprodução. Machos tem uma intensa coloração vermelha nas escamas abdominais enquanto fêmeas apresentam uma coloração menos intensa (FONTENELE, 1948; CHU-KOO *et al.*, 2008). Entretanto, estas características não são confiáveis para diferenciação de sexos, e portanto, não são usadas para este fim.

Cultivos de pirarucus tem sido recentemente iniciados motivados principalmente pelo declínio de populações naturais e elevados valores no mercado. A aquicultura dessa espécie representa importante ferramenta de gerenciamento para minimizar os efeitos de sobre-exploração de populações selvagens. Em seu habitat natural, os pirarucus são predadores de pequenos peixes, moluscos, insetos e crustáceos (IMBIRIBA, 2001; CAVERO, 2003). Em cultivo intensivo, um período de treinamento alimentar é necessário para induzir os peixes a aceitar *pellets* de ração (CAVEIRO, 2003). Em cativeiro, a reprodução geralmente ocorre em grandes viveiros onde os reprodutores se agrupam no início das temporadas de chuvas (Janeiro a maio no Nordeste do Brasil) (FONTENELE, 1948; ALCANTARA, 1991).

O dimorfismo sexual em pirarucu é um complexo mecanismo regido por fatores genéticos, ambientais e fisiológicos (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). Na maioria das espécies utilizadas na aquicultura, o fenótipo do sexo é facilmente identificado em machos ou fêmeas

⁸ O pirarucu, *Arapaima gigas*, não apresenta, sobretudo na fase juvenil, caracteres sexuais externos seguros para realizar sexagem, apesar de possuir nítidas diferenças anatômicas internas.

pela simples observação de características externas, especialmente da papila genital durante maturação sexual. Métodos geralmente usados para identificação sexual de espécies de peixes incluem biopsia intra-ovariana, ultrassonografia, e endoscopia (ORTENBURGER *et al.*, 1996; KYNARD, 2002; WILDHABER *et al.*, 2005; BRYAN *et al.*, 2007; HURVITZ *et al.*, 2007).

Para algumas espécies de peixes, marcadores de DNA estão disponíveis para identificação sexual a nível genético e nestes casos a diferenciação é baseada na distinção de padrões de bandas espécie-específicas. A sexagem em juvenis de pirarucu é difícil pois, além da espécie não apresentar dimorfismo sexual externo, não existem relatos na literatura de um método seguro para determinação sexual de juvenis desta espécie. Alguns trabalhos descrevem diferenças merísticas em escamas de pirarucus maduros sexualmente em época de acasalamento, fato que ocorre aproximadamente aos cinco anos de idade e com peso médio acima de 40 kg – em animais não considerados mais juvenis (FONTENELE, 1948; IMBIRIBA, 2001; SAAVEDRA-ROJAS *et al.*, 2005; CHU-KOO *et al.*, 2008).

Os pirarucus não apresentam dimorfismo sexual externo. Até o limite do conhecimento atual, não existe um método seguro para determinação sexual desta espécie, com exceção de trabalhos que descreveram diferenças merísticas em escamas de pirarucus maduros sexualmente em época de acasalamento, em animais com aproximadamente cinco anos de idade (IMBIRIBA, 2001; SAAVEDRA-ROJAS *et al.*, 2005; CHU-KOO *et al.*, 2008).

A ausência de características externas para determinação sexual tem encorajado o desenvolvimento de técnicas práticas não invasivas de exame interno de gônadas baseadas na laparoscopia, ultrassom, estradiol e marcadores moleculares, aplicadas para identificação sexual do pirarucu.

2.1.1 Laparoscopia

A laparoscopia é uma ferramenta com potencialidade de avaliar características como maturidade, proporção sexual, idade e tamanho da primeira maturação sexual de peixes, não sendo necessário sacrificar os espécimes para a visualização das gônadas (SWENSON, 2007). Esta técnica tem sido usada, nas áreas médicas e veterinárias, para examinar órgãos internos mediante a inserção, através de pequena incisão no poro urogenital, de um instrumento óptico (WILDHABER *et al.*, 2005; ORTENBURGER *et al.*, 1996).

2.1.2 Ultrassonografia

A ultrassonografia utiliza o eco produzido pelo som, especificamente sons de frequências elevadas conhecidos como ultrassons. Os ultrassons são propagados através de um transdutor que emite um pulso sônico capaz de refletir em diferentes camadas de tecidos, uma vez que esses tecidos apresentam diferentes densidades.

As reflexões produzidas pelos tecidos são captadas novamente pelo mesmo transdutor, apresentando padrão único. Desta forma são geradas, por processamento gráfico, imagens dinâmicas, que podem ser visualizadas e interpretadas em monitores. Dentre os métodos de diagnósticos por imagens, a ultrassonografia destaca-se por sua versatilidade e baixo custo operacional.

O método da ultrassonografia foi desenvolvido na década de 80, inicialmente com aplicação em humanos na avaliação de caracteres morfométricos de diversos órgãos, permitindo o diagnóstico precoce de diversas doenças, bem como alterações anatômicas. A ultrassonografia é utilizada em atividades médicas para visualizar órgãos internos sem a necessidade de inserção de instrumentos na cavidade corporal (WILDHABER *et al.*, 2005).

Esta técnica também é utilizada na identificação sexual de peixes bem como na avaliação do estágio de maturação de ovócitos (REIMERS *et al.*, 1987; ORTENBURGER *et al.*, 1996). Estudos recentes comprovaram a eficiência da ultrassonografia no diagnóstico de maturação sexual para machos e fêmeas de diversas espécies de peixes (KUCHERKA e KHAN, 2007).

As imagens obtidas por intermédio de ultrassom, além da identificação sexual, permitem visualizar para algumas espécies, o estágio de desenvolvimento dos ovócitos, podendo-se até prever com relativa segurança o período de desova, como geralmente ocorre no cultivo de esturjões (*Acipensersturio*) na Rússia (HURVITZ, 2007).

2.1.3 hormônios: estradiol e testosterona

A manifestação dos caracteres sexuais secundários nos peixes está ligada a interações fisiológicas regidas por hormônios. A vitelogenina, proteína precursora da formação de ovócitos em fêmeas de peixes, é sintetizada no fígado graças ao hormônio 17 β -estradiol. Assim, a presença do hormônio 17 β -estradiol na corrente sanguínea pode funcionar como um

padrão indicativo de sexo, com conseqüentemente intensificação dos caracteres sexuais secundários⁹ (CHU-KOO *et al.*, 2008).

A observação de caracteres merísticos, sobretudo em pirarucu, só pode ser feita com relativa segurança na fase de acasalamento, onde a intensidade da coloração das escamas aumenta conforme a aproximação do período de desova. (FONTENELE, 1948).

2.1.4 Uso de marcadores moleculares

Marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo da expressão de um gene ou de algum segmento de DNA, que podem ser regiões expressas ou não do genoma, e muitas vezes de sequência de nucleotídeos e função desconhecida (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Um marcador molecular mostra a expressão fenotípica proveniente de um gene expresso ou segmento deste. Tais sequências de genes podem ou não ser conhecidas, embora sejam geralmente desconhecidas. Tanksley & Hewitt (1988) definem marcador molecular como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma.

Durante a década de 80 a reação da polimerase em cadeia, conhecida por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), foi desenvolvida e permitiu produzir milhões de cópias de DNA a partir de poucas moléculas (MULLIS e FALOONA, 1987).

Atualmente, existem diversos métodos de marcadores moleculares para documentar a informação genética, porém a simplicidade, rapidez e a possibilidade de obter-se um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, bem como a grande acessibilidade e baixo custo da técnica do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) representam vantagens que a levam à utilização preferencial para determinar padrões polimórficos entre machos e fêmeas de pirarucu. A técnica do RAPD é um tipo de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), reação em cadeia da polimerase, que utiliza *primers* (iniciadores moleculares) com 10 pares de bases para localizar e amplificar segmentos aleatórios no DNA genômico, podendo ser visualizados em gel de agarose quando corado com brometo de etídeo (GONÇALVES, *et al.*, 2005; VAZ *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares do genoma nuclear têm sido considerados ferramentas importantes e de alto potencial em estudos relacionados com estruturas de populações de peixes

⁹ Geralmente há aumento na circunferência pélvica e maior irrigação na papila genital.

bem como na sexagem, haja vista a alta possibilidade de detecção de polimorfismos (MARTINS, 2002). Assim, utilizou-se duas técnicas de marcadores moleculares (RAPD e sequenciamento do gene 18S) para identificar polimorfismos entre espécimes e determinação de sexo em exemplares pertencentes ao plantel do CPA/DNOCS.

2.2 OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivo geral desenvolver técnicas de identificação sexual do pirarucu. Os objetivos específicos foram: utilizar a laparoscopia, ultrassom, níveis hormonais e marcadores moleculares como ferramentas para a identificação do sexo de exemplares juvenis e adultos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação sexual do pirarucu foram desenvolvidos e testadas quatro metodologias: Utilização de da laparoscopia, ultrassom, níveis de hormônios e marcadores moleculares.

2.3.1 Laparoscopia

A técnica da laparoscopia foi empregada com o objetivo de gerar imagens nítidas das gônadas de exemplares de pirarucu, permitindo assim a identificação sexual.

2.3.1.1 Transporte e aclimação

Juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (400±51g e 40±5cm), adquiridos do Projeto Pacu, empresa particular localizada na cidade de Campo Grande, no Estado do Mato Grosso do Sul, foram trazidos para o CPA/DNOCS, Pentecoste, Ceará (3°48'42"S, 39°16'72"W) em caminhões especialmente adaptados com quatro unidades TRANSFISH® (2.000 litros cada) conectados a uma unidade de aeração.

O tempo de transporte foi de aproximadamente 96 horas, com três trocas totais de água e nenhuma mortalidade registrada. Os peixes foram aclimatados e posteriormente

mantidos em viveiros escavados, alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada (Nutron, 42% de proteína e 12% de gordura) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) triturada.

A temperatura da água se manteve em $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo ano. Após alcançarem três anos de idade, o comprimento (cm) e o peso (g) foram medidos e os indivíduos foram considerados prontos para o procedimento de laparoscopia.

2.3.1.2 Anestesia

O uso de anestésicos em peixes é uma prática comum em laboratórios de pesquisa, especialmente para fins cirúrgicos (ROSS e ROSS, 2008). Anestesia pode reduzir dor bloqueando sinais elétricos de órgãos periféricos para a coluna espinhal e o cérebro (CRAIG, 2003). Anestésicos são geralmente administrados por imersão do peixe em uma solução diluída com anestésico, sendo predominantemente o ponto de entrada via brânquias. Pirarucus são peixes de respiração aérea obrigatória, e o uso de anestésicos por imersão pode causar morte por afogamento. Por esta razão, foi desenvolvida pelo autor da Tese uma técnica de anestesia utilizando clorofórmio com atmosfera modificada (dados não publicados).

Estudos prévios realizados no CPA/DNOCS, Pentecoste/CE, mostraram que a evaporação de 3mL de solução de clorofórmio em espécimes de pirarucu ($30\pm 3\text{kg}$), causaram perda de reflexo e relaxamento muscular. Baseado neste estudo preliminar foram selecionados 10 peixes com 3 anos de idade ($30\pm 3\text{kg}$ e $150\pm 18\text{cm}$) para o procedimento de anestesia. Uma máscara plástica de gás, especialmente adaptada para inalação de clorofórmio, foi amarrada a um compressor para suprimento de ar. Cada peixe foi colocado na mesa para exame e anestesiado utilizando a máscara de gás com clorofórmio. Os tempos de indução e de recuperação foram registrados. Somente uma concentração de clorofórmio foi testada (3mL em uma máscara de 2 litros com suprimento de ar atmosférico).

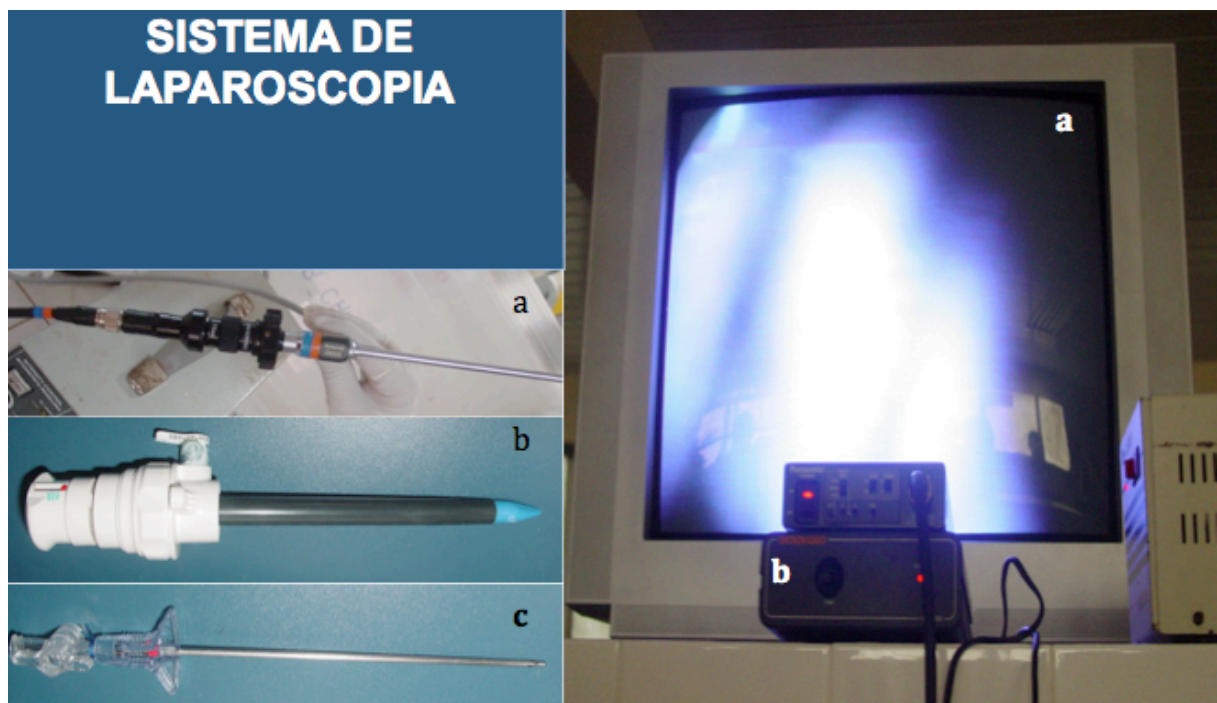
2.3.1.3 Exame Laparoscópico

Um grupo de doze peixes com três anos de idade ($30\pm 3\text{kg}$ e $150\pm 18\text{cm}$) foi aleatoriamente selecionado de viveiros de crescimento (5.000m^2) do CPA/DNOCS e transferidos para o *Campus I*, onde foram mantidos em quatro tanques de concreto (4m^3) com sistema constante de circulação de água (taxa de renovação de 800% por dia). Com base na coloração das escamas um macho e uma fêmea foram sacrificados por imersão em

tanque de hipotermia, contendo cem litros de volume útil de água a zero grau Celsius, e dissecados para orientar os pontos de inserção para laparoscopia e determinar a aparência dos órgãos internos, particularmente as gônadas. Cada um dos 10 espécimes vivos remanescentes foi conduzido em maca e colocado em mesa de azulejo previamente limpa com solução de álcool 70% para a realização do exame, sendo então anestesiados com uma máscara especialmente adaptada para a inalação de clorofórmio.

O sistema de laparoscopia consistia de um citoscópio, com 15 cm de comprimento e 5mm de diâmetro (Karl Storz™), conectado a uma fibra ótica para transmissão de luz, ligados a uma lâmpada fria de halogênio e uma minicâmara integrada. O laparoscópio estava equipado com uma bomba de ar, e um canal interno através do qual a cavidade abdominal pode ser inflada facilitando a observação dos órgãos internos. O sistema permitia a gravação de imagens por saídas de vídeo da unidade de controle de vídeo (figura 13).

Figura 13 – A esquerda e de baixo para cima: (a) Citoscópio, utilizado para fornecimento de luz e filmagem; (b) *Trocater*, utilizado para introdução da ótica; (c) Agulha de *Veress*, utilizada para inflar ar na cavidade abdominal. A direita: (a) monitor para visualização de imagem; (b) fonte e unidade de processamento de imagem.

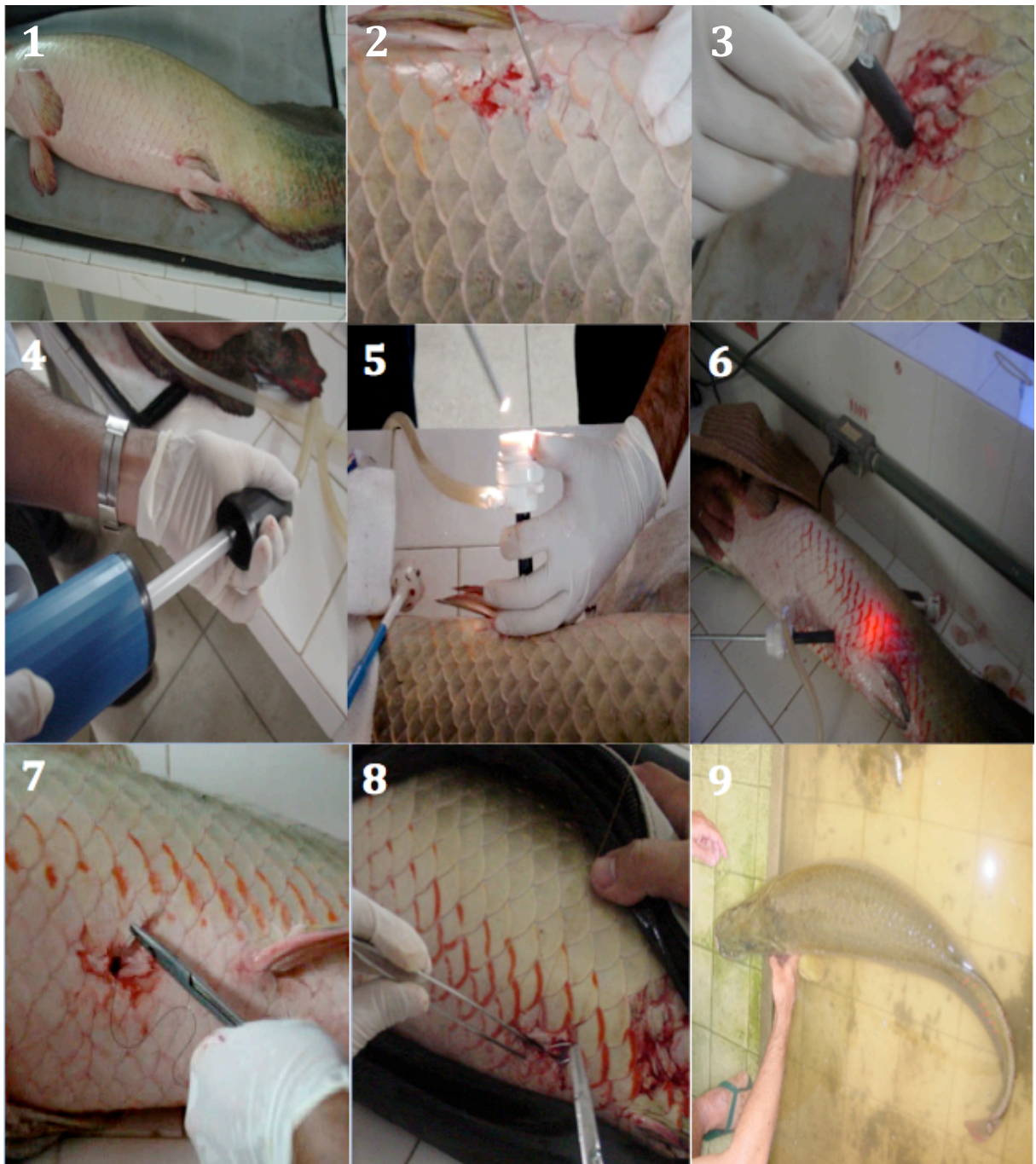


Fonte: Carlos Riedel.

Após inflar a cavidade abdominal do espécime, foi introduzido o “*trocater*”, instrumento que permitiu o controle da pressão de ar na cavidade abdominal, bem como a introdução da ótica. A ótica possuía uma câmera afixada responsável pela geração da imagem que era visualizada em um monitor. As imagens foram diretamente gravadas em aparelho videocassete, sendo posteriormente digitalizadas.

Ao fim do procedimento, as incisões foram suturadas e desinfetadas com cloreto de sódio, recebendo então cada espécime “*transponder*” implantável para identificação, sendo em seguida, os exemplares levados para um tanque-hospital de 4m³, contendo 3% de solução salina, onde ficaram três dias. As principais etapas da laparoscopia em pirarucu estão sumarizadas na figura 14.

Figura 14 – Procedimentos para laparoscopia de pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: Carlos Riedel. (1) exemplar anestesiado de pirarucu, *Arapaima gigas*, na mesa de procedimentos; (2) injeção de ar na cavidade abdominal para possibilitar a introdução do *trocater* (procedimento realizado após a retirada de escamas); (3) o *trocater*, instrumento que permite a entrada da ótica, além de regular a vazão de ar na cavidade abdominal; (4) bomba manual para injeção de ar; (5) *trocater* na cavidade abdominal e introdução da ótica; (6) ótica introduzida na cavidade abdominal; (7) abertura consequente da introdução do *trocater*; (8) sutura; (9) exemplar em recuperação pós-cirúrgica.

2.3.2 ultrassom

Vinte exemplares de pirarucu com comprimento e peso médio total respectivos de $150\pm 18\text{cm}$ e $20\pm 3\text{kg}$ foram aleatoriamente capturados de viveiros do *Campus II* do CPA/DNOCS (área de 5.000m^2); em seguida os exemplares foram transportados individualmente em macas adaptadas com camisas de contenção para o LabGeM/DNOCS do *Campus I*, colocados em quatro tanques de concreto, à razão de cinco peixes por tanque, com sistema de renovação constante de água (800 litros/dia).

Para fins de dissecação dois espécimes foram sacrificados, por choque térmico, em tanque de hipotermia contendo cem litros de volume útil de água a zero grau Celsius. As dissecações revelaram que um exemplar era macho e o outro, uma fêmea. Foi possível visualizar em cada exemplar a localização e morfologia dos órgãos internos, particularmente as gônadas. Desta forma, foi então definido o local do corpo do pirarucu (macho ou fêmea) mais adequado para a varredura com o transdutor do ultrassom.

Os dezoito espécimes restantes foram conduzidos individualmente em maca, postos na mesa de operação um por vez, e previamente anestesiados com inalação de vapor de clorofórmio utilizando máscara especialmente adaptada. Durante o procedimento, um assistente mantinha o peixe anestesiado bombeando na máscara uma mistura de ar e vapor de clorofórmio em intervalos de 30 segundos.

Uma pinça foi utilizada para a remoção de aproximadamente cinco escamas, possibilitando assim uma leitura precisa do transdutor (evitando má formação da imagem em virtude de reflexos causados pela alta densidade dos ossos) (figura 15).

Figura 15 – Extração de escamas de pirarucu, *Arapaima gigas*, para exame com ultrassom: (a) extração em exemplar anestesiado. (b) transdutor realizando leitura.



Fonte: Carlos Riedel. A seta amarela indica a localização da gônada: proximidades da nadadeira pélvica.

A superfície do transdutor foi coberta com gel para ultrassom. Durante a varredura, o foco e a profundidade da propagação do feixe ultrassônico foram mantidos constantes a fim de facilitar a localização e visualização das gônadas. Observações e captura de imagens digitais dos órgãos internos foram foto-registradas em máquina digital e gravadas em vídeo VHS.

O sistema de ultrassonografia utilizado (figura 16) consistia de uma unidade portátil ALOKA modelo SSD-500 com uma sonda de 7.5MHz. Esta sonda foi escolhida por apresentar menor penetração e maior amplitude da área a ser examinada.

Figura 16 - Unidade portátil de ultrassom (ALOKA modelo SSD-500) e a sonda de 7.5MHz (acima da unidade portátil).



Fonte: Carlos Riedel.

Após o procedimento, foi inserido em cada espécime um “*transponder*” implantável para identificação e futuro acompanhamento. Mais dois exemplares (supostamente um macho e uma fêmea) foram sacrificados para confirmação do resultado. Os peixes restantes foram transferidos para um tanque de recuperação, imersos em solução salina a 3% durante 20 minutos.

Após este período os pirarucus foram remanejados para viveiros de 350m², com renovação constante de água, à razão de quatro casais por tanque, e monitorados durante 24 horas com relação aos aspectos referentes à natação e alimentação.

2.3.3 hormônios

2.3.3.1 Coletas de sangue

As coletas de sangue foram realizadas em 24 exemplares de pirarucu pertencentes a duas classes de comprimento: classe I - alevinos com 82cm de comprimento médio, e classe II - juvenis com 178cm de comprimento médio.

O sangue foi coletado utilizando seringas e agulhas estéreis e em seguida transferido para tubos Falcon® (volume de 14mL). Duas regiões anatômicas foram escolhidas para a extração do sangue nos pirarucus: a base do arco branquial e a porção final da nadadeira caudal (figura 17). A coleta do sangue nas brânquias teve como acesso principal a abertura opercular. A operação de extração contou com um auxiliar para imobilizar o opérculo do animal e com isto permitir a obtenção de uma abertura suficiente para permitir a entrada da agulha na base do arco branquial.

Para a coleta de sangue, com acesso através da nadadeira caudal, foi necessário pressionar levemente a porção final desta, prendendo intencionalmente a circulação e facilitando o acesso a veia. Após coletado, o material foi colocado em caixa isotérmica a zero grau Celsius para ser levado a laboratório particular de análises clínicas, em Pentecoste/CE, para o exame de níveis de estradiol e testosterona.

Figura 17 – Coleta de sangue em pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda: (a) brânquias; (b) porção final da nadadeira caudal.

2.3.3.2 Análise de variações no padrão de coloração de escamas de pirarucu

Quarenta exemplares de pirarucu com marcas eletrônicas implantáveis, pertencentes ao plantel do CPA/DNOCS, foram inicialmente medidos e pesados ($40\text{kg}\pm 5$, $170\pm 5\text{cm}$) e foto-registrados com máquina digital Sony modelo DSC-S85.

Os exemplares foram mantidos de janeiro de 2007 a março de 2009, em 20 viveiros individuais de 350m^2 , na proporção de dois a cada viveiro, obedecendo a suposição atual de dimorfismo sexual de diferenças nos padrões colorimétricos de escamas (figura 18)¹⁰. Nos viveiros, era feita renovação de água com mínima vazão somente para suprir as perdas por evaporação e infiltração dos viveiros.

Os exemplares receberam, duas vezes ao dia, ração comercial para carnívoros adicionada de peixe triturado, em forma de um grande “*pellet*” (conhecido no CPA como “bolota”) especialmente adaptado para o pirarucu.

¹⁰ Na suposição atual de observação de coloração de escamas, os machos de pirarucu apresentam padrão colorimétrico de escamas avermelhadas que se distribuem do início da nadadeira caudal até as proximidades do opérculo, já as fêmeas possuem distribuição de coloração de escamas desde a nadadeira caudal até as proximidades da nadadeira peitoral. Ver figura 20.

Figura 18 – Suposição do padrão de coloração de escamas.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda: Posicionamento de escamas vermelhas nas proximidades da nadadeira peitoral, o que caracterizaria um espécime macho de pirarucu, *Arapaima gigas* (seta azul); (b) posicionamento do suposto padrão para fêmeas da espécie (seta amarela).

Após esse período, nova pesagem, biometria ($50\pm 3\text{kg}$, $180\pm 3\text{cm}$) e foto-registro foi realizado. As imagens de oito espécimes foram comparadas por quadrantes e intensidade de cores, nas situações de 2007 e 2009, em programa de edição de imagens *Medidor de coloração digital versão 4.1* (Mac-OS).

2.3.4 Marcadores moleculares

Para a obtenção dos segmentos de DNA genômico do pirarucu foi necessário realizar experimentos preliminares, com vistas a escolher o melhor tecido para extração de DNA genômico de boa qualidade para reações de RAPD e sequenciamento, bem como o meio de conservação mais indicado para o material a ser estudado.

As extrações de DNA genômico, quantificação e reações de RAPD foram realizadas no LabGeM do CPA/DNOCS, em Pentecoste/CE, enquanto que as reações de sequenciamento foram realizadas no Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), em Sobral/CE.

2.3.4.1 Extração de DNA genômico

Para isolamento e purificação de DNA genômico das amostras de tecidos do pirarucu foi utilizado o detergente CTAB (*cethyl trimethyl ammonium bromide*). Geralmente, as extrações realizadas com a utilização deste método fornecem DNA suficientemente puro para reações de ampliações por PCR e sequenciamento.

Cerca de 1,0mL de sangue foi colhido da porção final da nadadeira caudal utilizando seringas descartáveis de 5mL e em seguida transferidos para tubos Falcon® e colocadas para refrigeração (4°C) por três horas.

Dois exemplares foram sacrificados por choque térmico a frio. Foram retiradas amostras do coração, gônadas, músculo e lamela das escamas de exemplares do sexo masculino e feminino. Parte do material foi congelado em *freezer* a -20°C e outra parte preservada em solução de álcool a 70% a 4°C em geladeira, visando determinar o efeito de diferentes meios de preservação dos tecidos nas ampliações de RAPD e sequenciamento.

Foi retirado aproximadamente um grama de cada tecido (coração, músculo, gônada masculina, gônada feminina) e foram realizadas macerações das amostras. A massa homogênea resultante de cada uma foi transferida para incubação em imersão térmica em um tubo Falcon® estéril, contendo 6 mL do tampão de extração CTAB (Tris-HCl 100mM, pH 8,0, CTAB 2 %, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM) acrescido de 12µL de mercaptoetanol.

Após aproximadamente 12 horas de incubação, os tubos foram retirados da imersão térmica, oportunidade em que foi adicionado a cada tubo um volume de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (25:1, v/v), para solubilização dos ácidos nucléicos.

A solução foi centrifugada a 2.500 rpm, durante 15 minutos, gerando um líquido com três fases distintas, na fase superior encontram-se os ácidos nucléicos, a fase superior foi colhida e transferida para um novo tubo Falcon® oportunidade em que foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol absoluto a 4°C para precipitação dos ácidos nucléicos.

O *pellet* formado pela precipitação dos ácidos nucléicos foi coletado, lavado com 1 mL de etanol 70 % (v/v); ressuspensos em 2 mL de TE (TRIS-EDTA) pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) sendo estocado a 4°C, para uso posterior.

Um espectrofotômetro *RNA/DNA* foi utilizado para obter a medida da concentração final de DNA (µg/mL) de cada tecido das amostras em amostras diluídas de 1:10 em solução de TE pH 8,0. A absorção de luz UV pelos anéis aromáticos dos nucleotídeos é frequentemente usada para estimar-se a concentração de DNA, assumindo-se que o valor de absorbância igual a

1,0 (1,0 cm de caminho óptico; 260nm) é obtido a partir de uma solução pura contendo 50µg/mL de DNA

2.3.4.2 Eletroforese de DNA genômico

Todas as corridas de eletroforese realizadas neste experimento foram efetivadas conforme o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Duas concentrações de gel foram preparadas, uma a 0,8%, cuja finalidade era de visualizar DNA genômico, e outra a 1,5%, para visualização dos segmentos de DNA amplificados por RAPD e da reação de sequenciamento.

Os géis foram corados com a adição de brometo de etídeo (EtBr) na proporção de 0,5 µg/mL. As amostras foram submetidas a uma corrente elétrica constante de 80V por 120 minutos. Concluída a corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um transiluminador *MacroVue (Pharmacia Biotech, Sweden)* onde as bandas foram visualizadas em luz UV (302nm).

A seguir, as bandas foram fotografadas com máquina digital SONY modelo DSC-S85 equipada com lente de proteção UV. As etapas de isolamento de DNA genômico descritas encontram-se resumidas na figura 19.

Figura 19 – Isolamento de DNA genômico.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda: (1) Pesagem de exemplar; (2) retirada de tecidos por dissecação; (3) pesagem de amostra de tecido em balança eletrônica digital; (4) maceração do tecido; (5) precipitado de DNA genômico; (6) quantificação de DNA genômico em espectrofotômetro; (7) eletroforese em gel de agarose para confirmação da extração; (8) gel de agarose em transluminador, após corrida de eletroforese; (9) termociclador, onde as amostras de DNA com concentrações viáveis passam a ser utilizadas em reações de PCR.

2.3.4.3 Análises de RAPD

As reações RAPD foram realizadas usando 15 sequências de *primers* da *Operon Technologies, Inc.* (tabela 18). Cada amostra da reação de RAPD foi realizada em um volume total de 25µL contendo: Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100µM cada, 5 ng/µL do primer e cerca de 50ng de DNA genômico adicionado de 0,5U de Taq DNA polimerase (PHARMACIA) (tabela 3).

Tabela 3 - Códigos e sequências dos marcadores moleculares do tipo RAPD usados nos experimentos de identificação de polimorfismo sexual em exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*.

<i>Primers</i>	Sequência (5' para 3')
OPF - 01	GAG GAT CCC T
OPF- 02	CTCGATCACTA
OPF- 03	CCT GAT CAC C
OPF- 04	GGT GAT CAG G
OPF- 05	CCG AAT TCC C
OPF- 06	GGG AAT TCG G
OPF- 07	CCG ATA TCC C
OPF- 08	GGG ATA TCG G
OPF- 10	GGA AGC TTG G
OPF-11	CCCTAGCCATG
OPF- 20	GGT CTA GAG G
OPF- 21	GGGCTATAGCA
OPF- 22	GGCTCATACCC

Fonte: Operon Technologies, Inc.

Convenção: A - Adenina, G - Guanina,
C - Citosina e T - Timina

No caso de concentrações de DNA inferiores a 50ng, reações com água deionizada esterilizada foram realizadas. Para todas as reações de RAPD, amostras isentas de DNA genômico foram utilizadas, visando o controle de possíveis contaminações durante o preparo da reação (tabela 4).

Tabela 4 – Concentração, volume final e reagentes utilizados nas reações de RAPD^(*) de pirarucu, *Arapaima gigas*.

Reagente	Volume	Concentração/Quantidade Final
Primer (5ng/μL)	3,0 μL	15ng
dNTP (2,5mM)	2,5 μL	100μM
Taq DNA polimerase (5U/μL)	0,4 μL	1 U
Tampão da Taq 10x	2,5 μL	1x (1,5mM MgCl ₂)
DNA (10ng/μL)	2,5 μL	25ng
H ₂ O	14,1 μL	-
Total	25,0 μL	-

Nota: ^(*) Volume final utilizada para cada amostra.

Todas as reações de RAPD foram realizadas em um termociclador PTC-100, programado para efetuar 42 ciclos de 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, num período total de aproximadamente 4 horas (tabela 5), oportunidade em que os produtos resultantes da amplificação de PCR foram retirados e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para visualização de possíveis polimorfismos.

Tabela 5 – Descrição do programa térmico^(*) utilizado nas reações de RAPD para o pirarucu, *Arapaima gigas*.

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Inicial	Desnaturação inicial	94	3
	Anelamento	36	1
	Extensão	72	2
2 ^o ao 38 ^o ciclo	Desnaturação	94	1
	Anelamento	36	1
	Extensão	72	2
Final	Desnaturação	94	1
	Anelamento	36	1
	Extensão final	72	10

Nota: ^(*) Foram realizados testes preliminares para ajustes de temperatura e tempo de anelamento dos *primers*.

2.3.4.4. Sequenciamento do gene *18S*

Após extração do DNA genômico no LabGeM/CPA/DNOCS, em Pentecoste/CE, as amostras que apresentaram maior pureza de DNA, estimadas através da razão 260/280nm, foram encaminhadas em caixa isotérmica a 0°C para o Núcleo de Biotecnologia de Sobral da Universidade Vale do Acaraú (NUBIS), em Sobral/CE.

No NUBIS foi realizada a reação de amplificação do gene 18S via PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos inicialmente desenhados para experimentos com DNA de espécies vegetais. Este gene foi escolhido por ser um dos mais utilizados em estudos de filogenia. Além de DNA genômico dos exemplares de pirarucu e iniciadores moleculares específicos (*primers*), a PCR continha Taq DNA polimerase, dntps (oligonucleotídeos) e tampão de reação.

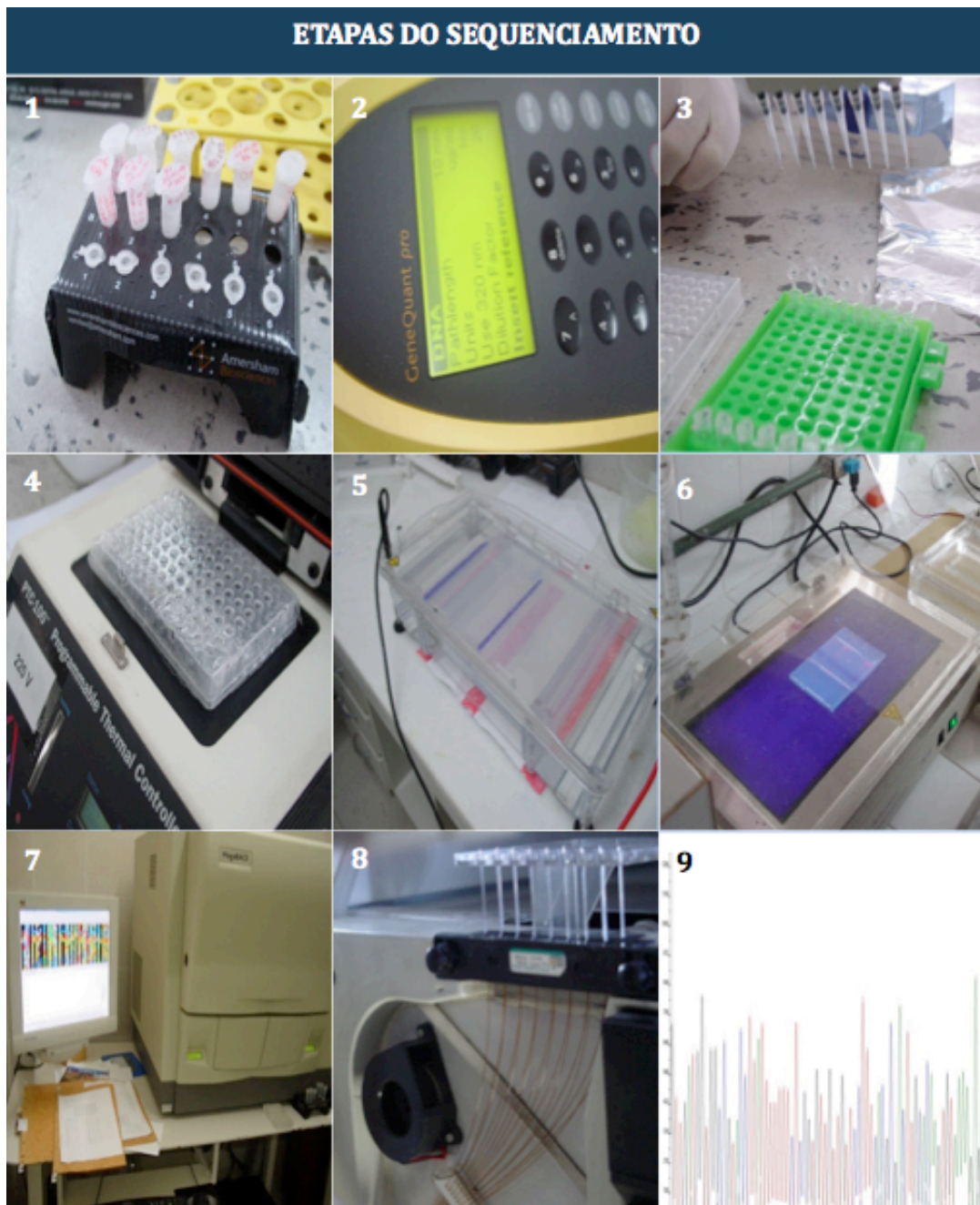
Para as reações de amplificação do gene 18S foi utilizado um termociclador, marca BioRad, sob as condições térmicas apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Descrição do programa térmico utilizado na reação de sequenciamento do gene 18S do pirarucu, *Arapaima gigas*.

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Inicial	Desnaturação inicial	94	5
	Anelamento	56	1
	Extensão	72	0,75
2 ^o ao 38 ^o ciclo	Desnaturação	94	5
	Anelamento	56	1
	Extensão	72	0,75
Final	Desnaturação	94	5
	Anelamento	36	1
	Extensão final	72	7

A ampliação do gene 18S foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A obtenção da estrutura primária do gene (sequenciamento dos nucleotídeos) foi realizada em analisador genético *MegaBace 750*. Na figura 20 são mostradas de forma resumida as etapas do sequenciamento.

Figura 20 – sequenciamento de DNA do pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda: (1) Amostras de DNA genômico diluídas em TE; (2) espectrofotômetro utilizado para quantificação de DNA; (3) preparação de reação de sequenciamento; (4) termociclador utilizado na reação de PCR; (5) eletroforese para confirmação da reação de PCR; (6) visualização dos segmentos amplificados na PCR; (7) analisador genético MegaBace 750, utilizado para analisar a sequência do gene 18S do pirarucu, *Arapaima gigas*; (8) detalhe dos capilares do sequenciador¹¹; (9) Gráfico de picos de nucleotídeos formadores da sequência.

A qualidade das sequências foi mensurada pelo *software* do sequenciador de DNA *MegaBace 750* e a estrutura primária dos nucleotídeos do gene 18S do pirarucu comparada às sequências do Banco Genético de Sequências de DNA (*GenBank*) do *Nacional Center for*

¹¹ Nos capilares as amostras migram em um processo semelhante a eletroforese, em seguida um laser lê os picos de nucleotídeos, gerando uma sequência.

Biotechnology Information (NCBI). Para isso, os nucleotídeos foram depositados no NCBI que dispõe da ferramenta “*BLAST pair wise alignments*”. Assim, a sequência foi comparada com dados de outras sequências de genes semelhantes por laboratórios de todo o mundo.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Procedimento laparoscópico

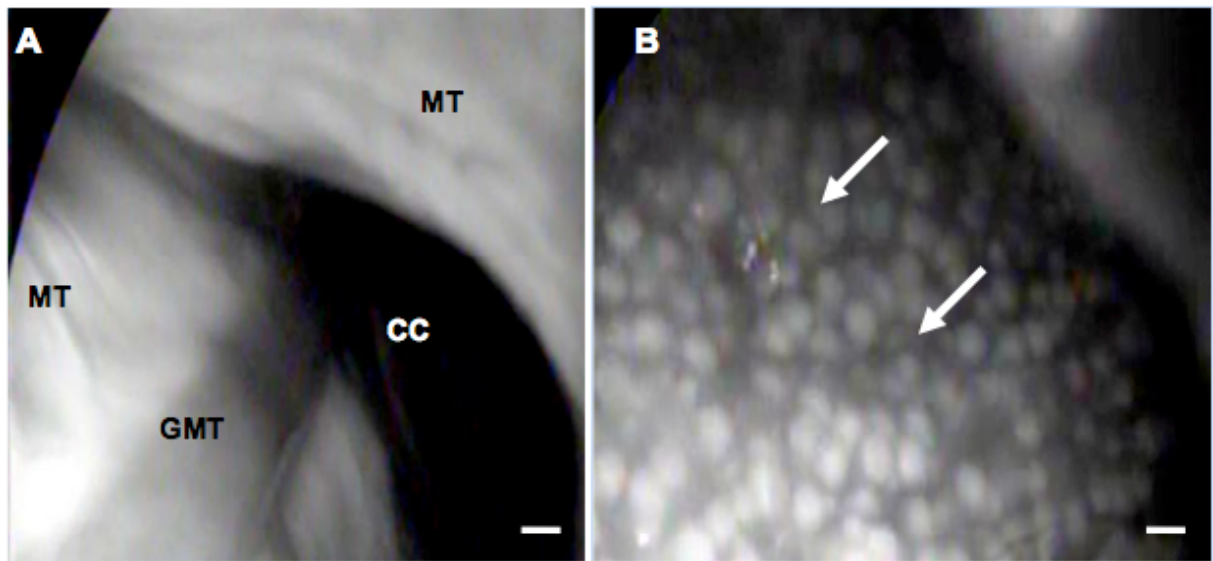
Os procedimentos individuais de laparoscopia duraram menos de três minutos por animal e geraram imagens nítidas das gônadas de machos e fêmeas. As incisões realizadas pela introdução do “*trocater*” não ocasionaram sangramento externo ou danos aos órgãos internos. Todos os exemplares sobreviveram aos procedimentos cirúrgicos de laparoscopia.

A indução anestésica em pirarucu ocorreu rapidamente após a inalação do clorofórmio (10 ± 3 s). O tempo de recuperação registrado foi de 15 ± 4 min. Estes resultados comprovaram a eficiência do clorofórmio como anestésico no pirarucu, que tem respiração aérea.

2.4.1.1 Diferenciação entre machos e fêmeas por laparoscopia

Com base nas imagens obtidas, foi possível diferenciar claramente as gônadas masculinas e femininas de todos os exemplares examinados. As imagens laparoscópicas dos machos mostraram um único testículo com aspecto alongado, opaco, estreito e de coloração levemente rosada, localizado do lado esquerdo, próximo a nadadeira pélvica, e visível em todo comprimento da cavidade corpórea (figura 21A). Imagens de fêmeas mostraram um único ovário de aspecto fusiforme localizado na parede abdominal, próximo a nadadeira pélvica, em todo comprimento da cavidade corpórea. Através da laparoscopia foi possível visualizar múltiplos ovócitos com coloração semi-esverdeada. A presença de ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento também foram observados (figura 21B).

Figura 21 – Detalhe do exame laparoscópico das gonadas de pirarucu.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda. A: Macho (CC) mostra a cavidade celômica. (MT) tecido muscular e (GMT) tecido gonadal masculino. B: Fêmea, visão laparoscópica, setas brancas mostram oocitos individuais. Escala da barra de espaço: 1,0mm.

2.4.1.2 Coloração de escamas para determinação de sexo

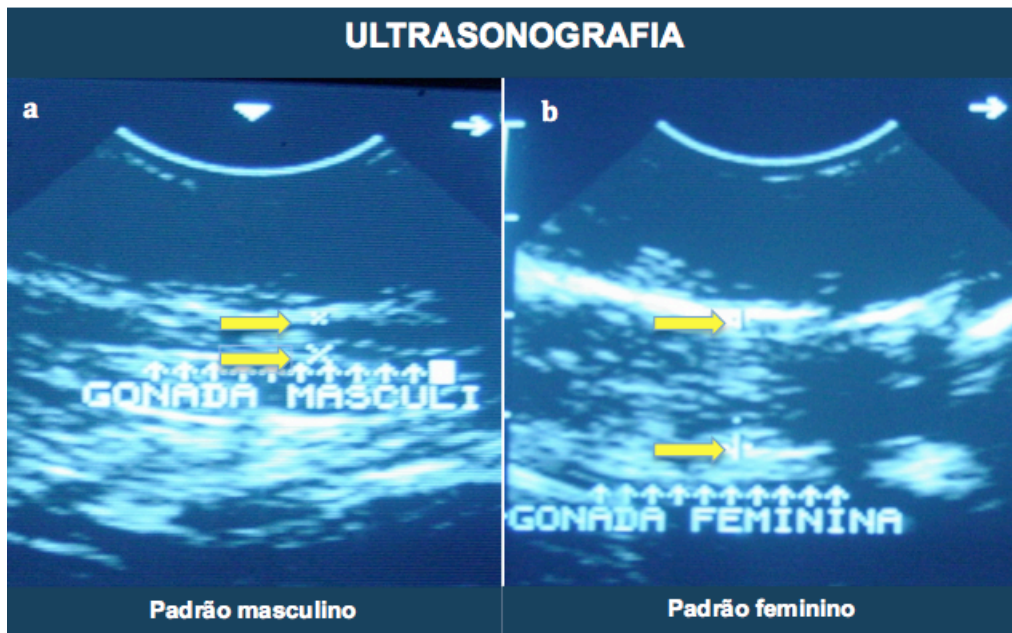
Com base na intensidade de coloração das escamas, oito dos dez exemplares observados aparentavam ser fêmeas e dois exemplares machos. O procedimento de laparoscopia revelou que eram seis fêmeas e quatro machos, fato que leva a acreditar que padrões de coloração de escamas de exemplares sexualmente imaturos não são confiáveis como característica para distinção sexual de pirarucu.

2.4.2 procedimento de ultrassonografia

A primeira leitura realizada com o transdutor sem a prévia remoção das escamas apresentou alto reflexo no feixe ultrassônico impossibilitando a nitidez de imagens. Com a retirada das escamas, o transdutor atuou num campo que variou entre um a três centímetros abaixo do tecido epitelial, obtendo-se assim imagens nítidas.

O processo de ultrassonografia, após anestesia e remoção de escamas, durou aproximadamente dois minutos por espécime e gerou imagens de gônadas masculinas e femininas (figura 22).

Figura 22 - (a) imagem de gônada masculina. A região entre a marca “x”, assinalada com setas amarelas, indica a espessura da gônada¹² (0,8cm). (b) imagem de gônada feminina, com largura indicada pelas setas (3,2 cm).



Fonte: Carlos Riedel.

2.4.2.1 Diferenciação entre machos e fêmeas por ultrassonografia

De forma geral, a ultrassonografia permitiu a visualização de ambos os gêneros de pirarucu pela identificação da presença de gônadas masculinas e femininas em espécimes juvenis. Do total de dezoito peixes examinados, quatorze (77%) possuíam padrão feminino e quatro (33%) padrão de gônada masculina.

Os exemplares de pirarucu com padrão masculino apresentaram uma única gônada (figura 40a), com 0,8cm de diâmetro médio. Já os exemplares do sexo feminino (figura 40b), exibiram imagens com diâmetro médio do ovário de 3cm.

A gônada feminina do pirarucu visualizada neste estudo apresenta-se em forma ímpar (presente somente no lado esquerdo, quando a cabeça do animal está de frente para o observador), e com tamanho significativamente maior que a gônada do macho. A constituição de ovócitos em diversos estágios de maturação gerou um padrão de imagem distinto em relação aos outros tecidos, com uma nítida imagem de coloração escura em virtude do baixo reflexo do feixe sônico do transdutor.

¹² A gônada masculina é caracterizada por comprimento longo e diminuta espessura, cerca de quatro vezes inferior ao da gônada feminina, conforme imagens reveladas pelo ultrassom nesta pesquisa.

Nos exemplares de pirarucu do sexo masculino foram encontradas dificuldades para a identificação sexual em virtude de pequenos erros de interpretação de imagens, dificuldades vencidas com a prática.

A frequência observada entre macho e fêmea foi significativamente diferente da esperada 1:1 conforme teste do Qui-quadrado. Para todos os peixes não houve diferenças significativas entre peso para machos e fêmeas até os dois anos de idade (idade dos espécimes utilizados neste estudo). Não foi registrada mortalidade pós-operatória nos peixes examinados.

2.4.3 Utilização de hormônios

2.4.3.1 Coletas de sangue

Não foi registrada mortalidade nos 24 exemplares de pirarucu de ambas classes de comprimento (juvenis e adultos) dos quais foram coletadas amostras de sangue, ou quaisquer alterações comportamentais, assim como complicações graves em decorrência das perfurações nas nadadeiras caudais e arcos branquiais. Nos exemplares submetidos ao procedimento de perfuração no arco branquial foi aplicado solução de ácido acético para facilitar a coagulação.

2.4.3.2 Ensaaios enzimáticos

As análises dos esteroides sexuais das amostras de juvenis e adultos de pirarucu revelaram concentrações de estradiol variando entre valores detectáveis (1pg/mL) a um valor máximo de 15,6 pg/mL (tabela 7) Os exemplares juvenis (com comprimento total médio de 82cm) e adultos (com comprimento total médio de 178cm) exibiram concentrações de estradiol semelhantes, não existindo correlação direta ou inversa entre a concentração de estradiol e o comprimento dos espécimes. Em todas as amostras, para ambas as classes de comprimento, não foram detectadas quantidades de testosterona (tabela 7).

2.4.3.3. Análise de variações no padrão de coloração de escamas de pirarucu

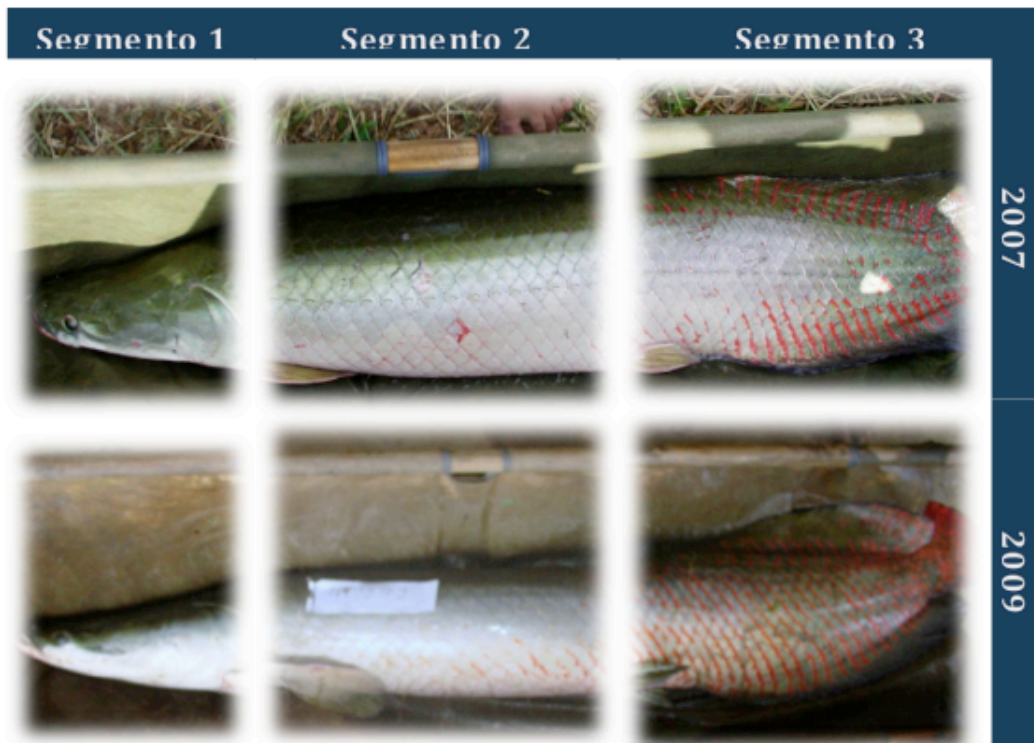
As comparações de imagens de seis exemplares adultos de pirarucu, previamente identificados com “*transponder*” eletrônico, revelaram que, no período de janeiro de 2007 a março de 2009, a coloração das escamas e o posicionamento destas sofreram alterações marcantes, especialmente em espécimes juvenis adultos (figura 23).

Tabela 7 - Método imunoenensaio enzimático de esteroides sexuais^(*) para a determinação de estradiol e testosterona em amostras de pirarucu, *Arapaima gigas*.

Identificação do exemplar	Concentração (pg/mL)		Comprimento (cm)	Sexo
	Estradiol	Testosterona		
5773	Entre 2 e 1	0	173	fêmea
9193	9,26	0	171	macho
9759	Entre 2 e 1	0	179	macho
0281	Entre 2 e 1	0	186	fêmea
6975	Inferior a 1,0	0	182	fêmea
3356	6,0	0	89	fêmea
2874	5,6	0	81	fêmea
9844	Inferior a 1,0	0	84	macho
1839	Inferior a 1,0	0	89	macho
6731	Inferior a 1,0	0	169	fêmea
3583	Inferior a 1,0	0	180	fêmea
9238	2,6	0	180	macho
3780	4,6	0	182	macho
0600	9,6	0	179	macho
1422	9,6	0	72	macho
2692	15,6	0	88	fêmea
4270	5,6	0	84	macho
5046	1	0	91	fêmea
6960	12	0	93	macho
7056	1,8	0	68	fêmea
7071	10,2	0	76	fêmea
7496	14,1	0	178	macho
7577	2,1	0	182	fêmea
7828	10,6	0	78	macho

Nota: (*) Sensibilidade do ensaio: 1pg/mL

Figura 23 - Exemplar de pirarucu, *Arapaima gigas*, evidenciando, em dois momentos (2007 e 2009), diferenças nos padrões de coloração de escamas. A figura encontra-se segmentada para facilitar a observação.



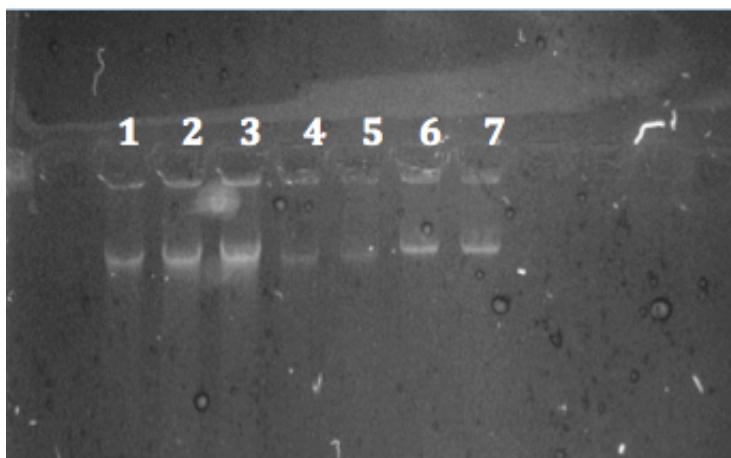
Fonte: Carlos Riedel.

2.4.4 Uso de marcadores moleculares na identificação sexual do pirarucu

2.4.4.1 Extração de DNA genômico

As eletroforeses de DNA genômico em gel de agarose a 0,8% revelaram uma banda única, nítida, com peso molecular de aproximadamente 23 Kb, tanto para as amostras de tecidos conservadas em solução de álcool a 70% como para as amostras de tecidos fresco (figura 24).

Figura 24 – Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose a 0,8%.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda: Nos poços 1, 2 e 3 amostras de pirarucu, *Arapaima gigas*, preservadas em álcool 70% ; em 4, 5, 6 e 7 amostras de DNA isolado de tecidos frescos.

Todas as amostras de tecidos analisadas – sanguíneo, do músculo cardíaco, gônadas – apresentaram bandas nítidas e definidas, não havendo diferenças marcantes entre os meios de conservação de amostras para a extração de DNA genômico.

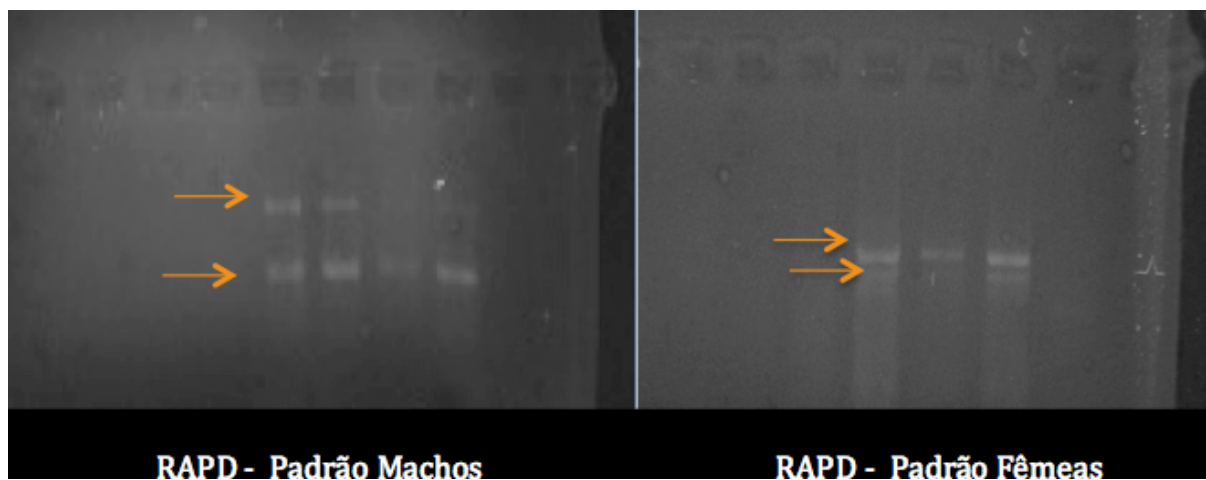
As amostras de DNA preservadas em solução de álcool a 70% apresentaram leve arrastado, o que pode ser caracterizado por uma sutil contaminação de polissacarídeos.

A concentração média de DNA genômico, medida através da absorbância a 260nm foi 1220 μ g/L. As relações entre as absorbâncias a 260/280nm mostraram uma boa qualidade na extração do DNA, indicando para a maioria das amostras valores acima de 1.6, o que caracterizou-se como amostra viável para reações de RAPD/PCR.

2.4.4.2 Análises de RAPD

Foram utilizados quinze *primers* que apresentaram melhor amplificação dos fragmentos do RAPD, sendo estas visualizadas em gel de agarose a 1,5%. Destes apenas um *primer* apresentou diferenças que sugerem ser relacionadas a sexo (figura 25).

Figura 25 - Padrão de RAPD em exemplares machos e fêmeas de pirarucu, *Arapaima gigas*.

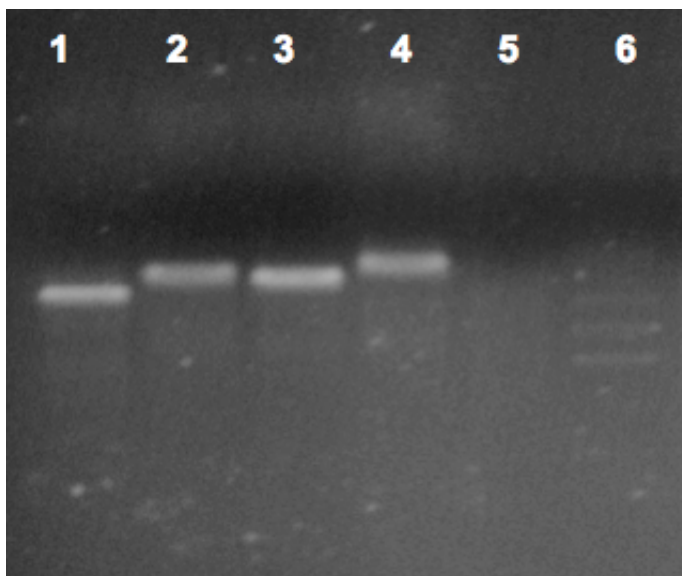


Fonte: Carlos Riedel.

2.4.4.3 - Sequenciamento da região do gene 18S

As reações de ampliação do gene de amostras de pirarucu foram exitosas, produzindo fragmentos com 568pb compreendendo o gene 18S (Figura 26).

Figura 26 – Eletroforese da reação de amplificação do gene 18S.



Fonte: Carlos Riedel. Legenda: Amostras 1,2,3 e 4 ampliações do gene 18S; Amostra 5 – controle negativo; 6 – marcador molecular.

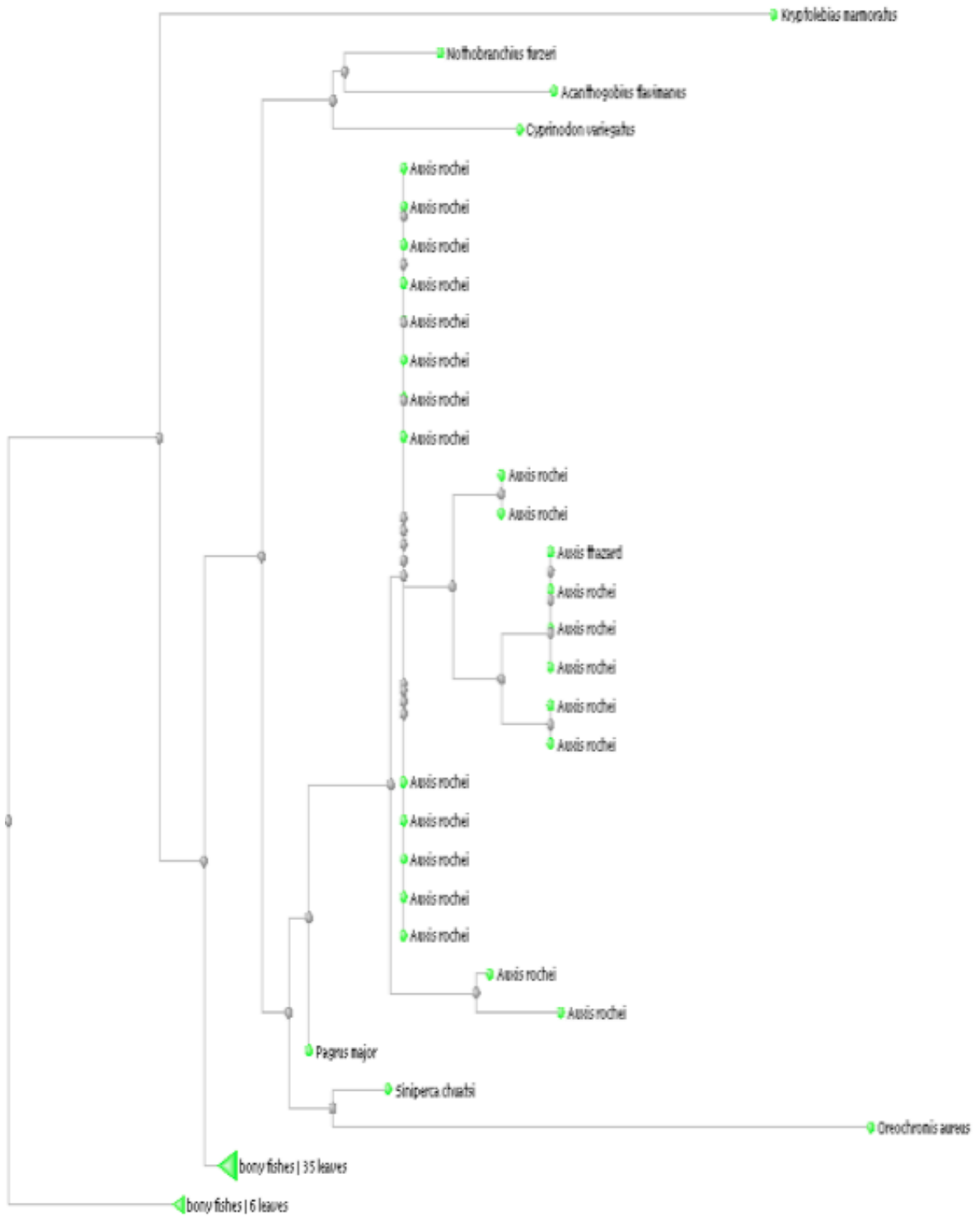
A sequência do gene 18S de pirarucu obtida foi a seguinte:

GAAGTTCGANGATGACTAGCAGGNCACAGGNGAAGCCCCGGGACACGGAAAGGAT
 CGACAGATTTGAAAGCTCTTTGCNCGATTACTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTC
 ATTAGTTGGCTGGAGTCGATTATAGTCTGGTTGATTTCGCTGACTAACGAACCGAGA
 CATCCGCGCATGCTAAGACTAGTTACAGGGGACCCCGAGTCGGTCTGGACTGGTTCG
 CAACATTCTTAGAAGGGACAAGTTGGCGTTCAGCCACACGAGATTGAANACAATA
 ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCTGCACGCGCGCCCACTGAGTGGT
 GCAACGTGTGCCTACCCTTCGCCGACAGGGCGCGGGTAACCCGCTGAACCCCAAGC
 GTGATTGGGATCGGGGATTGCAATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCAGTAAGT
 GCGGGTCATAAGCTCGCGTTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCG
 CTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGTCTTTGGATCGGCCCCGCGGGGTCGGT
 CACGGCTCTGGCGGAGCGCCGAAAAAGATGATCGAACTTGACTATCTAAGGAAGT
 AAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTAACCTGCGAGAT

A comparação da sequência do gene 18S obtida neste estudo com sequência do gene 18S depositadas no Banco Genético de Sequências de DNA (*GenBank*) do *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) não revelou semelhanças com nenhuma outra sequência de genes de pirarucu disponível.

A árvore filogenética gerada pelo programa BLAST é mostrada na figura 27. Nesta figura podem ser observadas sete espécies de peixes teleósteos que possuem similaridade com o gene 18S do pirarucu, *Arapaima gigas*. Cerca de 85% destas espécies possuem distribuição em águas continentais com salinidades de até 5‰, enquanto que 15% são exclusivas de águas marinhas (35‰). Todas espécies da árvore filogenética possuem comprimento médio inferior a 30cm.

Figura 27 – Árvore de similaridade genética do gene 18S do pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: BLAST

2.5 DISCUSSÃO

2.5.1 Laparoscopia

2.5.1.1 Anestesia

Ampla variedade de compostos tem sido usada para anestésias peixes: metanosulfato de triclaína (MS-222), Quinaldina (2-metilquinolina), Eugenol (4-allyl-2-metoxifenol) e Dióxido de Carbono (BROWSER, 2002). Dosagens destes compostos dependem do grau de anestesia desejado, da espécie, do tamanho do animal, da temperatura e dureza da água (KEEGAN, 2005; ZAHL *et al.*, 2009). Geralmente, os peixes são mantidos em aquário com solução anestésica diluída e removidos quando atingem o nível desejado de anestesia. Os anestésicos são comumente absorvidos pelas guelras durante a respiração. Uma vez que o pirarucu possui respiração aérea obrigatória, o uso de anestésicos diluídos em água pode causar sua morte por afogamento, devido ao risco de não recuperação do reflexo respiratório ser muito alto. A indução anestésica em pirarucu obtida neste estudo ocorreu rapidamente após a inalação do clorofórmio, comprovando a eficiência deste composto como anestésico no pirarucu. Estudos adicionais desta técnica para pirarucus são altamente recomendados.

2.5.1.2 Procedimento laparoscópico

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, desenvolvidos por Hernandez-Divers *et al.* (2004), utilizando laparoscopia em exemplares de esturjão *Acipenser gueldenstaedtii*. Froehlichet *et al.*, (1999), sugeriram que geralmente existe um risco em qualquer procedimento cirúrgico, mas este risco é geralmente baixo utilizando laparoscopia. Embora Swenson *et al.*, (2007) relatem a existência de uma relação entre tamanho do peixe e risco de mortalidade em procedimento de laparoscopia, esta relação não se aplicou no presente estudo, pois todos os espécimes sobreviveram ao procedimento de laparoscopia. Os resultados obtidos indicaram que o procedimento laparoscópico foi eficiente, prático, e pouco estressante, para determinação de sexo em pirarucu.

2.5.1.3 Diferenciação entre machos e fêmeas

Apesar de gerar imagens precisas, a funcionalidade do endoscópio é muito limitada na distinção entre gordura visceral e tecido gonadal, principalmente em exemplares do sexo masculino, que geralmente possuem gônadas menores que as das fêmeas, como comprovado com o esturjão (WILDHABER *et al.*, 2005). Entretanto, para os exemplares de pirarucu estudados, o tecido gonadal masculino mostrou aspecto de coloração diferenciado da gordura visceral, apresentando tonalidade levemente rosada, enquanto que a gordura visceral possuía coloração branco-amarelada. Estas diferenças de cor produziram um contraste que facilitou a identificação da gônada através da imagem.

2.5.1.4 Coloração de escamas para determinação de sexo

Chu-Koo *et al.* (2008) desenvolveram metodologia de exame com enzimas para a determinação de sexo de exemplares de pirarucu com 2,8 anos de idade, obtendo 95% de acerto. O método da laparoscopia utilizado neste experimento assegurou precisão de 100% em exemplares com aproximadamente a mesma idade, pela observação direta de ovócitos, sugerindo que a laparoscopia é um método confiável para determinação de sexo em pirarucus imaturos e pode ser considerada poderosa ferramenta para o manejo em instalações de cultivo.

2.5.2 Ultrassom

A tecnologia de visualização de imagens por ultrassom utilizada para determinação de sexo em pirarucu no estudo, tem sido usada há três décadas como instrumento auxiliar no diagnóstico de maturação sexual dos ovócitos de peixes (HURVITZ, 2007). Esta tecnologia tem sido utilizada para a identificação de sexo de peixes, Martin-Robichaud (2001) utilizou o ultrassom com sucesso na determinação do sexo de juvenis de três espécies de peixes marinhos. O ultrassom também foi usado para monitorar o estágio gonadal em peixes submetidos a tratamento com esteróides, conforme relataram Kucherka e Khan (2007).

Neste estudo, os pirarucus foram anestesiados com inalação de vapor de clorofórmio utilizando máscara especialmente adaptada, antes de utilizar o ultrassom. A utilização de anestésicos para o procedimento de ultrassom em exemplares de *Maccullochella peelii* foi considerado imprescindível por Newman *et al.* (2008), pois os exemplares de peixes devem estar em repouso e assim possibilitar imagens nítidas.

Nos exemplares de pirarucu do sexo masculino foram encontradas dificuldades para a identificação sexual em virtude de pequenos erros de interpretação de imagens. A precisão do equipamento na distinção entre os tecidos adiposo, muscular e gônadal é de vital importância para gerar imagens precisas que facilitem o diagnóstico. Tecidos que apresentam densidades semelhantes são, por vezes, difíceis de distinguir especialmente pela qualidade da imagem gerada, conforme relatou Wildhaber *et al.* (2005) em estudo de identificação sexual de esturjões (*Acipenser sturio*).

Estudos de identificação de sexo em teleosteos sugerem que as gônadas masculinas e femininas são mais facilmente identificadas com o aumento de peso do espécime, em especial ênfase a espécimes maduros sexualmente (MOGHIM *et al.*, 2002). O equipamento utilizado para o ultrassom de exemplares de pirarucu no CPA/DNOCS apresentou viabilidade de exame em exemplares juvenis de machos e fêmeas com peso mínimo de 10kg, em exemplares com peso inferior existiu uma desproporcionalidade entre o transdutor e a área de varredura que impossibilitou a leitura precisa.

Martin-Robichaud (2001) utilizou a técnica da ultrassonografia para estimar o estágio de maturação das gônadas de *Hippoglossus hippoglossus*, *Pleuronectes americanus*, *Pleuronectes ferruginea* e *Melanogrammus eagle*, através da medida do diâmetro máximo do ovário. Este autor utilizou a varredura do “scanner” na porção final da cavidade corporal na área diretamente anterior ao polo urogenital. Para os exemplares de pirarucu, a visualização da gônada feminina somente foi possível com o scanner posicionado lateralmente acima da nadadeira ventral, a disposição anatômica do polo urogenital do pirarucu impossibilitou a formação de imagens da gônada – masculina ou feminina.

Reimers *et al.* (1987) relataram que a presença de conteúdo estomacal pode interferir na interpretação de imagens de ultrassom em peixes. Os exemplares de pirarucu, por serem de hábitos carnívoros, possuem estômago grande em relação as demais vísceras, entretanto. Este órgão situa-se em posição anatômica distante da gônada em exemplares de pirarucu de ambos os sexos, e desta forma a presença de conteúdo estomacal não interferiu na formação de imagens para a determinação sexual.

Apesar de ser uma técnica não invasiva, o ultrassom necessita de interpretação precisa da imagem. Colombo *et al.* (2004) relataram precisão de 80% na identificação de fêmeas e 96% de precisão na identificação de machos de esturjão (*Acipenser sturio*). Newman *et al.*, (2008) considerou altamente eficiente o método de ultrassom para identificar o sexo de *Maccullochella peelii peelii* com 96% de acerto das imagens. Outros autores descreveram para diversas espécies de peixes, precisão de até 97% (Moghim *et al.*, 2002). O estudo empreendido

revelou que em apenas uma imagem de um único animal (dos 18 estudados) não foi possível a identificação do sexo do pirarucu utilizando o ultrassom, o que resultou em 94% de precisão.

2.5.3 Utilização de hormônios

Conforme Baca (2001), em estudo realizado para o Instituto de Investigações da Amazônia Peruana, características sexuais externas para distinguir sexo de pirarucu não podem ser visualizadas.

Apesar disso, a coloração e posicionamento de determinadas escamas tem sido usadas como indicativo de sexo de exemplares adultos de pirarucu. Para Monteiro *et al.* (2010), os exemplares machos apresentam uma mancha alaranjada na parte inferior da cabeça, diferindo das fêmeas apenas em intensidade, essa característica se manifesta em exemplares adultos.

Existe, portanto, uma clara divergência entre autores no que tange a utilização de caracteres sexuais secundários na identificação sexual do pirarucu, quer na coloração, posição ou intensidade de cores de escamas. Apesar desta divergência, instituições de pesquisas e alguns produtores tem utilizado o padrão da coloração de escamas de pirarucu como indicativo para determinação de sexo, mesmo em espécimes sexualmente imaturos (comprimento médio inferior a 1,2m).

O plantel, pertencente ao CPA/DNOCS, de espécimes considerados adultos¹³, marcados com *chips* eletrônicos no ano de 2007, apresentou durante os 2 anos e 3 meses de estudo, nítidas mudanças no posicionamento e coloração de escamas (figura 21). Com base neste resultado se sugere que caracteres sexuais secundários não podem funcionar como indicadores seguros de sexo em exemplares de pirarucu cultivados, pois mesmo em espécimes considerados adultos, existe uma mudança no posicionamento de escamas com coloração vermelha.

Exemplares adultos de pirarucu, quando em época de reprodução, podem apresentar diferenças marcantes na coloração em virtude da atuação de hormônios precursores da formação e maturação de ovócitos. Contudo, o padrão de coloração de escamas somente sofre alterações significativas quando os espécimes encontram-se maduros sexualmente e em fase de cortejo (MONTEIRO *et al.*, 2010).

¹³ Apresentam tamanho e peso suficientes para desova, embora ainda não tenha ocorrido.

Para Strange (1996) e Webb *et al.* (2002) algumas técnicas de extração de sangue em certas espécies de peixes são consideradas altamente invasivas e não devem ser aplicadas, especialmente se estas apresentem comprimento inferior a 150mm. Neste estudo, as extrações de sangue por punção da veia na nadadeira caudal de exemplares adultos de pirarucu foi considerada rápida e segura, não resultando em hemorragias graves sendo considerado um método seguro para as rotinas de manejo, por ter mínimos riscos de lesões e pequena possibilidade de lesões por mordidas para os envolvidos no processo. Por outro lado, a extração de sangue de pirarucu nos arcos branquiais foi considerada invasiva em virtude de hemorragias ocasionadas, e do risco elevado de acidentes durante o manejo. Os arcos branquiais possuem extrema vascularização, tornando a possibilidade de acesso a uma veia extremamente grande, facilitando assim a coleta de sangue. Contudo, apesar das facilidades de coleta, este tipo de ação geralmente acarreta em hemorragia e risco de infecção.

Não foram detectadas diferenças entre os níveis de estradiol para as duas classes de comprimento nos exemplares de fêmeas do CPA/DNOCS. O experimento de Monteiro *et al.* (2010), mostrou que maiores concentrações de estradiol foram detectadas em espécimes adultos durante o período de reprodução. A fêmea pertencente ao plantel do CPA/DNOCS que apresentou o maior nível de estradiol (15,6pg/mL) durante o mês de julho, mostrou valor semelhante ao obtido por Monteiro *et al.* (2010) ligeiramente menor que 20 pg/mL para o mesmo período do ano.

Não foram detectados níveis de testosterona em nenhum dos exemplares de reprodutores de pirarucu do CPA/DNOCS, quando utilizadas duas classes de comprimento e amostragem realizada no mês de julho. Monteiro *et al.* (2010), encontrou valores de testosterona que variavam entre 122,41 a 1.404,5pg/mL, em exemplares adultos, durante o período de 12 meses de observações.

2.5.4 Uso de marcadores moleculares na identificação sexual do pirarucu

Os resultados das extrações de DNA genômico pelo método CTAB, foram satisfatoriamente eficientes para amostras preservadas em solução de álcool 70% e tecidos vivos do pirarucu, mostrando a eficiência desta técnica que foi inicialmente desenvolvida para extração de DNA genômico em tecidos vegetais (FOSTER & TWELL, 1996). O método CTAB de extração de DNA genômico foi bastante eficiente para a extração de DNA, gerando produtos de boa qualidade a partir de tecidos de algumas espécies de peixes, como tilápias

(LIMA, 1999), percas (WILLIAMS *et al.*, 1998) e até mesmo para crustáceos (CARREIRO, 2001).

O protocolo de extração de DNA genômico produziu material genético com pureza suficiente para a realização de reações de RAPD, e de reações de sequenciamento do gene 18S, não apresentando impurezas ou contaminações por resíduos de proteínas, que geralmente interferem negativamente para ambos tipos de reação.

Foi possível a extração de DNA genômico de todos os tecidos testados (coração, gônadas, músculo, sangue e lamela das escamas). Porém, o tecido da lamela das escamas, apresentou maior facilidade de coleta, pois ocasionou menos lesões nos exemplares, possuindo ainda compatibilidade de qualidade e pureza com os demais tecidos estudados.

Além disso, a extração da escama geralmente libera quantidades mínimas de sangue, que também podem ser utilizadas no processo de extração de DNA genômico. De acordo com Walker (1999), a extração de DNA em pureza, quantidade e integridade suficientes, representam um requerimento essencial para a obtenção de reações de PCR, incluindo-se a técnica do RAPD.

FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998) afirmaram que a quantidade e qualidade de DNA são afetadas pela condição do tecido antes da extração, sendo preferível a extração de DNA de material mais fresco possível. A extração da escama, seguida da coleta de sangue, assegurou qualidade na extração de DNA genômico das amostras do CPA/DNOCS.

O processo de extração das escamas representou um menor risco de acidentes para os operadores, principalmente quando comparada com a técnica de coleta de sangue em seringas. Além disso, a utilização da lamela da escama de exemplares de pirarucu pode facilitar o manejo em fazendas de diferentes regiões do país, distantes do laboratório sede, sendo necessário apenas a extração e envio das mesmas para o laboratório em embalagens plásticas. FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998) afirmam que a quantidade e qualidade de DNA em geral são afetadas significativamente pela condição do tecido antes da extração, sendo preferível a extração de DNA de material mais fresco possível.

É considerado fator de suma importância que um marcador molecular, para gerar reações de amplificação, tenha altos níveis de pureza das amostras, uma rigorosa padronização das mesmas e apresente repetições nos padrões da bandas geradas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). As reações de RAPD foram exitosas na determinação de polimorfismos, sendo identificado de um total de 15 *primers* testados, um único *primer* que respondeu com padrões polimórficos distintos para machos e fêmeas. Foram encontradas,

para todos os quinze *primers testados*, um total de 78 bandas, destas, apenas 4 (5%) sugeriram polimorfismos entre sexo.

A análise das bandas foi feita criteriosamente, sendo selecionadas apenas as amostras que apresentaram bandas mais intensas e repetíveis em ensaios sucessivos, estratégia também utilizada por HARDING *et al.* (1997).

O método do RAPD, tem sido considerado uma poderosa ferramenta na solução de problemas nos mais variados campos da dinâmica populacional de diversos tipos de organismos. Atualmente, é crescente o número de pesquisas que utilizam esta ferramenta e outras técnicas de genética molecular para resolver problemas relacionados com recursos aquáticos.

O gene 18S é uma subunidade do RNA mitocondrial, logo possui características extremamente conservadas, o que possibilita estudos de filogenia e conservação de espécies. A obtenção da sequência do gene 18S do pirarucu, *Arapaima gigas*, pode contribuir no futuro para o entendimento da diversidade dessa espécie, em meio natural, como em estudos de administração do plantel de reprodutores de uma dada unidade de produção de alevinos.

Por apresentar características extremamente conservadoras e possuir similaridade com poucas espécies de peixes, o sequenciamento do gene 18S possui um potencial de exploração forense, sobretudo na identificação de exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*.

2.6 CONCLUSÕES

O uso de clorofórmio como anestésico para pirarucu provou ser efetivo por ter permitido a execução completa e bem sucedida do procedimento de laparoscopia. Os padrões de colorações de escamas não foram efetivos como critério de determinação de gênero. As imagens geradas pelo procedimento de laparoscopia tiveram alta taxa de precisão para identificação de gônadas masculinas e femininas.

O estudo realizado sugere que a laparoscopia em cultivo de pirarucu é um método eficiente para a identificação sexual em estágios imaturos. A capacidade de observar as gônadas intactas em peixes anestesiados é eficiente recurso para o manejo em unidade de produção de alevinos.

A técnica da ultrassonografia na identificação sexual de pirarucu mostrou-se eficiente e de baixa invasão. A presença de escamas ocasionou reflexos indesejados que interferiu na formação de imagens da cavidade abdominal, sendo que a remoção destas escamas assegurou a formação de imagens mais precisas.

Não houve diferenças significativas de peso e comprimento entre sexo de juvenis de pirarucu submetidos à ultrassonografia.

As imagens geradas pelo sistema de ultrassom foram consideradas precisas para identificação de gônadas masculinas e femininas.

A experiência com esta técnica indicou ser necessário um alto nível de precisão operacional para obter melhor interpretação de imagem.

As punções realizadas na nadadeira caudal ofereceram menores riscos quando comparadas com as punções nos arcos branquiais do pirarucu, *Arapaima gigas*. Os níveis de estradiol detectados em alevinos e juvenis de pirarucu, para o período estudado, não podem ser utilizados como indicadores na determinação precoce do sexo do pirarucu, *Arapaima gigas*.

A metodologia tradicional de identificação sexual do pirarucu, com base nas observações do padrão de coloração e posicionamento de escamas, não pode ser seguramente utilizada em virtude das variações de posicionamento de escamas, conforme se observou, durante o período 2007-2009, em exemplares com “*transponder*” implantável.

O método de extração de DNA genômico do reagente CTAB mostrou-se eficaz para a extração de DNA de tecidos do pirarucu (gônadas, músculo abdominal, coração e fígado), não tendo apresentado nenhuma degradação aparente ou graus de pureza inadequados para a realização de reações de RAPD e sequenciamento. As amostras retiradas do animal vivo (tecido fresco) possuíam rendimento semelhante às conservadas em solução de álcool 70%.

Somente 5% das bandas polimórficas das reações de RAPD deram indicações de polimorfismos entre sexos de pirarucu.

A sequência do gene 18S do pirarucu possui similaridade genética com diversas espécies de teleósteos. Não foram encontradas sequências de 18S de pirarucu no Banco Genético de Sequências de DNA (*GenBank*) do *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) que possibilitassem comparações polimórficas. A aplicação desta metodologia é passo inicial para avaliar a diversidade genética entre espécies, evitando assim futuras endogamias entre reprodutores.

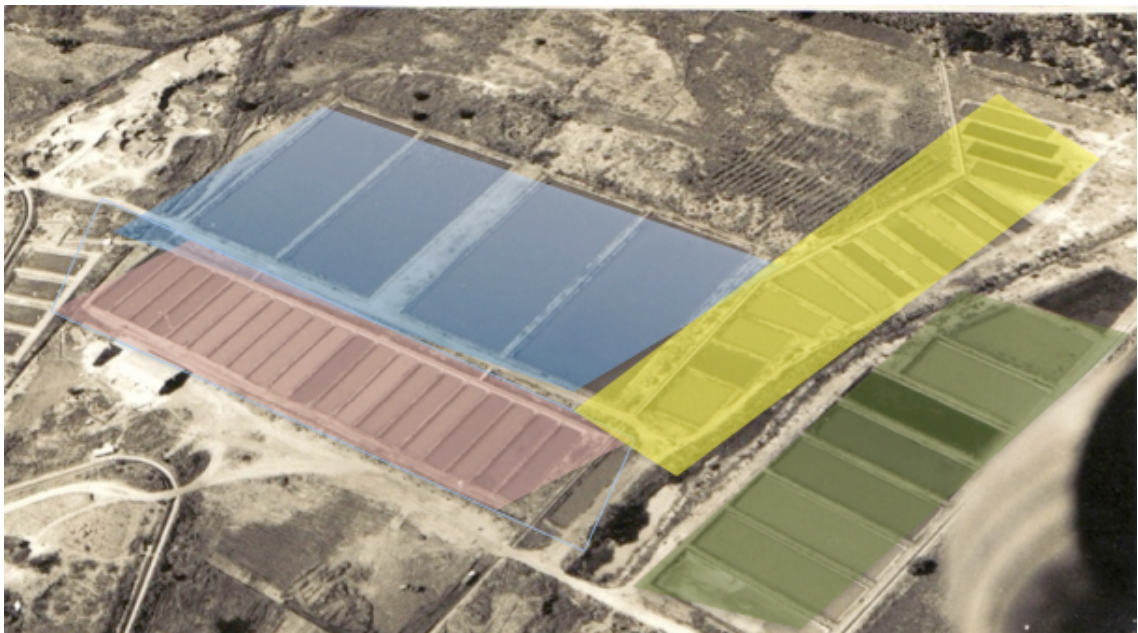
CAPÍTULO 3 – ASPECTOS DA REPRODUÇÃO E ALEVINAGEM DO PIRARUCU, *Arapaima gigas*, CULTIVADO

O capítulo apresenta os resultados obtidos durante o manejo reprodutivo dos pirarucus, *Arapaima gigas*, introduzidos no CPA/DNOCS, em 2005, pelo “Projeto Pirarucu”. Nele estão detalhados: comportamento reprodutivo, hábitos de desova e alevinagem do pirarucu; introdução de marcas eletrônicas no peixe; descrição dos processos de elaboração e teste de rações para alevinos, juvenis e reprodutores; protocolos desenvolvidos para coleta de sangue (para análises biotecnológicas) e procedimentos anestésicos em juvenis e adultos (úteis em pequenas intervenções cirúrgicas).

Estrutura física do *Campus II* - CPA/DNOCS

O *Campus II*, pertencente ao Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolpho von Ihering (CPA/DNOCS)¹⁴ é uma unidade descentralizada, distante aproximadamente quatro quilômetros da sede. (figura 28).

Figura 28 – Vista aérea do *Campus II* - CPA/DNOCS.



Fonte: Carlos Riedel. A linha azul indica os viveiros para crescimento de reprodutores de pirarucu (5.000m²). Nos viveiros de 350m² indicados pela linha vermelha foram realizados os experimentos de crescimento. Indicados pelas linhas amarela e verde encontram-se os viveiros utilizados para reprodução de pirarucus.

¹⁴ A sede do CPA possui, além dos setores administrativo e produção, três laboratórios: O LabGeM – Laboratório de genética molecular, o laboratório de larvicultura e uma unidade de processamento do pescado, que funcionaram como estrutura auxiliar na realização das pesquisas relativas ao manejo reprodutivo do pirarucu, *Arapaima gigas*.

Este *Campus* possui, numa área de aproximadamente 47 hectares, a seguinte infraestrutura física: quatro viveiros de 5.000m² escavados em solo natural; um viveiro de 3800 m²; 13 viveiros de 450 m²; 20 viveiros de 350m²; nove tanques de concreto de 1.000m²; além de quatro tanques de concreto de 600m².

Os viveiros de 5.000m² abrigam os juvenis de pirarucu destinados à reprodução, que após alcançarem comprimento e peso suficientes são identificados sexualmente e transferidos para viveiros menores (300 a 400m²). Nas demais baterias de viveiros foram desenvolvidos estudos de crescimento sob diferentes percentuais de biomassa.

3.1 Observações do comportamento reprodutivo do pirarucu, *Arapaima gigas*

3.1.1 Introdução

O comportamento reprodutivo de peixes tropicais que habitam planícies de inundação de rios é um processo cíclico diretamente relacionado com a estabilidade hidrológica. O ciclo anual de chuvas e as consequentes cheias desempenham papel preponderante na reprodução de muitas espécies de peixes, por fornecerem novas áreas de habitats e de alimentação oriundas dessas ocorrências pluviais (CUNICO *et al.* 2002).

Outros tipos de estímulos estão envolvidos no processo reprodutivo de diversas espécies de peixes. Neste sentido, a qualidade da água e as condições atmosféricas podem estar associadas a eventos de desova. O ciclo reprodutivo do pirarucu, sobretudo os picos de desova, ocorre em diferentes regiões de sua extensa área de ocorrência (desde o Estado do Pará, no Brasil, até o Peru) e geralmente estão associados, como em outras espécies de peixes, a regime de precipitações pluviais (BAZZOLI, 2003).

O pirarucu se enquadra no grupo das espécies de maturação sexual parcial, apresentando até duas desovas anuais, desde que disponha de boas condições nutricionais e ambientais (FONTENELE, 1982).

Por se tratar de espécie introduzida em área geográfica (Nordeste do Brasil) de condições climáticas distintas das encontradas em sua área original (Bacia Amazônica), torna-se necessário estabelecer a época em que os pirarucus apresentam picos de desova na região nordestina.

3.1.2 Objetivo

Esse estudo de comportamento reprodutivo teve como objetivo determinar o período de maior frequência de desovas de pirarucus confinados em viveiros do CPA/DNOCS, no Estado do Ceará, no período de novembro de 2006 a março de 2011.

3.1.3 Metodologia

3.1.3.1 Seleção e formação de casais

Inicialmente os reprodutores de pirarucu foram identificados eletronicamente com a introdução de *transponders* implantáveis. Estes dispositivos emitem um sinal com numeração única para cada espécime, são lidos mediante leitor específico e geralmente não são rejeitados pelo organismo. Machos e fêmeas de pirarucu, previamente selecionados por técnicas de laparoscopia, ultrassom, marcadores moleculares e observações de caracteres morfológicos e merísticos, foram transportados individualmente em maca com camisa de contenção para duas baterias de viveiros, previamente preparados. A primeira bateria era composta por vinte unidades (numeradas 1 a 20) com 350 m² cada, e a segunda bateria era composta por dez unidades de 1.000 m² cada.

Duas vezes por dia, no período da manhã (9.00h) e a tarde (16.00h), os reprodutores recebiam alimentação *ad libido* composta de um agregado de ração comercial extrusada (42% de proteína bruta) adicionada de tilápias trituradas. Cada viveiro ainda continha juvenis de tilápia, à razão de 1 espécime/m², com peso médio de 40g, para suplementação alimentar esporádica.

3.1.3.2 Observações comportamentais

Diariamente, na oportunidade da alimentação dos reprodutores, os seguintes aspectos comportamentais eram observados: natação em conjunto, presença de saltos, construção de ninho (visualizada através da agitação da água e dispersão de partículas de argila), brigas, saltos e presença de nuvens de alevinos.

3.1.3.3 Análise de dados de precipitações pluviais

Foram utilizadas séries históricas de precipitações pluviais (Fonte: FUNCEME), bem como informações coletadas da estação meteorológica sem fio do LabGeM/CPA/DNOCS (distante 2km dos viveiros de reprodutores de pirarucu). Os dados de precipitações foram correlacionados com a frequência de desova observadas nos viveiros.

3.1.4 Resultados

3.1.4.1 Seleção e formação de casais

Durante o ano de 2006 e o primeiro semestre de 2007 não foram observados aspectos comportamentais reprodutivos nos exemplares de pirarucu que ocupavam os viveiros do *Campus II* do CPA/DNOCS.

A partir do segundo semestre de 2007 até o primeiro trimestre de 2011, em vinte e nove viveiros foram observadas movimentações de cortejo. Os indícios visualizados nos animais que antecederam o comportamento de cortejo foram intensidade de cores acentuadas (sobretudo em exemplares machos), natação pareada e formação de ninhos.

Durante os cortejos foram registrados saltos, pancadas da nadadeira caudal na superfície da água, natação pareada e por vezes construção de ninhos com nítida mudança de coloração da água em regiões específicas do viveiro.

Durante o período do estudo foram observados 20 eventos de construções de ninhos com consequentes desovas em 14 deles (tabela 8). No viveiro número 6, com 350m² de área de espelho d'água, um casal, com comprimento e peso médio respectivos de 120cm e 25kg, apresentou uma desova.

Tabela 8 – Viveiros com ocorrências de desovas de pirarucu, *Arapaima gigas*, no *Campus II* do CPA/DNOCS durante o período de 2006-2011.

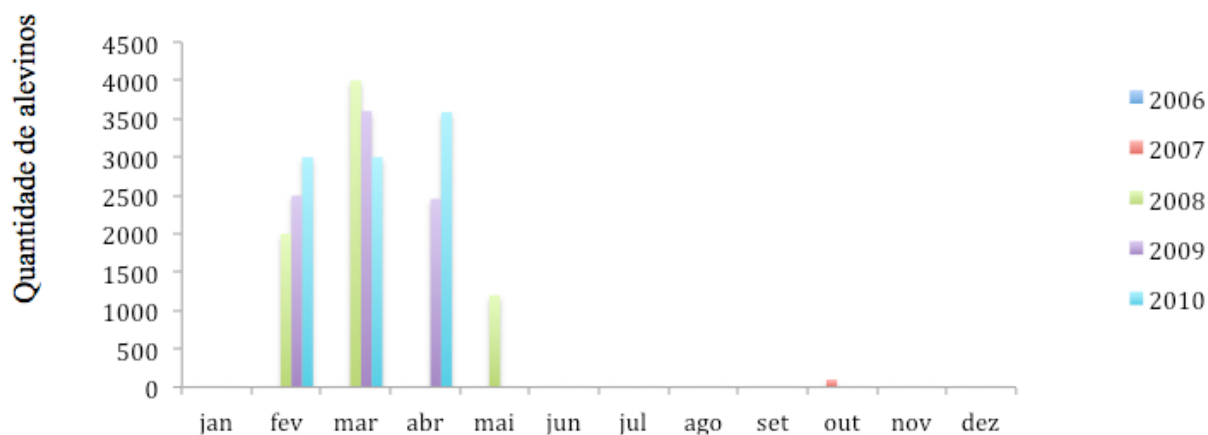
Meses	Anos					
	2006	2007	2008	2009	2010	2011(*)
Janeiro	-	-	-	-	-	-
Fevereiro	-	-	1	1	1	1
Março	-	-	1	1	1	1
Abril	-	-	1	1	-	-
Maio	-	1	1	-	-	-
Junho	-	-	-	-	-	-
Julho	-	-	1	-	-	-
Agosto	-	-	-	-	-	-
Setembro	-	-	1	-	-	-
Outubro	-	-	-	-	-	-
Novembro	-	-	-	-	-	-
Dezembro	-	-	-	-	-	-
Total	-	1	6	3	2	2

Nota: (*) Janeiro e fevereiro. Observações: Cada viveiro comportava um casal de pirarucu. Total de viveiros com casais formados 30. As Células sinalizadas com azul indicam simultaneidade entre desovas e precipitações pluviais.

As construções de ninhos eram claramente percebidas através da observação da diferença de coloração na água do viveiro, decorrente da dispersão de partículas em agitação, e do isolamento do casal nas proximidades das áreas de diferentes colorações.

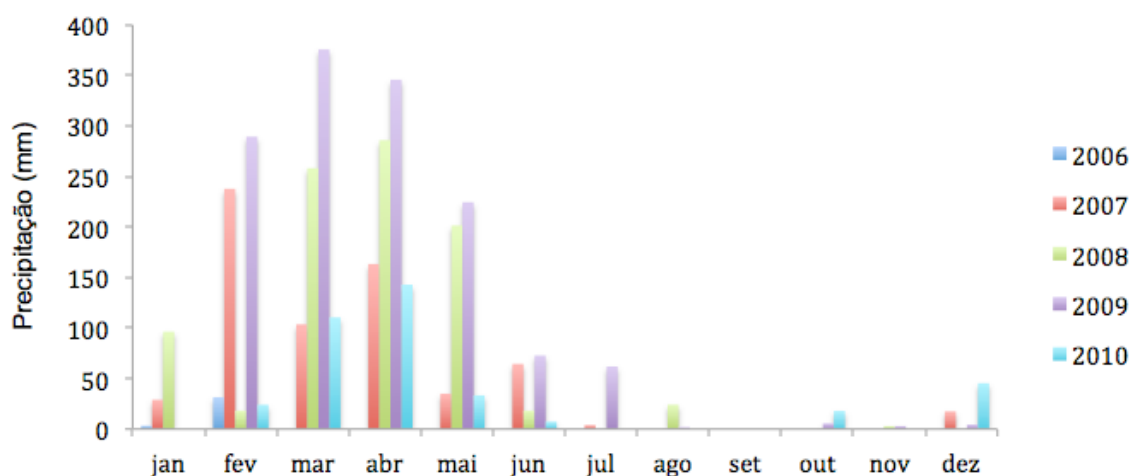
Nos anos de 2006 a 2011 foram verificadas as maiores frequências de desovas durante os meses de fevereiro e março, apresentando correlação positiva direta entre a quantidade de desovas de pirarucu e dias com precipitações pluviais (figuras 29 e 30).

Figura 29 – Número de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, nascidos no CPA/DNOCS durante os anos de 2006 a 2010.



Legenda: Cada barra com cores distintas representa um ciclo anual. No eixo X, durante janeiro a maio, ocorreram as maiores frequências de desova. De agosto a novembro observou-se a menor frequência de desovas.

Figura 30 – Índices de precipitação pluvial no município de Pentecoste/CE, no período 06-10



Legenda: Cada barra com cores distintas representa um ciclo anual. No eixo X, durante janeiro a maio, ocorreram as maiores frequências de desova. De agosto a novembro observou-se a menor frequência de desovas.

Fonte: FUNCEME.

3.1.5 Discussão

Os reprodutores de pirarucu do CPA/DNOCS apresentaram durante o período chuvoso do Estado do Ceará maior intensidade de coloração nas escamas (sobretudo vermelhas), além de natação pareada e formação de ninhos com desovas em 70% dos exemplares observados. Em 30% dos exemplares não foram verificados aspectos comportamentais reprodutivos. Fatores ambientais podem influenciar na expressão de caracteres sexuais secundários em peixes. A influência de tais fatores, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e precipitações pluviais, culmina na maturação das gônadas de espécimes confinados em cativeiro o que conseqüentemente influencia aspectos fisiológicos da reprodução (LAM, 1983).

Embora o ano de 2006 tenha apresentado precipitações pluviais dentro da média, não foram registrados eventos comportamentais de cortejo nem alterações de coloração de escamas nos exemplares de pirarucus dos viveiros do CPA/DNOCS. Este fato ocorreu provavelmente devido o peso e a idade da maioria dos exemplares de pirarucu estar abaixo da média de reprodução para esta espécie.

Diferenças marcantes no indicativo de maturação sexual de pirarucus são comumente relatadas: Godinho *et al.* (2005) citaram o comprimento e o peso para maturação sexual variando de 50kg a 58kg e 145 e 154cm, respectivamente. Ambos relatam idade média acima de 5 anos. Já Imbiriba (2001) registrou comprimento inicial de reprodução para exemplares de pirarucu de 180cm. Em um viveiro do CPA/DNOCS foi registrada desova de casal com comprimento e peso substancialmente abaixo das médias especificadas: 120cm e 25kg. Isto ocorreu, provavelmente, como estratégia adaptativa de antecipação da maturação sexual devido as condições em cativeiro.

Imbiriba (2001) e Pereira-Filho (2002) afirmaram que reprodutores de pirarucu devem ser estocados em viveiros com área equivalente a 200m² por reprodutor, que representa uma área mínima de 400m² para cada casal. Os exemplares de pirarucu do CPA/DNOCS obtiveram sucesso reprodutivo com área mínima de 350m², ou seja, 12,5% inferior a área recomendada pelos referidos autores.

De acordo com Menezes (1951), o pirarucu apresenta desovas nos picos de precipitações pluviais nas diferentes regiões de sua ampla ocorrência geográfica em ambiente natural. Os reprodutores de pirarucu cultivados no CPA/DNOCS apresentaram desovas exclusivamente no período chuvoso do Estado do Ceará, incluindo apenas uma única desova ocorrida no mês de setembro (época de baixas precipitações).

Em estudo realizado no Peru, Guerra (2002) observou que a temporada reprodutiva de pirarucus selvagens ocorria no período de outubro a fevereiro, coincidindo com os picos de chuvas peruanos e a maior intensidade de desovas ocorria no mês de novembro. Por sua vez, Rojas (2005), em outro estudo também realizado no Peru, relata que as desovas de exemplares em cativeiro ocorreram entre os meses de fevereiro a junho com maior frequência de desovas no mês de abril.

Imbiriba (2001) relatou que apesar da correlação entre período de cheias, precipitações e intensidades de desovas de peixes, ainda são escassos os estudos que comprovem estas interações, sobretudo qual fator seja o mais determinante para a reprodução.

3.1.6 Conclusões

Sugere-se uma correlação direta positiva ($r = 89\%$) entre o período de maiores precipitações no estado de Ceará nos anos de 2006 a 2011, e a frequência de desovas do pirarucu.

O mês de março (pico das chuvas no estado) foi o que apresentou a maior ocorrência de desovas em cativeiro. O período de fevereiro a maio foi identificado como a quadra invernososa com mais pluviosidade, com destaque para ano de 2009, com precipitações mais intensas.

3.2 Alevinagem

3.2.1 Introdução

O conceito de alevinagem envolve todas as operações em um sistema de cultivo de peixes desde a eclosão dos ovos, o consequente desenvolvimento destes, culminando na formação de indivíduos (os alevinos) capazes de se desenvolver em regime de cultivo aquícola. O processo de alevinagem é finalizado geralmente quando o indivíduo passa a se alimentar de ração comercial sem a necessidade de cuidados parentais.

A alevinagem é um ponto de acentuado interesse para o desenvolvimento de pesquisas na cadeia produtiva do pirarucu. Neste sentido a qualidade de água bem como nutrição, treinamento alimentar e proteção parental são aspectos determinantes para o sistema de alevinagem do pirarucu.

Imbiriba (2001) e Ono (2008) obtiveram sucesso no treinamento alimentar de pirarucus utilizando diferentes tipos de alimentos, porém a grande maioria destas pesquisas

foram desenvolvidas na região Norte do Brasil. No estudo empreendido verificou-se a eficiência de três regimes de transição alimentar sob condições limnológicas do Nordeste brasileiro.

3.2.2 Objetivo

O objetivo do estudo relatado a seguir foi o de verificar a resposta de alevinos de pirarucu à transição gradual de alimento vivo para ração comercial em pó, ou seja, verificar a eficiência do treinamento alimentar de pirarucus.

3.2.2.1 Objetivos específicos

Comparar metodologias de alevinagem de pirarucu em regime de transição gradual de ração, utilizando três tipos de alimentos vivos: a) copépodos coletados em canal de açude; b) *Artêmias sp*; e, c) sem alimentos ofertado, somente com cuidado parental no viveiro de reprodução.

3.2.3 Metodologia

A primeira metodologia utilizou a captura de alimento vivo (zooplâncton) com o fornecimento de copépodos coletados em ambiente natural, um canal proveniente de açude. A captura do zooplâncton, constituído de copépodos, foi realizada com rede-de-arrasto de abertura fixa (de 100cm x 50cm) e panagem (60 micra) (Figura 31).

Figura 31– Rede de coleta de zooplâncton armada em canal de irrigação que percorre parte da área do CPA/DNOCS.



Fonte: Carlos Riedel. A rede operava sob constante vigilância para uma eventual retirada de fragmentos e de pequenos animais.

Durante a operação para captura de copépodos a rede-de-arrasto era disposta em uma seção do canal de irrigação, alimentado pelo açude Pereira de Miranda, em Pentecoste-CE, em área do CPA/DNOCS.

O canal possuía vazão média de 1.100 l/s. Três vezes ao dia, nos turnos da manhã, tarde e noite, a rede era armada e posteriormente recolhida, para a coleta do zooplâncton. Após a coleta, o material era transportado ao laboratório para a retirada de amostra e consequente observação em microscópio (ampliação de 100x), com vistas a identificação da espécie dominante do zooplâncton (figura 32).

Figura 32 – Copépodo visualizado em lupa ótica no LabGeM do CPA/DNOCS com ampliação de 100x.



Fonte: Carlos Riedel. Os copépodos representaram os zooplâncton com maior dominância dentre os coletados (superior a 98%).

Quando a amostra apresentava dominância acima de 98% era filtrada, pesada e embalada em sacos plásticos, em porções individuais de 50g, e os copépodos eram congelados em *freezer* comum (-20°C) para o início do treinamento alimentar.

O treinamento alimentar tinha início logo após a captura de alevinos, realizado nos viveiros de reprodução situados no *Campus* II do CPA/DNOCS, sendo o transporte imediato destes para a bateria de berçários situados no CPA/DNOCS. Os alevinos eram transferidos em sacos plásticos com capacidade de 20 litros utilizando $\frac{1}{4}$ de seu volume total (figura 33).

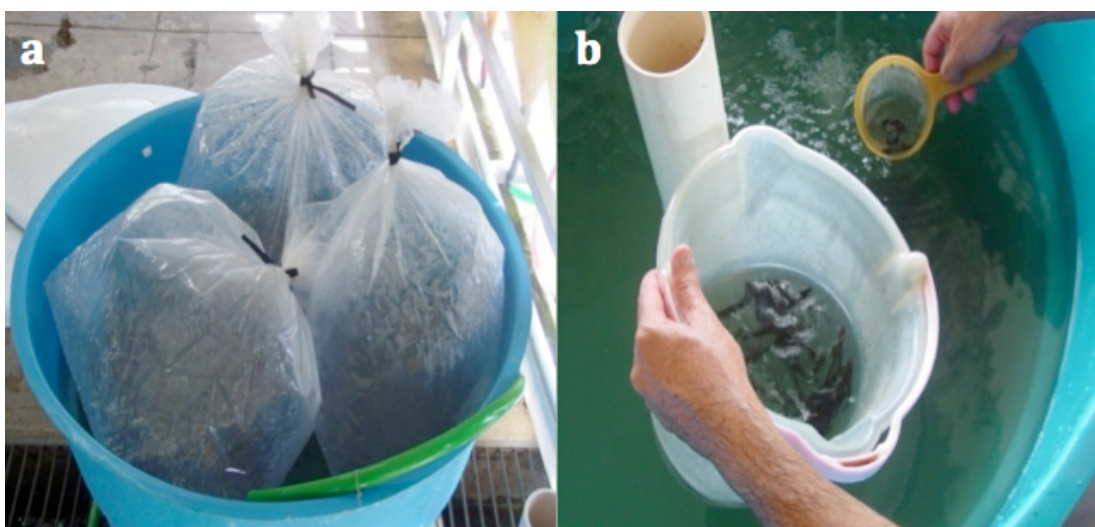
Figura 33 – Alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, capturados em viveiro de reprodução do Campus II do CPA/DNOCS transportados em sacos plásticos para o treinamento alimentar.



Fonte: Carlos Riedel.

Os sacos plásticos contendo os alevinos eram postos em imersão no berçário para adaptação de temperatura. Após 15 minutos de aclimação, os alevinos eram transferidos para um recipiente plástico e em seguida pesados (figura 34).

Figura 34 – (a) Adaptação térmica de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, em banho de imersão na incubadora. (b) contagem de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, em incubadora com sistema de auto sinfonamento.



Fonte: Carlos Riedel.

Os treinamentos alimentares foram realizados em bateria de dez incubadoras, com formato circular, composição de fibra e volume útil de 250L cada, especialmente adaptadas com sistema de renovação de água (50L/h) e sifonamento. Um total de quinhentos alevinos de pirarucu, com comprimento total de $4,5\pm 0,1$ cm e peso de $1,3\pm 0,1$ g, foram homogeneamente distribuídos em dez incubadoras (duzentos e cinquenta por tratamento), com cinco repetições para cada tratamento.

O alimento vivo fornecido aos alevinos nos tanques berçário era composto por zooplâncton, coletado em ambiente natural + ração (tratamento I), e *Artemia sp* congelada + ração (tratamento II). Não foi oferecida ração no controle (tratamento III) em que os alevinos tiveram cuidado parental.

O alimento era ofertado aos alevinos até a saciedade, oito vezes ao dia (00.00h, 3.00h, 6.00h, 9.00h, 12.00h, 15.00h, 18.00h e 21.00h), para ambos os tratamentos, até a terceira semana. Nas semanas subsequentes, o alimento foi ofertado cinco vezes ao dia (6.00h, 10.00h, 14.00h, 18.00h e 22.00h) até a saciedade. Para o tratamento III não foi ofertado alimento.

Na primeira semana do tratamento os alevinos foram alimentados exclusivamente com zooplâncton (coletado e cultivado). A partir da segunda semana, foi adicionada, proporcionalmente ao zooplâncton, uma porcentagem de ração comercial seca (ração em pó para carnívoros) (tabela 9).

Tabela 9 – Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, em regime de transição gradual de zooplâncton para ração comercial seca, no *Campus II* do CPA/DNOCS.

Período	Tratamento		
	I	II	III
	Copépodos + ração	<i>Artemia sp</i> + ração	Cuidado parental
1ª Semana	100% + 0%	100% + 0%	-
2ª Semana	70% + 30%	70% + 30%	-
3ª Semana	50% + 50%	50% + 50%	-
4ª Semana	30% + 70%	30% + 70%	-
5ª Semana	10% + 90%	10% + 90%	-
6ª Semana	0% + 100%	0% + 100%	-

O treinamento alimentar foi concluído quando os alevinos de ambos os tratamentos (I e II) atingiram comprimento e peso médio respectivos de $11\pm 0,2$ cm e $18\pm 0,3$ g, ocasião em que se alimentavam exclusivamente de ração comercial seca.

No tratamento III os alevinos foram deixados nos viveiros de reprodução sob cuidado parental até serem coletados, ao fim dos tratamentos I e II.

Depois de concluído o treinamento alimentar, os exemplares dos três tratamentos foram cuidadosamente observados por uma semana a fim de quantificar os espécimes que aceitavam a ração comercial (percentual de comedores). A sobrevivência ($100 \times n^\circ$ de peixes finais/ n° de peixes iniciais) foi estimada para os tratamentos I e II.

Sete parâmetros físico-químicos da água foram monitorados para os três tratamentos com uso de sonda multiparamétrica YSI-6600: oxigênio dissolvido (mg/L), TSD (g/L), clorofila ($\mu\text{g/L}$), pH, amônia (NH_4^+) (mg/L), condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}^2$) e temperatura ($^\circ\text{C}$).

3.2.4 Resultados

A rede de arrasto utilizada na captura de zooplâncton teve rendimento satisfatório, comprovada pela produção de $1 \pm 0,1$ kg/h. As maiores capturas de zooplâncton foram realizadas no período noturno e início da manhã. As capturas médias de zooplâncton encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 – Capturas médias de zooplâncton em rede de arrasto no canal do CPA/DNOCS.

Período	Captura média (g)
Manhã (7.00h)	1872 \pm 2
Tarde (14.00h)	167 \pm 4
Noite (21.00h)	960 \pm 2

Os alevinos submetidos aos tratamentos alimentares I e II foram adaptados ao consumo de ração comercial seca em pó após um período de seis semanas, apresentando comprimento e peso médio respectivos de $11 \pm 0,2$ cm e $18 \pm 0,3$ g para o tratamento I e $17 \pm 0,6$ g e $11 \pm 0,4$ g para o tratamento II. Os exemplares do tratamento III (cuidado parental) apresentaram comprimento médio de 16 ± 2 cm e peso médio de 26 ± 1 g (tabela 11).

Tabela 11 – Peso e comprimento médio final de exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*, submetidos a tratamentos alimentares em incubadoras e viveiros do CPA/DNOCS.

	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
Peso médio final (g)	18±0,3g	17±0,6g	26±1g
Comprimento médio final (cm)	11±0,2cm	11±0,4g	16±2cm

Diferenças marcantes de comprimento e peso em todos os tratamentos foram verificadas, havendo a formação de grupos dominantes (figura 35).

Figura 35 – Exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*, pertencentes a uma mesma desova.



Fonte: Carlos Riedel. Caso exemplares de diferentes tamanhos não sejam separados é grande a probabilidade de mortalidade do espécime com menor comprimento em virtude de comportamento dominante, conforme foi constatado no CPA/DNOCS.

Os parâmetros físico-químicos de qualidade da água não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos I e II, nem variações letais ou estressantes que afetassem o desempenho dos peixes. No tratamento III houve diferenças significativas nas médias da condutividade elétrica, amônia e clorofila (tabela 12).

Tabela 12 – Médias de parâmetros de qualidade de água para os três tratamentos em treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, com zooplâncton cultivado e coletado no *Campus II* do CPA/DNOCS.

Parâmetro	Tratamento		
	Copépodo	<i>Artemia sp</i>	Viveiro reprodutores
Temperatura (°C)	27,2±0,3 ^a	27,2±0,2 ^a	28,1±0,1 ^a
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,4±0,3 ^a	6,2±0,1 ^a	5,8±0,2 ^a
Clorofila (µg/L)	22±0,2 ^a	22±0,2 ^a	92±0,2 ^{a,b}
pH	8,0±0,2 ^a	7,9±0,2 ^a	8,2±0,2 ^a
Condutividade elétrica (µS/cm ²)	520±0,4 ^a	519±0,4 ^a	1622±0,2 ^{a,b}
Amônia (NH ₄ ⁺) (mg/L)	0,001±0,2 ^a	0,001±0,1 ^a	0,02±0,1 ^{a,b}
TSD (g/L)	0,28±0,3 ^a	0,26±0,3 ^a	0,27±0,2 ^a

Nota: (*) Médias sinalizadas com mesma letra não diferem entre si conforme teste t de *Student*.

Os alevinos em situação de pós-treinamento pertencentes aos tratamentos I e II, mostraram maior aceitação de ração, sobretudo quando comparados com o tratamento III (com proteção parental). A sobrevivência somente pôde ser calculada para os tratamentos I e II (Tabela 13).

Tabela 13 – Tratamento alimentar, sobrevivência e percentual de consumidores de ração de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, no *Campus II* do CPA/DNOCS.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Consumidores de ração
Copépodos	99,6±0,2 ^a	99±0,2 ^a
<i>Artemia sp</i>	98,6±0,3 ^a	99±0,3 ^a
Cuidado parental	-	10±0,2 ^b

Nota: Médias sinalizadas com mesma letra não diferem entre si conforme teste t de *Student*.

3.2.5 Discussão

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água registrados nos treinamentos alimentares de pirarucu no CPA/DNOCS em incubadoras, assim como os exemplares deixados sob proteção parental em viveiros, se apresentaram dentro dos limites desejáveis para atividades de piscicultura preconizados por Boyd (1990).

Para os tratamentos I e II não houve diferenças significativas nos parâmetros de qualidade de água, enquanto no tratamento III foram encontradas diferenças entre os níveis de condutividade elétrica, amônia e clorofila. Isto se deu, possivelmente, por se tratar de água de viveiro, sem sistema de filtragem, com baixa reposição e produtividade primária elevada.

A rede de zooplâncton armada no canal de abastecimento do CPA/DNOCS teve rendimento aceitável, fornecendo zooplâncton em quantidade suficiente para os tratamentos I e II. As maiores capturas de zooplâncton foram realizadas no início da manhã (5.00h às 8.00h) e no período noturno (18.00h às 5.00h); isto se deu, possivelmente, em virtude da dinâmica de migrações do fitoplâncton e zooplâncton no açude que abastece o referido canal.

Apesar de ser uma boa fonte de captura de alimento vivo, o sistema de rede de coleta em canal pode ser considerado desvantajoso, sobretudo no sentido da irregularidade de produção, estando a produção ligada diretamente à vazão do canal, que é afeta por precipitações pluviiais. Além disso, esse sistema não garante o fornecimento regular da mesma espécie de zooplâncton, o que pode acarretar em diferenças no crescimento dos exemplares de alevinos de pirarucu e mesmo rejeição, conforme observações realizadas do comportamento alimentar.

Neste sentido, o cultivo de alimentos vivos surge como uma alternativa de suprir essa etapa de transição alimentar. As artêmias são micro crustáceos comumente utilizadas como fonte energética para os mais variados organismos aquáticos em suas fases iniciais de vida, especialmente em espécies carnívoras. Cavero (2003) utilizou náuplios de artêmias em treinamento alimentar de alevinos de pirarucu obtendo índices de sobrevivência acima de 99%. O fornecimento de *Artemia sp* no CPA/DNOCS supriu a demanda dos experimentos.

Os alevinos de pirarucu submetidos a treinamento alimentar no CPA/DNOCS apresentaram diferenças marcantes em alguns parâmetros limnológicos, quando comparados com Cavero *et al.* (2003), na Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPA), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), que realizou treinamento alimentar na obtendo: pH (6,1), condutividade elétrica (33,9 μ S/cm²) e amônia (0,003 mg/L), isto mostrou uma faixa de tolerância para os alevinos de pirarucu, podendo ser treinando a consumir ração comercial em águas ácidas ou alcalinas.

Soares *et al.* (2007) afirmaram que o treinamento alimentar é uma técnica eficiente e com resultados bastante promissores para muitas espécies carnívoras, tais como: *Oncorhynchus maximus*, *Pseudoplatystoma coruscans*, e o próprio *Arapaima gigas*.

Cavero *et al.* (2003), Escorvo-Filho *et al.* (2004), Crescêncio *et al.* (2005) e Queiroz (2009) utilizaram metodologias de treinamento alimentar em alevinos de pirarucu baseadas na transição gradual para ração seca comercial, empregando inicialmente zooplâncton ou *Artemia sp* e obtiveram índices de sobrevivência acima de 95%.

Os alevinos de pirarucu submetidos a tratamento alimentar no CPA/DNOCS com copépodos e *Artemia sp* tiveram índices de sobrevivência na ordem de 99%. Isto demonstra a importância da utilização de zooplâncton para o regime de transição gradual de ração.

Apesar do pirarucu possuir caráter ictiófago, os alevinos dessa espécie apresentam excelentes taxas de sobrevivência, em consequência de não praticarem canibalismo e se adaptarem às condições de cativeiro (IMBIRIBA, 2001). Embora neste estudo não tenha sido observado canibalismo, um exemplar de pirarucu alimentou-se, por acidente, de uma tilápia com 1/3 de seu tamanho, levando-o a morte. Tal fato reforça a necessidade de controle das instalações de cultivo sobretudo nos sistemas de filtragem e isolamento de berçários.

Os exemplares deixados sob cuidado parental (tratamento III) apresentaram comprimento e peso maiores que os exemplares dos tratamentos I e II, porém, não se adaptaram ao consumo de ração comercial no término do período de arraçoamento.

Apesar da impossibilidade de estimar precisamente a mortalidade dos alevinos sob cuidado parental, devido a grande área do viveiro, constantemente eram observadas ações de predadores, principalmente pássaros, que provavelmente tenha diminuído o número de exemplares de alevinos em virtude do pirarucu não apresentar defesas contra este tipo de ação (salvo o mimetismo da natação dos alevinos nas proximidades da cabeça dos pais).

3.2.6 Conclusões

O treinamento alimentar de pirarucus, realizado em tanques-incubadoras (tratamentos I e II) com fornecimento de zooplâncton, requer mais cuidados operacionais do que o tratamento III em que não foi ofertado alimento e os alevinos ficaram sob cuidado parental. As chances dos animais sofrerem predação nesses tanques são mínimas, o que conseqüentemente resulta em altos níveis de sobrevivência, enquanto que os exemplares deixados sob cuidado parental lidam com a predação de diferentes agentes (diversas espécies de aves e peixes invasores).

Os espécimes sob cuidado parental do tratamento III apresentaram maiores comprimentos e pesos médios ao fim do tratamento, entretanto não aceitaram a ração seca como alimento. Os espécimes oriundos de uma mesma desova que apresentam diferenças marcantes em comprimento e peso durante o treinamento alimentar devem ser separados para evitar atrasos no crescimento, emagrecimento, canibalismo e conseqüente mortalidade.

O uso de zooplâncton no treinamento alimentar é crítico na criação de pirarucus, devendo ser constantemente monitoradas a qualidade de água, e também a qualidade da ração e do número de vezes do trato alimentar.

3.3 Uso de marcas eletrônicas

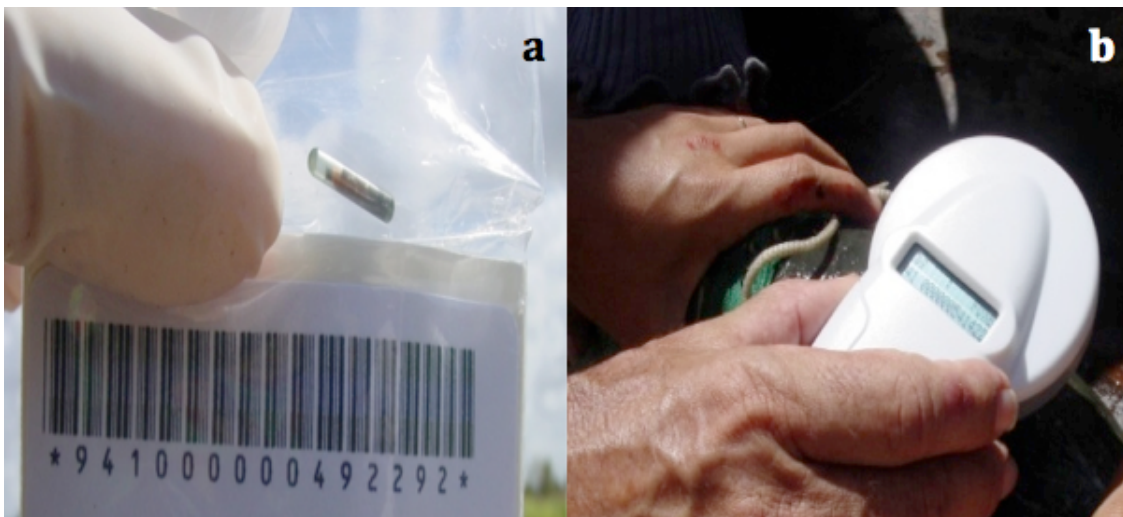
3.3.1 Introdução

Marcas em animais são amplamente utilizadas em unidades de produção agropecuárias e instituições de pesquisas, com a finalidade de identificação individual ou coletiva de espécimes para estudos de avaliação de dinâmica populacional, bem como acompanhamento de desempenho de animais terrestres e aquáticos.

A utilização de marcas é também importante em estudos de melhoramento genético. Atualmente existe uma grande variedade de marcas disponíveis que podem ser classificadas como: internas, externas, químicas, genéticas e eletrônicas. Estas últimas, também conhecidas com “*transponders*”, são capazes de fornecer milhares de códigos de identificação, produzindo informações únicas (HAMMER e BLANKENSHIP, 2001).

As marcas eletrônicas possuem dimensões e volumes pequenos e geralmente não são rejeitadas pelo organismo do animal na qual foi implantada. Este tipo de marca é constituída por pequenas bobinas que, quando estimuladas por um campo magnético geram um sinal que é detectado por uma unidade de leitura (figura 36).

Figura 36 – (a) *Transponder* eletrônico para identificação de exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*. (b) unidade de leitura em operação nos estudos desenvolvidos no CPA/DNOCS.



Fonte: Carlos Riedel.

A unidade leitora além de gerar um campo magnético para acionamento da marca eletrônica indica, através de um visor, as informações referentes à marca implantada (geralmente uma sequência única de números). A distância de detecção do sinal está diretamente ligada à intensidade do campo magnético gerado pela unidade leitora, podendo variar de um centímetro a centenas de metros (HILL *et al.*, 2005).

A utilização de marcas eletrônicas no acompanhamento do desempenho individual de reprodutores de peixes cultivados vem crescendo. Assim, dados de crescimento, peso, número de desovas, características comportamentais, bem como evolução de caracteres morfológicos e merísticos podem ser seguramente acompanhados. Esses parâmetros são de vital importância para o manejo, bem como na elaboração de programas de melhoramento genético (HAMMER e BLANKENSHIP, 2001).

Neste segmento do segundo capítulo é descrito um protocolo para a instalação de marcas eletrônicas em pirarucus, bem como sua aplicabilidade em situações de rotina e emergenciais inerentes ao manejo do plantel de reprodutores do CPA/DNOCS.

3.2.2 Objetivo

O objetivo deste estudo foi realizar a implantação de marcas eletrônicas em exemplares adultos de pirarucu, *Arapaima gigas*, pertencentes ao plantel do CPA/DNOCS para observação de características morfométricas, merísticas e aspectos do comportamento reprodutivo.

3.2.3 Material e métodos

3.2.3.1 Equipamentos

Neste experimento foram utilizados os seguintes equipamentos: *kit* de marcas eletrônicas do fabricante IDCHIP, incluindo seringa, agulha injetora, e unidade de leitura; máquina de fotografia digital SONY-modelo DSC-S85 Cyber-Shot de 4.1 *Mega Pixels*, balança eletrônica digital TOLEDO® com capacidade máxima de 150kg e 50g de precisão.

Todas as marcas eletrônicas e seringas foram previamente esterilizadas a frio em câmara de fluxo laminar, sob ação de radiação ultravioleta, durante um período de vinte minutos, e as agulhas injetoras foram imersas em solução de álcool 70%.

3.2.3.2 Introdução de marcas eletrônicas em juvenis pré-reprodutores

Em janeiro de 2007, foram selecionados dos viveiros do *Campus II* do CPA/DNOCS cinquenta e seis juvenis pré-reprodutores (exemplares que não haviam atingido a primeira maturação sexual). Os peixes tinham peso e comprimento médio de, respectivamente, $45\pm 3\text{kg}$ e $169\pm 20\text{cm}$. Estes juvenis foram mantidos em dois viveiros de 5.000m^2 alimentados com ração comercial e peixes vivos.

Antes da introdução das marcas eletrônicas os pirarucus foram transportados individualmente em macas (figura 37) até uma estação de trabalho móvel adaptada no talude central do viveiro para a realização dos procedimentos.

Figura 37 – Exemplar de pré-reprodutor de pirarucu, *Arapaima gigas*, em maca de transporte.



Fonte: Carlos Riedel. A maca de transporte suporta exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*, com peso de até 100 kg, situação em que deve ser mobilizados seis homens para suporte.

Para a introdução da marca eletrônica na cavidade corporal de cada exemplar foi inicialmente investigada uma posição de inserção. A região subcutânea posterior à quinta escama lombar pós-crânio foi escolhida, após prévios estudos, como ideal para receber a marca devido a facilidade de manejo do animal (figura 38).

Figura 38 – (a) alicate adaptado com luva de borracha estéril para extração de escama de pirarucu, *Arapaima gigas*, indicando posição de extração (quinta escama lombar pós-crânio). (b) detalhe da escama extraída onde se encontra inserida, em posição subcutânea, a marca eletrônica.



Fonte: Carlos Riedel.

Para a introdução da marca eletrônica em cada exemplar de pirarucu foi necessário a prévia extração de uma escama para facilitar a penetração subcutânea da agulha injetora. Neste procedimento foi utilizado um alicate envolvido com luva de borracha estéril, possibilitando desta forma que a agulha injetora posicionasse o “*tranponder*” na região adequada.

A agulha injetora tinha duas funções: a primeira, perfurar o tecido até o local de inserção da marca; a segunda, introduzir a marca eletrônica, acionada por um êmbolo, no corpo do espécime. Para prevenir infecções era aplicada, em cada indivíduo, solução de iodo a 2% e sal puro (NaCl 100%) na lesão ocasionada pela extração das escamas.

Em seguida, os reprodutores foram medidos, pesados em balança digital TOLEDO® especialmente adaptada (Figura 39) e foto-registrados em máquina digital SONY®, com posição padronizada lateral à esquerda, de forma a poder visualizar o comprimento total do espécime.

Figura 39 – Maca com reproduutor de pirarucu, *Arapaima gigas*, durante pesagem em balança digital.



Fonte: Carlos Riedel. Pode-se observar a ampliação da base de pesagem – permitindo deitar todo o corpo do peixe para pesagem, a maca de transporte(imobilizando temporariamente o espécime) e a balança digital.

Cada suposto casal, separado com base no padrão de posicionamento de coloração das escamas, ou com base em laparoscopia ou ultrassom (técnicas descritas no Capítulo 2), foi abrigado em um viveiro de 350m², totalizando quarenta “casais” de reprodutores distribuídos em vinte viveiros.

Outros quinze exemplares contendo marcas, e considerados fêmeas, foram distribuídos igualmente em três viveiros de 400m².

Em todos os viveiros contendo os supostos casais foram realizadas observações comportamentais dos reprodutores, sobretudo os aspectos de: natação, brigas, saltos, cópulas, formações de ninhos e alimentação, de janeiro de 2007 a março de 2009.

3.2.3.3 Manejo emergencial: a enchente de 2009

O ano de 2009 apresentou, conforme dados da Fundação Cearense de Meteorologia (FUNCEME), chuvas acima da média histórica registrada para o estado do Ceará. Neste ano, diversos açudes atingiram cota máxima, incluindo o Pereira de Miranda e o General Sampaio, ambos administrados pelo DNOCS. Este último açude pereniza o Rio Curu, de onde é captada a água destinada aos viveiros dos pirarucus do *Campus II* do CPA/DNOCS.

No dia dois de março de 2009, uma forte precipitação pluvial registrada em Pentecoste/CE (248mm)¹⁵, elevou o nível do Rio Curu fazendo com que o canal de drenagem transbordasse devido a entrada de água do rio, inundando toda a área dos viveiros de reprodutores do *Campus* II do CPA/DNOCS (com um nível de água cerca de 1 metro acima da cota do talude dos viveiros).

Para evitar a fuga do plantel de pirarucus do *Campus* II para o rio, a saída do canal de drenagem foi isolada. Com a adoção desta medida emergencial, reprodutores, matrizes e juvenis adultos tiveram seus viveiros encobertos, sendo formado um “lago artificial” com cerca de 12 hectares de lamina d’água. Desta forma, os animais que estavam nos viveiros se misturaram naturalmente.

Após aproximadamente vinte e quatro horas da enchente, quando o rio diminuiu seu nível anormal, foi realizada uma contagem emergencial dos reprodutores, já que estes estavam com marcas eletrônicas implantadas. Um novo levantamento (censo), com duração de duas semanas, com recaptura, foto registro, biometria e relocação dos reprodutores que tinham “*transponders*” implantáveis foi realizado, bem como observações referentes ao comportamento.

¹⁵ Os meses de janeiro e fevereiro já registraram índices de precipitações acima da média histórica, conforme dados da FUNCEME.

3.2.4 Resultados

Foram implantadas marcas eletrônicas em 56 exemplares de pirarucu (adultos em idade de reprodução) com peso e comprimento médio de, respectivamente, 68 ± 2 kg e 183 ± 5 cm. Nenhuma mortalidade foi registrada durante o período do estudo, com exceção de um exemplar que fugiu na ocasião da enchente, antes do isolamento da saída do canal de drenagem, quando em situação emergencial.

Os exemplares de pirarucu não apresentaram rejeição aos “*transponders*” nem sintomas indicativos de doenças (infecções). Não foram detectadas para todos os exemplares, no período do estudo, mudanças expressivas do posicionamento dos “*transponders*”, mantendo-se localizado na proximidade da quinta escama lombar. Os “*transponders*” mantiveram-se operacionais por todo o período de estudo.

A inundação acidental dos viveiros do *Campus II* do CPA/DNOCS possibilitou que os exemplares de pirarucus pudessem explorar novas áreas, dentro dos limites dos viveiros (tabela 14). Após a inundação, seis fêmeas (21,4%) se separaram de seus parceiros, enquanto que cinco machos (17,8%) também perderam suas parceiras.

Um total de 60,8% dos reprodutores permaneceram como supostos casais. Cerca de vinte e quatro por cento (24,1%) dos exemplares apresentaram mudança de parceiro. Foi observado o estabelecimento de ninhos e uma nova desova em um dos viveiros com um novo casal. Após esse evento, a prática de troca de casais como indutor de desova tornou-se rotineira no CPA/DNOCS.

Tabela 14 – Dinâmica migratória dos reprodutores de pirarucu, *Arapaima gigas*, nos viveiros do CPA/DNOCS após enchente.

Viveiro	Configuração inicial		Configuração Após Enchente	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
1	492173	273099	293309	56880
2	270282	294424	491128	294424
3	492292	289013	491128	193367
4	289193	247732	270282	294424
5	293309	513053	274543	265034
6	501476	248701	492173	273099
7	520797	282265	492075	
8	491128	391168	296372	290934
9	526424	528383	492292	289013
10	510735	534184	270282	301131
11	505778	523276		302081
12	493430	516814	492173	273099
13	492075	508579	510735	508579
14	256201	301131	505778	523276
15	267336	302081	289193	247732
16	265928	56880	501476	248701
17	84568	292839	84568	292839
18	274543	265034	493430	516814
19	301227	265773	501476	534184
20	296372	290934	520797	282265
21	492173	273099	520797	282265
22	270282	294424	256201	391168
23	492292	289013	526424	528383
24	289193	247732	267336	513053
25	293309	513053	265928	
26	501476	248701	293309	
27	520797	282265	289193	
			301227	
28	491128	193367		247732
				513053
				248701
				265773
				289013

* **Legenda:** Cinza- Reprodutores que migraram de viveiro e perderam sua configuração original após enchente. Azul escuro - Casais originais que migraram de viveiros após enchente. Lilás- Casais e/ou espécimes que permaneceram em seus viveiros originais. Azul claro – Migração e formação de novos casais

3.2.5 Discussão

As marcas eletrônicas utilizadas nos reprodutores de pirarucu do CPA/DNOCS foram implantadas na cavidade corporal superior de forma intramuscular e não sofreram interferência de leitura em razão dos diferentes tipos de tecido (escamas, epiderme e músculo). Holm *et al.* (2006) mostraram não haver diferença significativamente estatística entre a distância de leitura de marcas eletrônicas implantadas em diferentes tecidos de peixes.

Além disso, após o período de estudo, não foi verificada nenhuma lesão nos pirarucus marcados. Este resultado está de acordo com Caro *et al.* (2003) que preconizaram que a região selecionada para a implantação de uma marca deve ser de fácil acesso para a leitura, proporcionar mínima migração, não lesionar tecidos e minimizar quaisquer incômodo ou possibilidade infecção para o espécime de peixe.

O principal critério adotado para a inserção da marca eletrônica no local especificado em exemplares adultos de pirarucu foi a facilidade operacional de manejo. A posição adotada do implante na região pós-crânio a altura da quinta escama minimizou riscos de acidentes durante o manejo. Em qualquer outra região (lateral, ventral e caudal) as chances de injúrias no operador são elevadas. Apesar do critério adotado outras posições de inserção podem ser adotadas, Hackbarth *et al.* (2007) utilizaram *chips* eletrônicos na região do dorso em posição subcutânea, próximo à nadadeira dorsal em exemplares de pacu (*Piaractusmesopotamicus*).

Apesar dos riscos sobretudo no processo de implantação, a marcação interna que foi utilizada nos pirarucus deste estudo, é considerada mais segura do que a externa, já que esta permanece no local de implante por longos períodos de tempo e a possibilidade de serem expelidas é mínima. (Harvey e Carolsfeld, 1993).

Barrero (2007) afirma que os marcadores eletrônicos são mais utilizados e recomendados apesar de apresentar um custo elevado, o que muitas vezes limita sua viabilidade na utilização por grande parte dos produtores.

O uso de marcas eletrônicas semelhantes as utilizadas nos pirarucus deste estudo tem auxiliado pesquisadores a acompanhar aspectos comportamentais bem como zootécnicos de diversas espécies cultiváveis. Oliveira *et al.* (2010) fizeram o uso de marcas eletrônicas para identificação de exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em estudo de melhoramento genético avaliando 3.417 animais da linhagem *GIFT*, pertencentes ao “Programa de Melhoramento Genético da Universidade Estadual de Maringá”, no Paraná.

Barrero (2007) empregou com sucesso marcadores eletrônicos em reprodutores de *Bryconorbignyanuse* Robalo-Flecha, *Centropomusundecimalis* no acompanhamento dos aspectos reprodutivos.

As marcas eletrônicas também são úteis em estudos de dinâmica populacional de peixes, sendo auxiliares insofismáveis para o entendimento de rotas migratórias. Os sistemas são capazes de detectar exemplares marcados a grandes distâncias utilizando radio-telemetria no monitoramento (TRAVADE *et al.* 1989). Ribeiro *et al* (2007) utilizaram marcas eletrônicas objetivando propor um modelo de populações de peixes migradoras através do repovoamento de bacias hidrográficas impactadas, utilizando-se como espécie-modelo o pacu (*Piaractusmesopotamicus*).

As marcas eletrônicas fornecem informação única e são geralmente detectadas a distâncias variadas. Holland *et al* (2001) utilizaram marcas desenvolvidas para o rastreamento de peixes, ativadas remotamente por distâncias de até alguns quilômetros; tais marcas objetivaram estudos de espécies migratórias em rotas de águas continentais ao oceano. O *transponder* eletrônico utilizado para identificação de exemplares de pirarucu do CPA/DNOCS possuía ativação via campo magnético emitido por leitor; com raio de detecção extremamente curto, apresentando distância máxima do leitor de 5 cm. Desta forma, a única possibilidade de detecção de sinal do *transponder* era por meio da captura, imobilização em maca e transporte dos espécimes para uma estação móvel de biometria onde era realizada a leitura.

De acordo com Turra *et al.* (2010), apesar das vantagens das marcas eletrônicas, estas ainda são caras, sendo seu uso limitado às instituições de pesquisas e a alguns produtores que as utilizam em plantéis de reprodutores permanecendo ainda em grande maioria a utilização de marcas externas, mais simples e baratas.

Apesar da praticidade e custo relativamente barato, até o momento de finalização desta Tese, não foram encontrados trabalhos na região Nordeste do Brasil que utilizassem marcas eletrônicas em exemplares de pirarucu. Desta forma, este foi provavelmente o primeiro estudo no Nordeste brasileiro com esse tipo de tecnologia de marcas eletrônicas em pirarucus.

A enchente ocorrida nos viveiros do CPA/DNOCS teve como consequência uma nova dinâmica de distribuição dos exemplares de pirarucus que haviam sido separados em quarenta “casais” de reprodutores distribuídos em vinte viveiros. De tal forma que, após baixar o nível de água dos viveiros ocorreu a formação de 21,4% de novos casais.

Como foi observado, o estabelecimento de ninhos e uma nova desova em um dos viveiros com um novo casal, a prática de troca de casais como indutor de desova tornou-se rotineira no CPA/DNOCS. Este resultado se mostrou contrário ao obtido por Montero (2005),

que afirmou que no comportamento reprodutivo de *Arapaima gigas* há obrigatoriamente na formação de casais monogâmicos.

Estudos recentes com marcadores moleculares utilizados para analisar desovas de pirarucu em ambiente natural apontam para uma possível múltipla paternidade na fecundação de um único ninho (Informação verbal)¹⁶. Esta estratégia comportamental sugere a não fidelização de exemplares de pirarucu.

3.2.6 Conclusões

As marcas eletrônicas mostraram ser de grande utilidade no manejo de reprodutores de pirarucus em viveiros, sobretudo na identificação individual de espécimes, o que possibilitou acompanhamento do comportamento reprodutivo e de distribuição dos animais.

Para todos os espécimes deste estudo, as marcas eletrônicas não apresentaram rejeição, infecção fatal ou migração intramuscular expressiva durante o período estudado.

O uso de marcas eletrônicas em reprodutores do CPA/DNOCS revelou, até o limite de nosso conhecimento, dados comportamentais e reprodutivos inéditos para pirarucu, devido a enchente que viabilizou a possibilidade de uma nova distribuição dos animais previamente separados em supostos casais.

As rotas de movimentações e consequentes formações de novos casais ocorridas durante a inundação acidental dos viveiros de reprodutores do CPA/DNOCS sugere não haver fidelidade na formação de casais de pirarucu.

¹⁶ Informação fornecida por Juliana Alencar Araripe, no XVII Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, realizado em Belém-PA, em novembro de 2011.

3.4 Uso de anestésicos em pirarucu

3.4.1 Introdução

O pirarucu apresenta um conjunto de características anatômicas e fisiológicas peculiares que o distingue da maioria dos peixes cultivados em águas interiores. Os reprodutores de pirarucu são animais grandes e pesados, porém com boa velocidade de impulso, características que dificultam o manejo e põe sob risco de fortes lesões as pessoas que lidam diretamente no manejo reprodutivo. Relatos de funcionários do CPA/DNOCS descreveram acidentes durante a manipulação de pirarucus ocorridos nestas instalações. Desta forma, o desenvolvimento de protocolos de anestesia são de fundamental importância no uso de atividades rotineiras do manejo reprodutivo.

O uso de anestésicos em procedimentos de manipulação de alevinos de diversas espécies de peixes é bastante amplo na aquicultura, principalmente no que tange às atividades rotineiras, a saber: transportes de alevinos e reprodutores, biometrias, propagações artificiais (extrusão de gametas), implantação de marcas, pequenas cirurgias, além de outras manipulações (VIDAL *et al.* 2006).

Anestésicos são fármacos de origem natural ou sintética que proporcionam ausência ou alívio da dor, reduzindo o metabolismo por ação bloqueadora dos sinais do centro de percepção da mesma (CRAIG, 2003). Estas substâncias são frequentemente usadas na aquicultura objetivando minimizar o estresse do manejo operacional, prevenindo assim impactos negativos sobre o desempenho dos peixes (ROSS e ROSS, 2008).

Um anestésico ideal para peixes deve reunir as seguintes características: a) permitam duração razoável de exposição; b) não apresentem toxicidade; c) produzam anestesia em tempo inferior a 3 minutos; d) não apresentem problemas de segurança para mamíferos; e) deixem pouco ou nenhum resíduo após período de depuração e possuam custo acessível (ROSS e ROSS, 2008).

O efeito das substâncias anestésicas varia de acordo com o tamanho e a espécie de peixe. Exemplares com tamanho, idade e sexo diferentes podem geralmente responder de forma diferenciada a uma determinada concentração específica, estas respostas podem ser influenciadas por fatores ambientais, tais como: temperatura, pH, salinidade, e nível de oxigênio dissolvido na água (PARK *et al.*, 2008; ZAHL *et al.*, 2009).

Para a maioria dos teleósteos, as brânquias figuram como entrada e secreção de anestésicos, estes geralmente ministrados em banhos de imersão, com acesso ao sistema

circulatório do animal através das brânquias e pele. O anestésico deve ser preferencialmente solúvel em água; para isso, alguns anestésicos necessitam primeiramente ser dissolvidos em um solvente orgânico, visando reduzir seu caráter hidrofóbico aumentando, conseqüentemente, sua solubilidade (SUMMERFELT e SMITH, 1990). A maioria dos peixes apresenta respostas comportamentais em virtude dos efeitos fisiológicos dos anestésicos, estas respostas fisiológicas podem ser classificadas em seis estágios (tabela 15), de acordo com (ROSS e ROSS, 2008).

Tabela 15 - Estágios de anestesia em peixes (*)

Estágio	Descrição	Resposta comportamental em peixes
0	Normal	Reativos a estímulos externos; batimentos operculares normais; reação muscular normal.
1	Sedação leve	Reativos a estímulos externos; movimentos reduzidos, batimentos operculares mais lentos; equilíbrio normal.
2	Sedação profunda	Perda total da reatividade aos estímulos externos, exceto forte pressão; leve queda do movimento opercular; equilíbrio normal.
3	Narcolepsia	Perda parcial do tônus muscular; natação errática, aumento dos movimentos operculares; reativos apenas a forte estímulo tátil ou vibração.
4	Anestesia profunda	Perda total de tônus muscular; perda total de equilíbrio; batimento opercular lento, porém regular.
5	Anestesia cirúrgica	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo; movimentos operculares lentos e irregulares; batimentos cardíacos lentos; perda total de todos os reflexos.
6	Colapso medular	Parada da ventilação; parada cardíaca; morte eventual.

Nota: (*) Modificado de ROSS e ROSS (2008)

O pirarucu é um peixe de respiração aérea obrigatória, desta forma o uso de anestésicos com o animal em situação de imersão pode ocasionar sua morte por afogamento, já que este perde o reflexo respiratório, fato observado em estudos prévios realizados no CPA/DNOCS. Por esta razão, o objetivo pretendido foi desenvolver e testar técnicas de anestesia inéditas para a maioria dos peixes teleostes.

3.4.2 Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular (LabGeM/CPA/DNOCS) em Pentecoste/CE. Foram utilizados vinte e seis espécimes de pirarucu pertencentes a três classes de comprimento:

Classe I - alevinos ($1\pm 0,2$ g e $4\pm 0,5$ cm),

Classe II - juvenis ($4\pm 0,5$ kg e 80 ± 3 cm) e

Classe III - adultos ($60\text{kg}\pm 3$ e 170 ± 5 cm).

Inicialmente, dois exemplares (um de cada classe de comprimento: I e II) foram sacrificados utilizando choque térmico a frio, em um tanque circular de fibra, com volume máximo 300L em água a zero grau Celsius. Uma vez sacrificados, os exemplares foram dissecados para observação das estruturas anatômicas, assim foi possível localizar anatomicamente os órgãos envolvidos no processo respiratório, sobretudo as vias respiratórias. A dissecação possibilitou ainda, pela visualização de estruturas anatômicas, o desenvolvimento de uma máscara de inalação de anestésico utilizando garrafas *pet*, ligas de borracha e manta plástica atadas a um compartimento no qual era colocado o anestésico junto a uma mangueira fixada a uma bomba com ventilação de ar acionada manualmente (figura 40).

Figura 40 - Máscara anestésica utilizada em alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, onde se pode observar: o corpo da máscara, o envoltório isolador, o compartimento para anestésico e a ventilação forçada de ar.



Fonte: Carlos Riedel.

Os experimentos com uso de anestésicos em pirarucu foram desenvolvidos em três etapas distintas:

Etapas I - Uso de anestésicos em alevinos,

Etapas II - Uso de anestésicos em juvenis e

Etapas III - Uso de anestésicos em adultos.

Após os experimentos, todos os indivíduos foram monitorados durante 24 horas com o objetivo de observar a taxa de sobrevivência.

*3.4.2.1 Etapa I - Uso de anestésicos em alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*.*

Dez alevinos de pirarucu foram retirados aleatoriamente de três incubadoras de treinamento alimentar e então pesados e medidos. Em seguida, foram transferidos para um aquário com capacidade de 200 L com renovação constante de água (4x volume por dia) para aclimatação durante um período de vinte e quatro horas.

Antes de serem anestesiados cada exemplar foi pesado em balança eletrônica marca QUIMIS modelo GM-300P, com capacidade total de 100g e em seguida medidos com auxílio de uma régua de 30cm (Figura 26).

O procedimento de anestesia foi realizado em aquários de 4L de volume útil, contendo 0,5L de água adicionada de solução anestésica (permitindo ao alevino a possibilidade de inalação de ar) com concentração inicial de 10mg/L de mentol.

O tempo de indução a anestesia foi medido com cronômetro digital e as reações comportamentais e estágios de anestesia devidamente anotadas.

*3.4.2.2 Uso de anestésicos em juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.*

Dez juvenis de pirarucu foram retirados de viveiros do *Campus* II e transferidos para um tanque de manejo com capacidade de 2500 L do *Campus* I do CPA/DNOCS, onde permaneceram por um período de 24h sob renovação constante de água e alimentação suspensa. Os juvenis foram medidos e pesados (figura 41) antes de serem anestesiados.

Para o uso do anestésico mentol foi inicialmente preparada uma solução estoque dissolvendo-se 1g de cristal de mentol em 100 mL de etanol absoluto. A partir dessa solução foram testadas concentrações finais de 10, 20, 30 e 40 mg/L diluídas em água, utilizando dois exemplares para cada concentração e dois exemplares para controle negativo.

Figura 41 – Juvenil de pirarucu, *Arapaima gigas*, em balança eletrônica, antes do procedimento de anestesia.



Fonte: Carlos Riedel.

O anestésico foi administrado via aspersão direta nas guelras com uso de borrifador com capacidade volumétrica total de 300mL (figura 42). Os tempos de indução aos estágios de anestesia e recuperação foram aferidos com cronômetro digital. Os espécimes juvenis foram anestesiados sob bancada, fora da água, *Arapaima gigas*.

Figura 42 – Anestesia de juvenil de pirarucu, *Arapaima gigas*, através de aspersão direta nas guelras com solução de mentol.



Fonte: Carlos Riedel.

3.4.2.3 *Uso de anestésicos em adultos de pirarucu*

Foram utilizados seis espécimes adultos medidos e pesados ao início do experimento. Para anestesia de adultos duas substâncias foram testadas: mentol, via aspersão; e, clorofórmio via inalação. A solução estoque foi preparada de forma semelhante à dos juvenis (item 2.5.2.2), a partir dessa solução, concentrações finais de 20, 30 e 40mg/L foram utilizadas conforme descrito anteriormente.

O clorofórmio foi administrado em uma máscara especialmente adaptada para a inalação pelo pirarucu. A máscara (figura 25) era utilizada para promover uma ventilação forçada conduzida por acionamento mecânico (via mangueiras plásticas de 5mm de diâmetro) para as proximidades do respiráculo do animal, na região do palato, onde ocorria a inalação. Este procedimento permitia períodos alternados entre inalação de anestésico e ar atmosférico. Os tempos de indução e recuperação foram aferidos com cronômetro digital.

Não foram testadas concentrações variadas de clorofórmio por este apresentar grande volatilidade, saturando rapidamente o volume de ar utilizado pela máscara de inalação. Foi considerado como dosagem de inalação de clorofórmio a relação volume de ar/volume líquido de clorofórmio ($1.508\text{cm}^3/25\text{mL}$).

3.4.3 *Resultados*

3.4.3.1 *Dissecação do pirarucu, Arapaima gigas*

A dissecação do sistema respiratório dos animais revelou uma discreta abertura na região do palato que se comunica através da traqueia com a bexiga natatória, onde ocorre a troca de gases. Este aspecto foi observado para as três classes de comprimento utilizadas (figura 43).

Esta estrutura anatômica permite ao pirarucu inalar oxigênio atmosférico e exalar gás carbônico metabolizado via brânquias. Tal característica possibilita que exemplares desta espécie possam sobreviver por longos períodos em águas com baixo ou nenhum nível de oxigênio, exclusivamente por sua capacidade de respiração aérea (CHAGAS, 2004).

Assim, a partir das observações anatômicas, foi possível desenvolver um sistema com ventilação forçada para inalação de vapores de clorofórmio utilizado em anestesia de exemplares adultos.

Figura 43 - Região do palato de exemplar de pirarucu, *Arapaima gigas*, na qual se visualiza a musculatura e seta azul indicando o orifício de inalação (respiráculo).

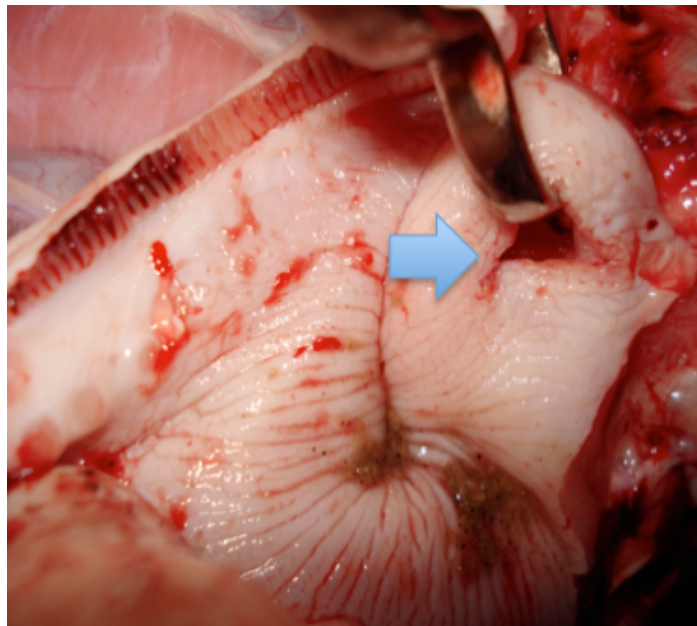


Foto: Carlos Riedel. O respiráculo do pirarucu, *Arapaima gigas*, situado na região do palato, facilita a deglutição de peixes sem que atrapalhe o processo de inalação de ar.

3.4.3.2 Etapa I - Uso de anestésicos em alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*.

Os dez alevinos de pirarucu, com pesos e comprimentos respectivos de $1,0 \pm 0,2$ g e $4,0 \pm 0,5$ cm não se adaptaram ao uso de anestésicos mesmo em concentração mínima de 10mg/L. Os exemplares de pirarucu exibiram comportamento de saltos; natação com velocidade, direção e sentidos descontínuos; respiração arritmica e consequente morte por afogamento. A concentração de 40 mg/L não foi testada em virtude alta letalidade de alevinos nas concentrações anteriores. Os estágios 1, 2, 3, 4 e 5 não foram atingidos ocorrendo letalidade em tempo médio de 0,6 minutos (tabela 16).

Os espécimes mortos, depois de dissecados, revelaram presença de água na bexiga natatória, o que caracterizou morte por afogamento.

Tabela 16 – Tempo de indução anestésica (em minutos) para alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, ($1 \pm 0,2$ g e $4 \pm 0,5$ cm) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.

Concentração de mentol (mg/L)	Estágio de anestesia						Recuperação	Sobrevivência
	1	2	3	4	5	6		
10	*	*	*	*	*	0.8	**	0%
20	*	*	*	*	*	0.5	**	0%
30	*	*	*	*	*	0.5	**	0%
40	-	-	-	-	-	-	-	-

Notas: (*) Estágio não alcançado. (**) Nenhum indivíduo sobreviveu na recuperação.

3.4.3.3 Etapa II - Uso de anestésicos em Juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.

Os dez Juvenis de pirarucu com $4\pm 0,5\text{kg}$ e $80\pm 3\text{cm}$ alcançaram estágios de anestesia para todas as concentrações testadas. A concentração de 10mg/L não foi capaz de induzir juvenis ao estágio cirúrgico (5), levando 8.25 minutos para atingir o estágio 4. As concentrações de 20, 30 e 40mg/L induziram todos os exemplares ao estágio 5 de anestesia.

Nenhuma concentração testada de mentol induziu os juvenis a atingir o estágio 5 em período inferior a 7.6 minutos. O tempo de indução de anestesia mostrou ser inversamente proporcional à concentração de anestésico (tabela 17).

Tabela 17 – Tempo de indução anestésica (em minutos) para juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, ($4\pm 0,5\text{kg}$ e $80\pm 3\text{cm}$) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.

Concentração de mentol (mg/L)	Estágio de anestesia						Recuperação	Sobrevivência
	1	2	3	4	5	6		
10	1.8	*	5.16	8.25	*	*	15.16	100%
20	1.2	*	4.28	*	7.60	*	16.11	100%
30	0.88	1.80	2.66	*	6.22	*	12.14	100%
40	0.55	1.45	*	4.3	5.24	*	13.12	100%

Nota: (*) Estágio não alcançado.

3.4.3.4 Etapa III - Uso de anestésicos em adultos de pirarucu, *Arapaima gigas*.

3.4.3.4.1 Mentol

Os estágios de anestesia 1 e 2 não foram alcançados para nenhuma concentração de mentol. Os exemplares adultos com $60\pm 3\text{kg}$ e $170\pm 5\text{cm}$ apresentaram tempo de recuperação, em todas as concentrações testadas, superior aos juvenis. Os espécimes atingiram os estágios 4 e 5 em todas as concentrações testadas. O tempo para os exemplares adultos atingirem qualquer estágio anestésico foi superior aos dos juvenis considerando as mesmas concentrações de anestésicos (tabela 18).

Tabela 18 – Tempo de indução anestésica (em minutos) para adultos de pirarucu, *Arapaima gigas*, (60kg±3 e 170±5cm) submetidos a diferentes concentrações de mentol no CPA/DNOCS.

Concentração de mentol (mg/L)	Estágio de anestesia						Recuperação	Sobrevivência
	1	2	3	4	5	6		
10	*	*	*	8.16	9.21	*	19.22	100%
20	*	*	*	7.22	8.45	*	18.25	100%
30	*	*	4.24	6.21	7.64	*	18.48	100%
40	*	*	*	5.58	6.21	*	19.16	100%

Nota: (*) Estágio não alcançado.

3.3.3.4.2. Clorofórmio

O clorofórmio teve ação anestésica imediata após inalação, apresentando tempo médio de recuperação de 27,89 minutos (tabela 19). Os exemplares, no momento da inalação do clorofórmio, apresentaram inicialmente uma fase de excitação, com movimentações abruptas, seguido pela perda de reflexos e ausência total de reação.

Tabela 19 – Tempo de indução anestésica (em minutos) para adultos de pirarucu, *Arapaima gigas*, (60kg±3 e 170±5cm) submetidos a diferentes concentrações de clorofórmio no CPA/DNOCS.

Concentração de Clorofórmio	Estágio de anestesia						Recuperação	Sobrevivência
	1	2	3	4	5	6		
1508cm ³ /25mL	*	*	*	*	1.2	*	27.22	100%
1508cm ³ /25mL	*	*	*	*	0.9	*	28.56	100%

Nota: (*) Estágio não alcançado.

3.4.4. Discussão

O mentol (óleo essencial da hortelã, planta do gênero *Mentha*) foi utilizado como anestésico para os pirarucus apresentando efeitos positivos na anestesia de juvenis e adultos do CPA/DNOCS, como pode ser observado nos resultados. O uso de mentol em cultivo de peixes ainda se encontra em fase experimental, segundo Façanha e Gomes (2005) que testaram em exemplares de tambaqui (*Collossoma macropomum*) a eficácia deste anestésico. Gonçalves *et al.* (2008) utilizaram o mentol para anestésiar exemplares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). O mentol além da propriedade anestésica (RUPPERT e BARNES, 1994; PATEL *et al.*, 2007) também possui atividade antiinflamatória (LORENZO *et al.*, 2002) em animais.

Os alevinos de pirarucu utilizados neste experimento apresentaram hiperatividade, em contato com mentol, expressa pela natação errática e morte abrupta por afogamento. Comportamento semelhante de hiperatividade foi observado por Vidal *et al.* (2006), ao anestésiar com eugenol (óleo de cravo) juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), diferindo, porém, na diminuição da hiperatividade a medida que o anestésico se instalava, que não resultou em morte. Sintomas semelhantes de hiperatividade são apresentados em humanos, quando submetidos a anestesia com clorofórmio, seguido de perda de consciência.

Conforme Park *et al.* (2009), um anestésico para peixes deve minimizar as condições de estresse do manejo em instalações de piscicultura utilizando uma concentração ótima que possibilite ação da anestesia em período igual ou inferior a 3 minutos e um prazo de recuperação abaixo de 10 minutos, atingindo preferencialmente o estágio de anestesia profunda (com o peixe imóvel em virtude da perda do tônus muscular).

Os exemplares de pirarucu anestesiados no CPA/DNOCS com mentol atingiram o estágio de anestesia profunda em período superior a 3 minutos (4,3 minutos para juvenis e 5,58 minutos para adultos quando utilizada a concentração de 40 mg/L). O tempo de recuperação dos juvenis de pirarucu submetidos ao mentol variou de 12 a 15 minutos, valores considerados altos quando comparado com juvenis de tilápia, que em concentrações semelhantes apresentaram tempo médio de recuperação de 7 minutos, conforme estudo realizado por Moreira *et al.* (2009).

Os exemplares de pirarucu anestesiados com clorofórmio atingiram o estágio de anestesia profunda em período inferior a 3 minutos (1,2 minutos), porém, o tempo de recuperação foi quase três vezes superior ao recomendado por Park *et al.* (2009) (média 27.89 minutos). Apesar deste tempo de recuperação ter sido elevado, a sobrevivência dos exemplares submetidos a este tratamento foi de 100%

3.4.5 Conclusões

O uso de anestésicos em exemplares juvenis e adultos de pirarucu nos ambientes que possibilitam natação pode ocasionar a morte por afogamento em virtude da perda do reflexo respiratório.

A anestesia em exemplares de pirarucu, para as classes de comprimento utilizadas, levou a perda do reflexo respiratório, que acarretou na morte por afogamento. Exemplares de pirarucu devem ser anestesiados fora da água e assim permanecerem até sua recuperação.

O mentol pode ser usado como anestésico em juvenis e adultos de pirarucu via administração nas guelras. Este anestésico não é indicado para o uso em alevinos de pirarucu, pois causa a morte destes por perda de orientação seguida de afogamento.

O uso de clorofórmio em exemplares de pirarucus apresenta efeito anestésico imediato após a inalação, levando o espécime ao estágio de anestesia cirúrgica. O tempo de recuperação ao procedimento com anestesia utilizando clorofórmio é alto quando comparado com outras espécies de teleósteos.

CAPÍTULO 4 - CURVA DE CRESCIMENTO E RESPOSTAS ALIMENTARES DO PIRARUCU, *Arapaima gigas*, EM CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste capítulo estão relatados resultados de pesquisas realizadas com o pirarucu, *Arapaima gigas*, detalhando etapas de crescimento dos animais em comprimento total e peso corporal, desde a coleta de alevinos após o nascimento até os animais com presumível peso comercial (de 1g a 10kg).¹⁷ Também são descritas as principais formas de elaboração de alimento fresco para as fases de cultivo.

4.1 Introdução

O pirarucu, *Arapaima gigas*, é uma espécie carnívora que necessita de grande quantidade de proteína em sua dieta. Atualmente existem rações comerciais para diversas espécies de peixes carnívoras, mas não existem específicas para pirarucu. Estudos relativos a nutrição de alevinos, juvenis e reprodutores de pirarucu ainda são escassos, sobretudo por se tratar de uma espécie com história recente na aquicultura do Brasil. Além disso, o pirarucu possui hábitos alimentares diversificados, tendo como suas presas prediletas pequenos peixes, crustáceos, anfíbios e recentemente, rações comerciais para carnívoros que foram introduzidas em sua dieta. Estudos de crescimento e peso do pirarucu em condições limnológicas nordestinas são escassos sendo a maioria realizados na região Norte do Brasil (ONO, 2003).

O objetivo deste capítulo foi descrever três etapas do cultivo de pirarucu realizados no CPA/DNOCS, desde o nascimento dos alevinos, passando pelo treinamento alimentar, até os animais atingirem o peso comercial.

4.2 Material e Métodos

O presente estudo, realizado no *Campus II* do CPA/DNOCS, em Pentecoste/CE, teve duração de 18 meses no período de janeiro de 2005 a Julho de 2007, e foi conduzido em três etapas. A primeira etapa foi iniciada com 50 alevinos retirados aleatoriamente de dez incubadoras de treinamento alimentar (cinco por incubadora). Cada incubadora possuía 300 exemplares e tinha capacidade para 350 litros todas providas de sistema de filtragem eliminação de resíduos por sifonamento.

¹⁷ Estudos de crescimento e peso são ferramentas de vital importância, sobretudo na análise da viabilidade econômica do cultivo e reprodução, bem como base de dados de inofismável utilização no desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

Foram realizadas biometrias semanais em todos os 50 exemplares. Para medição do comprimento foi adaptada uma trena (1,5 m) em uma calha de PVC utilizada para facilitar a biometria (minimizando a possibilidade de escape lateral do animal).

Para pesagem dos alevinos foi utilizada balança digital TOLEDO® com precisão de 1g, em seguida cada exemplar foi devolvido a sua incubadora. Os animais desta etapa possuíam peso e comprimento médio inicial de 1,2g e 5,8cm, respectivamente, e 14 dias de vida. A etapa I do experimento foi finalizada quando os animais estavam alimentando-se exclusivamente de ração comercial, atingindo peso e comprimento médio respectivos de 180g e 29cm, após um período de 70 dias.

A segunda etapa do experimento foi iniciada com 50 alevinos oriundos de incubadoras do CPA/DNOCS, todos já treinados para consumir ração comercial. Estes exemplares foram escolhidos aleatoriamente conforme descrito anteriormente, e apresentaram peso e comprimento médio inicial respectivos de 243g e 32cm. Esta etapa finalizou quando os alevinos atingiram peso e comprimento médio de 1,9kg e 61cm, respectivamente.

A terceira etapa iniciou com 50 alevinos de peso médio 1,64kg e 58,5cm e foi concluída quando estes espécimes atingiram peso e comprimento médio respectivos de 10,7kg e 103cm.

Em todas as etapas, semanalmente nove parâmetros de qualidade de água foram analisados através de uma sonda limnológica eletrônica modelo YSI-6600: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutância específica (mS/cm), total de sólidos dissolvidos (g/L), salinidade (ppt), oxigênio dissolvido (mg/L), pH e clorofila ($\mu\text{g/L}$).

4.2.1 Etapa I

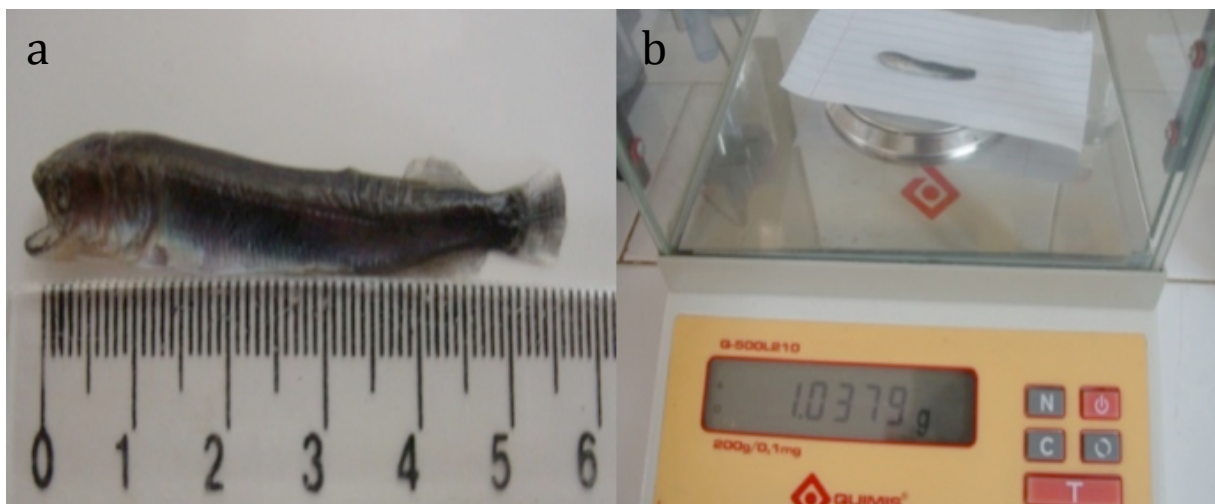
Os 50 alevinos começaram o treinamento alimentar em incubadoras, descritas anteriormente, onde receberam alimentação *ad libitum* inicialmente com alimento vivo (zooplâncton), passando gradativamente a zooplâncton congelado, oportunidade em que este foi adicionando gradativamente ração comercial seca em proporções crescentes objetivando a transição gradual para o regime alimentar com ração.

Na primeira semana do tratamento os alevinos foram alimentados exclusivamente com zooplâncton (coletado e cultivado). A partir da segunda semana, foi adicionada, proporcionalmente ao zooplâncton, uma porcentagem de ração comercial em pó, Nutron (48% de proteína bruta) seca (ração em pó para carnívoros), como mostrado na tabela 4.

O Alimento foi ofertado aos alevinos oito vezes ao dia em intervalos de 3 horas (00.00 h, 03.00 h, 06.00 h, 09.00 h, 12.00 h, 15.00 h, 18.00 h e 21.00 h).

Foram realizadas biometrias semanais e empregada a análise de variância da planilha eletrônica EXCEL/Windows, para a estimativa do comprimento e peso médio (figura 44).

Figura 44 - Biometria inicial de alevino de pirarucu, *Arapaima gigas* (Etapa I):



Fonte: Carlos Riedel. (a) medição, com régua comum. (b) pesagem, em balança eletrônica.

Os peixes que apresentaram diferenças visíveis de comprimento foram separados (processo conhecido como repicagem) de um berçário para outro, evitando assim que espécimes com comportamento dominante (com comprimento maior) inibissem o crescimento dos demais. Quando os alevinos atingiram comprimento e peso médio de, respectivamente, 180g e 29cm, e se alimentavam exclusivamente de ração, foi concluída a primeira etapa.

4.2.2 Etapa II

Para a realização da segunda etapa do experimento, 50 alevinos (243g e 32cm) foram retirados aleatoriamente das incubadoras do experimento I e transferidos para gaiolas de 4m³ dentro de um tanque de concreto de 25m³ (10x 2,5x 1m), com renovação constante de água suficiente apenas para compensar as perdas por evaporação.

Os alevinos foram divididos em duas gaiolas comerciais de cultivo de peixes (25 exemplares em cada), com o propósito de facilitar as operações de manejo, sobretudo nas amostragens para biometrias (figura 45). Nesta segunda etapa do experimento os exemplares

receberam ração comercial seca em pó, quatro vezes ao dia a 1,5% de sua biomassa, com ajustes semanais.

Figura 45 – (a) gaiolas utilizadas na etapa II dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, *Arapaima gigas*, em tanques de concreto no CPA/DNOCS. (b) exemplar de pirarucu, *Arapaima gigas*, durante biometria.



Fonte: Carlos Riedel.

4.2.3 Etapa III

A terceira etapa do experimento utilizou uma sub-amostra de 20 alevinos oriundos de um cultivo experimental no CPA/DNOCS que possuía 600 alevinos de pirarucu, divididos em 30 viveiros de 350m² (35x10m), povoados com 20 exemplares cada o que equivalem a uma biomassa inicial de um quilograma de peso vivo para cada 10m² de área do viveiro.

Foi realizada biometria em toda a população do viveiro 17 *do campus II*, CPA/DNOCS. Os exemplares possuíam peso e comprimento médio iniciais de, 1,64kg e 58,5cm, respectivamente.

Em cada biometria era utilizada uma balança portátil com capacidade máxima de 50kg e base de pesagem especialmente adaptada. As medidas de comprimento total foram realizadas em uma calha adaptada a uma fita métrica. Esta calha, que imobilizava parcialmente o peixe, tinha como função principal facilitar o manejo. Figura 46 (a) (b) (c).

Figura 46 – Biometria de exemplar de pirarucu, *Arapaima gigas*: (a) preparação da calha; (b) manobra para medição. (c) exemplar em medição na calha.



Fonte: Carlos Riedel. Os exemplares ficam retidos na rede de cerco e retirados um por vez para a biometria. A manobra consistiu em retirar cada exemplar cuidadosamente com a vista vendada e coloca-lo na calha de medição.

Para cada etapa do experimento foram coletadas as seguintes variáveis zootécnicas:

Ganho de peso (G.P) = peso final – peso inicial

Conversão alimentar aparente (CAA) = $\frac{\text{quantidade de ração ofertada}}{\text{ganho de biomassa corporal}}$

Sobrevivência (%) = $\left[\frac{\text{quantidade final de peixes no cultivo}}{\text{quantidade inicial de peixes}} \right] \times 100$

4.2.4 preparação de alimento fresco e manejo alimentar do pirarucu, *Arapaima gigas*.

Nesta fase do estudo foram monitorados 18 exemplares adultos de pirarucu inicialmente com peso e comprimento médio de 70kg e 173,5 cm, respectivamente. Os exemplares foram distribuídos de maneira homogênea em três viveiros de 450m² (seis em cada viveiro) no *Campus II* do CPA/DNOCS.

Para observação das respostas alimentares, três tratamentos foram utilizados, um para cada viveiro. No primeiro tratamento foi fornecido exclusivamente espécie forrageira. No segundo tratamento foi ofertada ração comercial para carnívoros (1% da biomassa). Por fim, no terceiro tratamento, administrou-se “*pellet* alterado”.

Os reprodutores, todos com “*transponder*” implantado, foram medidos e pesados no início e fim de cada tratamento. Foram observadas características comportamentais

referentes a alimentação dos reprodutores em cada tratamento, bem como peso e comprimento durante um período de 1 ano (janeiro de 2009 a janeiro de 2010).

A principal espécie forrageira utilizada para a alimentação do pirarucu no CPA/DNOCS, durante a realização do estudo, foi a tilápia, *Oreochromis niloticus*. A alimentação consistiu no fornecimento direto de alevinos de tilápia no viveiro dos reprodutores de pirarucu. Os viveiros de 450m² cada, foram povoados na razão de quatro alevinos de tilápia por metro quadrado com peso médio de 45±10g, havendo reposição mensal de alevinos.

Diariamente era fornecida ração específica para os exemplares de tilápia, assim, estas assumiam um papel de consumidor primário pois se alimentavam de fitoplâncton e também da ração, enquanto que os pirarucus atuavam como consumidores secundários, alimentando-se das tilápias.

Para o segundo tratamento foi fornecido exclusivamente ração comercial extrusada para carnívoros com 48% de proteína bruta, á razão de 1% da biomassa, durante duas vezes ao dia nos turnos da manhã e tarde (figura 47).

A ração era administrada através de lançamento simultâneo com fortes pisadas do arraçoador no solo. O propósito das pisadas era condicionar os espécimes a associar o som emitido por elas a presença de ração.

Figura 47 – Ração comercial utilizada para alimentação de juvenis e reprodutores de pirarucu, *Arapaima gigas*.



Fonte: Carlos Riedel.

4.4.4.3 Elaboração de “Pellets alterados”

Define-se “*pellets* alterados” (P.A.) como um agregado de ração comercial para carnívoros adicionado de peixe triturado. Os P.A. (comumente conhecidos como “bolotas”) foram utilizados na alimentação de espécimes juvenis e adultos de pirarucus e seu emprego parte da premissa que estão reunidos nestes P.A. Os nutrientes da ração comercial adicionado de peixes triturados, o que se acredita aumentar a palatatividade. Cada unidade do P.A. possuía peso médio de 150g e 4cm de raio, o que equivale a uma circunferência média de 24cm. Os P.A. foram preparados da seguinte forma:

Passo I - Moagem de tilápia: aproximadamente 4 kg de tilápia com peso médio de 40 ± 5 g foram completamente moídos em moinho elétrico até formar uma pasta homogênea (figura 48).

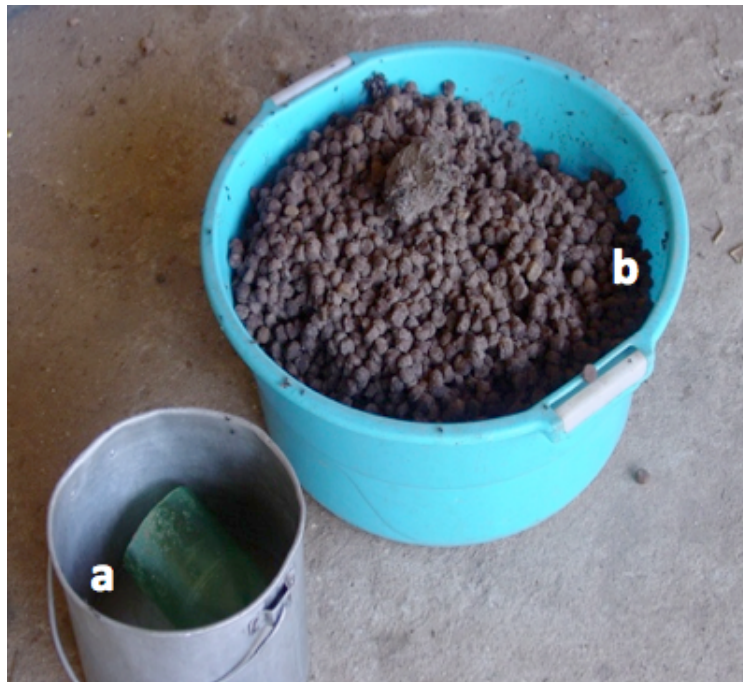
Figura 48 – Moagem em moinho elétrico



Fonte: Carlos Riedel.

Passo II - Uma saca de ração extrusada para peixes carnívoros (25kg) foi adicionada a pasta homogênea de peixe moído e misturada até sua completa homogeneização, proporção aproximada de 1:6 (1kg de peixe para cada 6kg de ração). (figura 49).

Figura 49 - (a) recipiente metálico com água para auxiliar na homogeneização da pasta de peixe; (b) ração.



Fonte: Carlos Riedel.

Passo III - Água era então adicionada à mistura para dar plasticidade suficiente, permitindo modelar manualmente o agregado a uma forma semelhante a esfera (Figura 50).

Figura 50 - Preparação de alimento semiúmido para reprodutores de pirarucu, *Arapaima gigas*, no CPA/DNOCS.



Fonte: Carlos Riedel. Barra branca: 10 cm.

Passo IV - Os P.A eram colocados para secar à sombra para a retirada do excesso de umidade e então armazenado em *freezer* comum a -20°C para posterior utilização.

Ao final do período de tratamento, após biometria, ração comercial foi fornecida para os espécimes do tratamento I (peixes forrageiros) e peixes foram administrados para os espécimes dos tratamentos II e III (ração e P.A), visando observar o comportamento alimentar.

4.3 Resultados

4.3.1 Qualidade de água

As médias dos dados da qualidade de água para cada etapa dos experimentos podem ser observadas na tabela 15. Os dados de qualidade de água consideram os três ambientes dos experimentos (incubadoras, tanques e viveiros) com características adequadas para a realização de cultivos da maioria das espécies de peixes de águas continentais, incluindo o pirarucu.

No experimento I utilizou-se sistemas de filtragem com areia grossa, fato que o caracterizou como cultivo em águas claras, comprovado pela baixa concentração de clorofila ($1\mu\text{g/L}$) de clorofila. Nos experimentos II e III os níveis de clorofila registrados sugerem que o cultivo foi realizado em águas verdes conforme mostra a tabela 20.

Tabela 20 – Dados de qualidade de água para os três ambientes de crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas*, no CPA/DNOCS.

Parâmetros limnológicos	Experimento		
	I	II	III
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	27,2	27,6	28,3
Condutância específica (mS/cm)	0,362	0,546	0,622
Total de sólidos dissolvidos (g/L),	0,34	0,34	0,46
Salinidade (ppt)	0,0	0,12	0,23
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,44	4,88	5,45
pH	7,6	7,7	8,1
Amônia (mg/L)	0,12	0,3	0,2
Clorofila ($\mu\text{g/L}$)	1	18	97

4.3.2 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E CURVAS DE CRESCIMENTO

O peso e comprimento médio final da etapa I (180g e 29cm) foram considerados, por razões de manejo, ideais para a comercialização, pois nessa idade os animais se alimentam exclusivamente de ração comercial, além de possuírem tamanho compatível ao transporte em sacos plásticos.

A primeira etapa do experimento foi realizada em 86 dias de treinamento. Concluído este período os alevinos estavam aptos ao consumo de ração comercial seca, possuíam comprimento e peso médio respectivos de 28,78cm e 206,7g. A conversão alimentar aparente (CAA) foi 5,2.

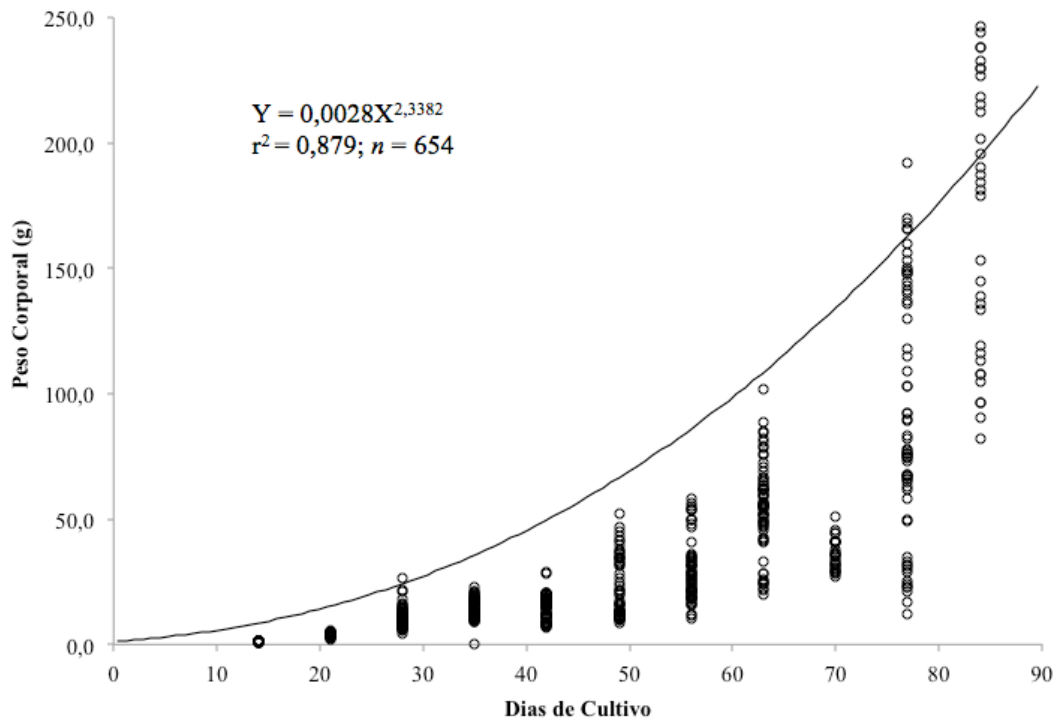
Na tabela 21 estão destacados as variações mensais de comprimento e peso médio durante os 86 dias referentes a primeira etapa dos experimentos.

Tabela 21 – Índices zootécnicos da primeira etapa dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, *Arapaima gigas*, realizados no CPA/DNOCS.

1º. ETAPA - TRASICAÇÃO ZOOPLANCTON-RAÇÃO						
Tempo de cultivo (dias)	14	21	35	49	63	84
Comprimento médio (cm)	5,8±1	7,9±3	12,9±4	14,3±2	19,6±1	29,6±2
Peso médio (g)	1,2±2	3,8±2	14,5±3	21,4±1	55±2	180±3

Na figura 51 pode ser observada a curva de crescimento que melhor se ajustou a essa etapa de crescimento ($Y = 0,0028X^{2,3382}$). O peso corporal variou entre 1g a 250g. O coeficiente de correlação foi 0,879.

Figura 51 – Curva de crescimento em peso para alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, etapa I

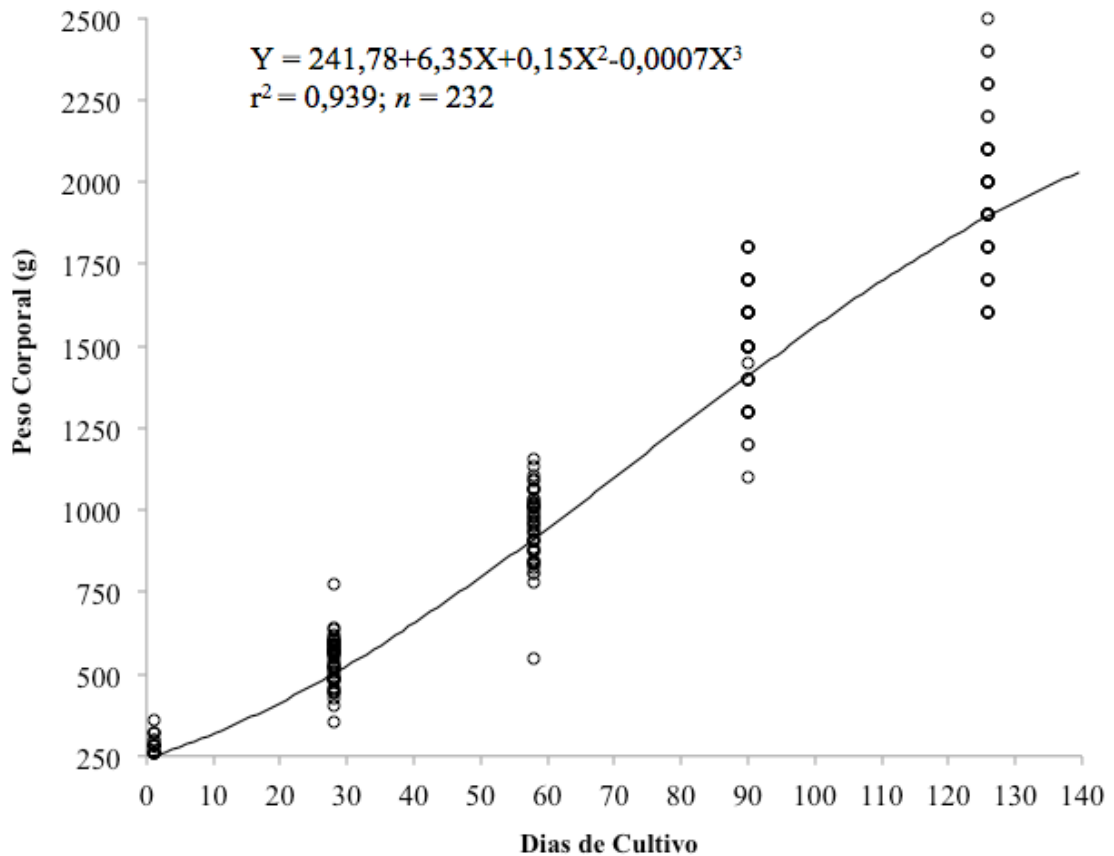


A segunda etapa do experimento foi realizada em 140 dias, sendo ministrada ração comercial para carnívoros com 48% de PB. Na tabela 22 estão destacadas as variações mensais de comprimento e peso médio durante o período de cultivo.

Tabela 22 – Índices zootécnicos da segunda etapa dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, *Arapaima gigas*, realizados no CPA/DNOCS.

2º. ETAPA - ADMINISTRAÇÃO DE RAÇÃO SECA				
Tempo de cultivo (dias)	30	60	90	120
Comprimento médio (cm)	43±2	50±5	56±4	61±4
Peso médio (g)	538±14	950±24	1518±46	1986±76

Na figura 52 pode ser observada a curva de crescimento que melhor se ajustou a essa etapa do experimento ($Y = 241,78 + 6,35X + 0,15X^2 - 0,0007X^3$). O peso corporal variou entre 250g a 2500g. O coeficiente de correlação foi 0,939.

Figura 52 - Curva de crescimento em peso para alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, etapa II

A terceira etapa do experimento foi realizada em 240 dias. Neste período os exemplares atingiram o peso médio comercial (10kg). Na tabela 23 estão destacadas as variações mensais de comprimento e peso médio durante o período de cultivo comercial (300 dias).

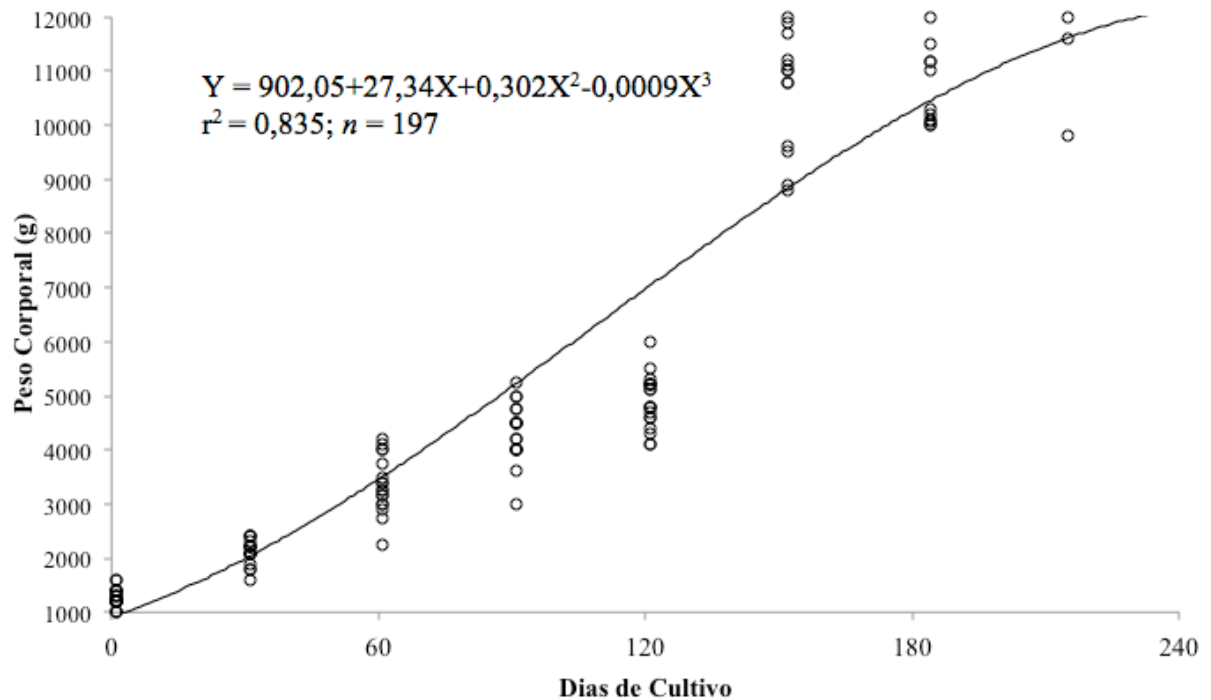
Tabela 23 – Índices zootécnicos da terceira etapa dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, *Arapaima gigas*, realizados no CPA/DNOCS.

3ª. ETAPA – CULTIVO COMERCIAL									
Tempo de cultivo (dias)	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Comprimento médio (cm)	64±3	70±4	78±4	79±2	85±2	88±3	89±2	98±3	105±2
Peso médio (g)	2112±6	3355±3	4338±6	4894±7	11378±6	11701±5	12852±3	10935±4	10605±5

Na figura 53 pode ser observada a curva de crescimento que melhor se ajustou a essa etapa do experimento ($Y = 902,05 + 27,34X + 0,302X^2 - 0,0009X^3$). Os pesos médios -

mínimo e máximo - do cultivo variaram, respectivamente, entre 1kg a 12kg. O coeficiente de correlação foi 0,939.

Figura 53 - Curva de crescimento em peso para alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas*, etapa III



Na tabela 24 estão sumarizadas as médias dos principais índices zootécnicos utilizados nas três etapas de cultivo, relativas a todo o período de crescimento.

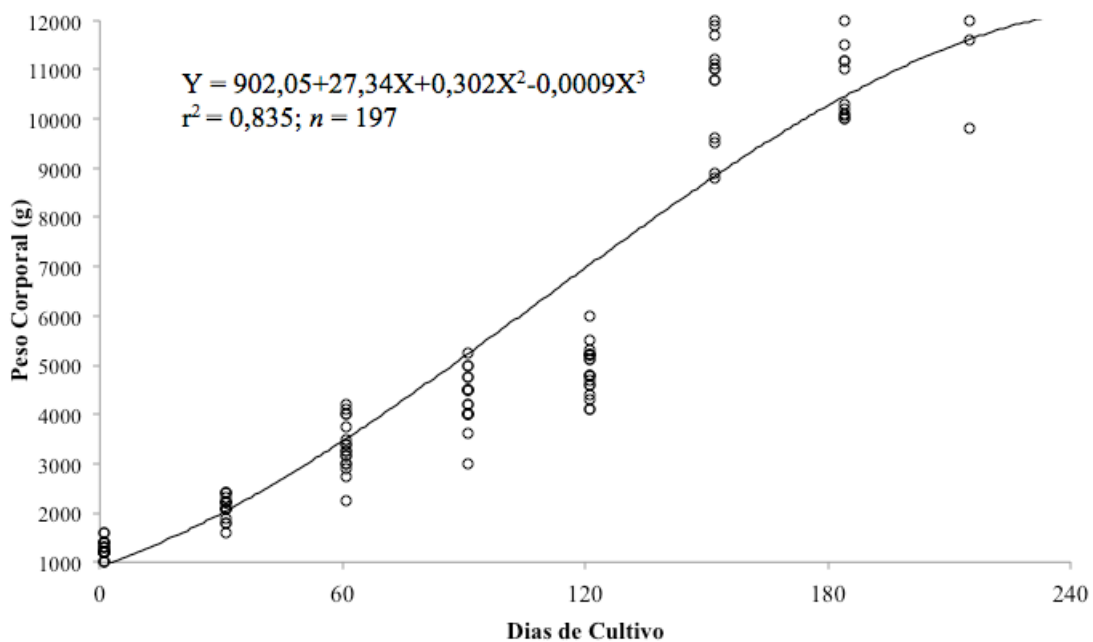
Tabela 24 - Índices zootécnicos dos experimentos de crescimento e peso de pirarucu, *Arapaima gigas*, realizados no CPA/DNOCS.

Índice zootécnico	Etapas		
	I	II	III
Peso médio inicial (g)	1,2±0,4	243±12	1262±23
Comprimento médio inicial (cm)	5,8±0,8	32±3	58,28±41
Peso médio final (g)	180±31	1987±45	10725±64
Comprimento médio final (cm)	29,6±3	61±2	103±4
Biomassa inicial (g)	87,1±2	11680±3	265002±12
Biomassa final (g)	6662,1±122	91400±166	211000±1664
Ganho de peso (final cada etapa)	6575±327	79720±455	184500±1245
Conversão alimentar aparente (CAA)	5,2	1,6	3,46
Ciclo de criação (dias)	84	126	336
Taxa de sobrevivência (%)	96	100	100

4.3.3 Correlação peso corporal e total

Na figura 54 é descrita a curva de correlação de peso corporal e comprimento total para todas as etapas do experimento (I, II e III). O valor de $r^2 = 0,993$ e $b=3,185107$.

Figura 54 - Correlação peso comprimento de exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas*, cultivados no Ceará.



4.3.4 Respostas alimentares

As espécies forrageiras fornecidas mantiveram os reprodutores alimentados durante o período de estudo sem perda de peso. Foi verificado que as tilápias, na oportunidade em que eram alimentadas por ração, formavam cardumes, que facilitavam a ação de predação dos pirarucus.

Na despesca do viveiro foram encontrados doze exemplares de tilápia com peso médio de 2kg. Isto se explicou, provavelmente, em virtude de alguns exemplares de tilápia possuírem comprimento suficiente para não serem engolidos pelos exemplares de pirarucu, ou por terem adotado um estratégia eficaz de fuga durante o período de estudo.

Os exemplares de pirarucu associaram positivamente as vibrações sonoras efetuadas pelo tratador à presença de alimento (ração a ser fornecida). Este fato foi comprovado

pela antecipação dos animais ao local onde as rações eram lançadas, logo após a propagação dos sons.

O grupo de reprodutores alimentados exclusivamente com ração comercial (tratamento II) apresentou dificuldade para alimentar-se com ração comercial extrusada em razão da diferença de proporcionalidade entre a abertura da boca de um reprodutor (15cm) e um *pelett* de ração (4,5mm), (tabela 25).

Tabela 25 - Características zootécnicas de reprodutores de pirarucu, *Arapaima gigas*, submetidos a três tratamentos alimentares, no CPA/DNOCS.

Características Zootécnicas	Tratamento		
	I	II	III
Peso médio inicial (kg)	47±1	46±2	44±2
Peso médio final (kg)	58±1	54±2	54±1
Comprimento inicial (cm)	177±1	176±2	177±2
Comprimento final (cm)	178±2	177±2	178±2
Biomassa inicial (kg)	286	276	276
Biomassa final (kg)	342	288	324
Ganho de peso (kg)	56	38	48
Conversão alimentar	-	3,49	2,02
Ciclo de criação (dias)	365	365	365
Taxa de sobrevivência (TS)	100%	100%	100%

4.3.8 Elaboração de pellets alterados (P.A.)

Dentre as modalidades de alimentação de pirarucu testadas, os *pellets* alterados (P.A.) se destacaram entre outros por apresentar facilidade no arraçoamento em virtude de sua forma, plasticidade e peso. O uso de P.A. na alimentação de pirarucu propiciou praticidade no lançamento podendo abranger grande área dos viveiros.

As vibrações sonoras emitidas pelos P.A. em contato com a superfície da água do viveiro despertaram a atenção dos exemplares de pirarucus.

4.4 Discussão

As análises dos parâmetros de qualidade de água realizadas nas incubadoras, tanques e viveiros de treinamento e cultivo do pirarucu no CPA/DNOCS, revelaram valores que se enquadram dentro dos limites recomendados por Boyd (1990) para cultivo de peixes tropicais.

A faixa de pH ligeiramente alcalina apresentada nos viveiros do CPA/DNOCS mostrou diferença significativa quando comparada com o mesmo parâmetro em trabalhos de alevinagem na região Norte do Brasil, essas diferenças, entretanto, aparentemente, não resultaram inibições de crescimento dos exemplares estudados.

O pH registrado nas três etapas dos experimentos realizados no CPA/DNOCS oscilou entre 7,6 a 8,1. Escorvo-Filho *et al.* (2004) em estudo de crescimento de pirarucus cultivados no Estado de São Paulo, obtiveram valores de pH oscilando entre 6,9 a 8,42; estes valores se mantiveram na faixa de pH de neutro a ligeiramente alcalino. Cavero *et al.* (2003), trabalhando com sistema aberto de cultivo de pirarucus obtiveram valores de pH entre $6,1 \pm 0,4$ a $6,2 \pm 0,4$; Estes valores classificam-se na escala de pH (que vai de 0 a 14) como águas ácidas.

As águas ácidas são típicas da região Norte do Brasil, o que mostra que pirarucus podem ser cultivados numa ampla faixa de pH, com valores que oscilam entre 6,1 a 8,42, sem prejuízos para seu crescimento.

Cavero *et al.* (2003) afirmam que o treinamento alimentar de pirarucu, a rigor, pode ser feito com animais de qualquer idade e tamanho, porém, segundo os mesmos autores, o sucesso no treinamento alimentar é maior quando os animais estão com aproximadamente 1,5g de peso. Os exemplares de pirarucu do CPA/DNOCS iniciaram o treinamento alimentar com peso de 1,2g e tiveram plena aceitação da ração.

Em virtude do manejo operacional, não foi possível determinar a quantidade de alimento consumida. Nesta fase, a captura do alimento é de suma importância, de forma que, para o sucesso do treinamento é necessário água clara e alimento vivo em densidades suficientemente altas para proporcionar a captura destes pelos alevinos de pirarucu.

Pereira-Filho *et al.* (2003) alimentando exemplares de pirarucu em viveiro submetidos a treinamento alimentar obtiveram resultados semelhantes, não registrando mortalidade em nenhum dos tratamentos ofertados. Pereira-Filho *et al.* (2003) obtiveram em sistema de criação intensiva de pirarucu uma produção estimada de $2,5\text{kg/m}^2$ por ano, utilizando ração comercial para carnívoros.

Os exemplares cultivados em viveiros do CPA/DNOCS obtiveram uma produção estimada de $0,95\text{kg/m}^2$ ano. Salienta-se que no CPA/DNOCS a densidade de estocagem foi inferior á usada por estes autores.

Na etapa de 1kg de peso corporal, obtiveram ganho de peso médio mensal da ordem de 1 kg. Crescêncio (2005) registrou, com 60 dias de cultivo, ganho de peso individual entre 564 e 692g, com conversão alimentar aparente variando de 1,70 a 1,99.

Bard (1986) e Aguilar *et al.* (2007) reportam o uso de espécies forrageiras para alimentação de pirarucus obtendo ganhos de peso de até 10kg/ano. Imbiriba (2001) utilizou povoamento de viveiros de pirarucu com espécies de peixes forrageiros, a exemplo as tilápias, piabas ou outras espécies de alta capacidade reprodutiva, como fonte principal de alimentação.

No *Campus* II do CPA/DNOCS, as tilápias foram utilizadas como espécie forrageira para alimentação suplementar de pirarucu em virtude da abundante disponibilidade de exemplares desta espécie.

Imbiriba (2001) afirma que o pirarucu utiliza para a busca de alimento o olfato e este sentido apresenta mais eficácia que a visão, porém, no citado trabalho, não se faz referência às percepções de vibrações sonoras em virtude da linha lateral do pirarucu.

As vibrações sonoras ocasionadas intencionalmente pelo arraçoador na oportunidade da alimentação dos pirarucus, fizeram estes exemplares antecipar-se rapidamente ao local onde as rações são costumeiramente lançadas, mesmo em águas com situação de alta turbidez. Assim, nossas observações de comportamento alimentar apontam para a percepção de vibrações e visão como sentidos mais aguçados para a captura de alimentos por exemplares juvenis e adultos de pirarucu confinados em cativeiro.

O fator de conversão alimentar variou de 2:1 a 3,5, foram encontrados nos três viveiros exemplares de tilápia que interferiram na conversão. Nos tratamentos I e III os exemplares de pirarucu apresentaram ganho de peso semelhantes aos obtidos pelos referidos autores, diferindo apenas no tratamento II (fornecimento de ração comercial), que obteve média de ganho de peso inferior. A diferença de crescimento no tratamento II foi possivelmente ocasionada pela dificuldade na deglutição dos *pellets* de ração, em virtude da diferença de proporcionalidade do *pellet* e da boca do peixe.

A correlação peso-comprimento é fundamental para o entendimento do crescimento de peixes (BOLGER e CONOLLY, 1989). A correlação de crescimento e peso do pirarucu, para todas as etapas do experimento, foi 0,993 o que mostra um alto grau de adesão entre as variáveis.

O valor de “b” na equação de correlação peso comprimento foi 3,18510 que caracteriza como espécies de crescimento alométrico positivo. Le Cren (1951) afirma que os valores de b para peixes podem variar entre 2,5 e 4 mas geralmente encontram-se em torno de 3 (crescimento isométrico).

4.5 Conclusões

Exemplares de pirarucus podem atingir, a partir de peso médio 1g, sob condições limnológicas do Nordeste do Brasil, 14 kg, em de 19 meses de cultivo. Alevinos de pirarucu, com peso médio inicial de 1 kg, atingem tamanho comercial (média de 10 kg) em 12 meses.

Não se registraram mortalidades nas metodologias de suplementação alimentar utilizadas durante o período de observações. O crescimento e ganho de peso obtido foi ligeiramente inferior para o grupo tratado exclusivamente com o fornecimento de peixes triturados.

É possível manter reprodutores de pirarucu em viveiros com fornecimento de espécies forrageiras sem prejudicar o crescimento e reprodução.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na década de 40 do século XX o preço de venda do pirarucu sempre ficou abaixo das demais espécies comercializadas, sendo a população de baixa renda exclusiva consumidora do pirarucu. Atualmente, o advento de novas tecnologias, leva o pirarucu a atender um mercado consumidor exigente, no qual as pessoas estão dispostas a pagar mais por um produto diferenciado de excelente qualidade (produzidos em fazendas), a exemplo dos peixes importados (salgados e defumados). No entanto, a cadeia produtiva do pirarucu ainda não se completou. Existem deficiências na regularização da produção no fornecimento de alevinos, e carência de informação aos produtores.

O desenvolvimento das tecnologias de identificação sexual do pirarucu contempladas nesta Tese (laparoscopia e ultrassonografia) contribuem diretamente para a diversificação do cultivo desta espécie, principalmente na redução dos custos de aquisição de reprodutores. Atualmente, um casal de pirarucu é comercializado por R\$ 10.000,00. Com a tecnologia da laparoscopia será possível o produtor adquirir espécimes juvenis (com peso médio individual de 10 kg) a um custo aproximado de R\$ 200,00 (casal previamente identificado com marcadores eletrônicos) e desta forma cultivá-los até se tornarem reprodutores. Preferencialmente os produtores devem estar engajados na piscicultura – trabalhando secundariamente com o pirarucu.

Os estudos de crescimento revelaram que o pirarucu possui considerável potencial de crescimento no Nordeste do Brasil, atingindo crescimento semelhante ao da Bacia Amazônica, seu *habitat* original. Contudo, é necessário que mais pesquisas sejam desenvolvidas, especialmente no que se refere ao desenvolvimento de rações com elevados teores protéicos. Entretanto, não se pode perder de vista o fato de que para intensificar o cultivo de pirarucu no Nordeste do Brasil é preciso assegurar recursos humanos, sobretudo com a formação de técnicos especializados, para que se permita a divulgação da tecnologia de reprodução do pirarucu ao setor produtivo.

Deve-se ainda assegurar meios financeiros, celebrando parcerias entre o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), as Secretarias Estaduais de Pesca e Aquicultura (SPA), as Universidades Estaduais e Federais e demais instituições no que for necessário e de forma continuada, visando, sobretudo, a massificação da produção de alevinos de pirarucu.

6 ANEXOS

Sex determination in the Giant fish of Amazon Basin, *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), using laparoscopy

Carlos Riedel Porto CARREIRO¹, Manuel Antônio de Andrade FURTADO-NETO², Pedro Eymard Campos MESQUITA³, Tácito Araújo BEZERRA⁴

ABSTRACT

The Giant of Amazon basin, pirarucu, *Arapaima gigas*, is the largest scaled freshwater fish in the world. Pirarucu cultivation has recently started, driven by the decline in natural populations and high market value. Currently, there are no reliable methods for sexual differentiation in this species other than direct examination of gonads, which requires dissection of specimens. A non-lethal and less invasive method for sexual identification is highly desirable in order to properly group broodstock for mating and offspring production. We utilized laparoscopic examination in anesthetized pirarucu to differentiate between male and female individuals. This method allowed for the observation and differentiation of the reproductive organs within an individual. Our results suggest that laparoscopy is an efficient method for sex differentiation in pirarucu causing minimal stress to the fish.

KEYWORDS: *Arapaima gigas*, Fish anesthesia, Laparoscopy, Sex differentiation.

Determinação do sexo no peixe gigante da Bacia Amazônica, *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), usando laparoscopia.

O gigante da bacia amazônica, pirarucu, *Arapaima gigas*, é o maior peixe de escamas de água doce do mundo. O seu cultivo teve início recentemente motivado pelo declínio de suas populações naturais em virtude do alto valor de sua carne no mercado. Não existem métodos para a diferenciação sexual nesta espécie, o único método é o exame direto das gônadas, o qual requer a dissecação do espécime. Um método para a identificação sexual é altamente desejável, a fim de selecionar grupos de reprodutores para o acasalamento e, portanto, a produção de progênie. A fim de diferenciar reprodutores machos de fêmeas, foi utilizado o exame laparoscópico em animais previamente anestesiados. Este método permitiu a observação dos órgãos abdominais, incluindo gônadas, com grande precisão. Os resultados mostram que a laparoscopia é um método eficiente para a diferenciação do sexo em pirarucu e causam o mínimo de stress para os animais.

PALAVRA-CHAVE: *Arapaima gigas*, Anestesia, Laparoscopia, Diferenciação sexual.

¹ Universidade Federal do Ceará – UFC. Departamento de Engenharia de Pesca - DEP. Avenida Mister Hull, s/n. – Pici - Fone: +55 (85) 3366.9723 - Fortaleza-CE. E-mail: carlos.riedel@yahoo.com

² Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Avenida da Abolição, 3207 – Meireles - Fortaleza - CE - Fone: +55 (85) 3366.7000. E-mail: mfurtado@ufc.br

³ Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolpho von Ihering – CPA/DNOCS – Ombreira Direita, s/n. Pentecoste-CE. Fone: +55 (85)3352.1235 E-mail: pedro_mesquita@uol.com.br

⁴ Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolpho von Ihering – CPA/DNOCS – Ombreira Direita, s/n. Pentecoste-CE. E-mail: tacitobezerra@bol.com.br

INTRODUCTION

The Giant of Amazon basin, pirarucu, *Arapaima gigas*, is an air-breathing fish species native to the Amazon region and is one of the most economically and culturally most important species from the Brazilian-Amazonian ichthyofauna (Castello 2004; Andrade 2007). This species grows up to 3 m in length, weights up to 200 kg, and is capable of living longer than 50 years (Saint-Paul 1986). The word pirarucu comes from the native Brazilian language *tupi-guarani* and which means “red fish”, which is the color both sexes turn during the mating season. Males display an intense red color on abdominal scales whereas the red color is less intense in female specimens (Fontenele 1955; Chu-Koo *et al.* 2008). However, this characteristic is not reliable as a means to differentiate sexes, and therefore, it is not used for this purpose.

Pirarucu cultivation efforts have recently started being driven primarily by the decline in natural populations and high market values. The aquaculture of this species represents an important management tool to minimize the effects of overharvest of wild populations (Alcantara 1991). In its natural habitat, pirarucu prey on many items including smaller fish, mollusks, insects and crustaceans (Imbiriba 2001; Cavero 2002). Under intensive culture, an initial feeding-training period is necessary in order to induce fish to capture pelleted food (Gandra 2002). In captivity, reproduction generally occurs in large earthen ponds where broodstock are grouped together at the beginning of the rainy season (January to May in Northeastern Brazil) (Fontenele 1955; Alcantara 1991).

Sexual dimorphism in pirarucu is a complex mechanism under the control of genetic, physiological and environmental factors (Devlin and Nagahama 2002). In most cultivated fish species, phenotypic sex is easily identified by observation of specific external characters such as scale coloration and the presence of genital papilla during early sexual maturation. Methods currently used for sexual identification of fish species include intra-ovarian biopsy, ultrasonography and endoscopy (Ortenburger *et al.* 1996; Kynard 2002; Wildhaber *et al.* 2005; Bryan *et al.* 2007; Hurvitz *et al.* 2007). For some fish species, DNA markers are available for sexual identification at the genetic level and in these cases the differentiation is based on distinguished gender-specific band patterns.

The use of anesthetics on fish is a common practice in laboratory research, especially for surgical proposes (Ross and Ross 2008). Anesthesia can reduce pain by blocking electric signals from periphery to both the spinal cord and brain (Craig 2003). Anesthetics are usually administered by immersion of fish in a diluted solution of anesthetic and the entrance point is predominantly via the gills. Pirarucu are an obligatory air-breathing fish, and the use of anesthesia by immersion can cause death by drowning. For this reason, we

have developed a technique of anesthesia using chloroform with modified atmosphere (data not shown).

Pirarucu do not display significant external sexual dimorphism. To the best of our knowledge, no reliable method for sexual determination has been described for this species with the exception of minor morphological differences observed only in mature fish during the initiation of courtship behavior at approximately five years of age (Imbiriba 2001; Saavedra-Rojas *et al.* 2005; Chu-Koo *et al.* 2008). The absence of external characteristics for sexual determination has encouraged the development of practical and non-damaging techniques of internal examination of the gonads based on laparoscopy. This technique has been used in both the medical and veterinary fields to examine internal organs via insertion of an optical instrument into the body cavity through a small incision or the urogenital pore (Wildhaber *et al.* 2005; Ortenburger *et al.* 1996). The objective of our study was to assess the use of internal laparoscopy as a means for determining gender of pirarucu.

MATERIALS AND METHODS

Transport and acclimation

Juvenile pirarucu (400 ± 50 g and 40 ± 5 cm) acquired from a private company located in the city of Campo-Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, were brought into the Rodolpho von Ihering Aquaculture Research Center, Pentecoste, Ceara, Brazil ($3^{\circ}48'42''S$, $39^{\circ}16'72''W$) in a specially adapted truck equipped with four TRANSFISH[®] units (2,000 liters each) connected to an aeration unit. The transportation period was approximately 96 hours and no mortality was recorded. Fish were acclimated and maintained in earthen ponds and fed *ad libitum* with pelleted commercial ration (42% protein and 12% fat) supplemented with whole grinded Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Water temperature was maintained at 28 ± 2 °C all year around. After reaching three years of age, both length (cm) and weight (g) were measured and individuals were considered to be ready for laparoscopic examination.

Anesthesia

Previous studies conducted at Aquaculture Research Center Rodolpho von Ihering, Pentecoste, showed that evaporation of 3 mL chloroform solution in specimens of pirarucu (30 ± 3 kg), causes loss of reflex and muscle relaxation. Based on this preliminary study we select ten 3-year old fish (30 ± 3 kg and 150 ± 18 cm) for the anesthesia procedure. A plastic gas-mask has been specially adapted for the inhalation of chloroform. The gas-mask was tied to an air compressor for air supply. Each fish was individually placed on the examination table and anesthetized with the gas-mask using chloroform. Time of induction and recovery was

recorded. Only one concentration of chloroform was tested (3mL in a 2 liters gas-mask supplied with atmospheric air).

Laparoscopic examination

Twelve 3-year old fish (30 ± 3 kg and 150 ± 18 cm) were randomly selected and kept in four concrete tanks (4 m^3) under a raceway system (800% water renovation/day). Based on the scale coloration, one male and one female were euthanized by immersion in ice-cold water and dissected in order to orient the insertion points for laparoscopy and determine the actual appearance of peritoneal organs, including the gonads. Each of the remaining 10 live specimens was placed on the examination table and anesthetized by inhalation of chloroform from an adapted gas-mask attached to an air supply, subsequently pirarucu received a 5 mm incision in the abdominal wall near the anal fin to possibility the laparoscopic procedure (Figure 1). The laparoscopy system consisted of a cystoscope sheath, 15 cm long and 5 mm in diameter (Karl Storz™), connected with an optic fiber light transmission, linked to a halogen cold light source and a mini video camera attached to a color monitor linked to a video recorder. The laparoscope was equipped with an air pump and an internal canal through which the abdominal wall could be inflated with air for a clear view. Observation and capture of digital images from internal organs including gonads were carried out. After the procedure, the incision was sutured, disinfected with powder sodium chloride, and individuals received implantable transponders for identification prior of being taken to a 4 m^3 nursery-tank, containing 3% saline solution, were they rested for 3 days.

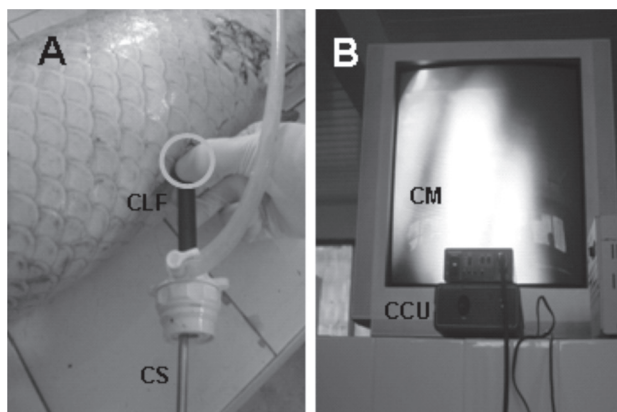


Figure 1 - Endoscopic examination through an abdominal incision. (A) Anesthetized "pirarucu". Circle show the position of the incision through which the trocar was inserted. (B) General aspect of laparoscopy system image. Laparoscopy system components: cystoscope sheath (CS), halogen cold light fountain (CLF) with fiberoptic light transmission cable, camera control unit (CCU) attached to a color monitor (CM).

RESULTS AND DISCUSSION

Anesthesia

A wide variety of compounds have been utilized to anesthetize fish: Tricaine Methanesulfonate (MS-222), Quinaldine (2-methylquinoline), Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) and Carbon Dioxide (Browser 2002). Dosage for these compounds depends on the degree of anesthetization desired, the species, size, water temperature and water hardness (Keegan 2005; Zahl *et al* 2009). Generally, fish are maintained in an aquarium with anesthetic diluted solution and removed when they reach the desired level of anesthesia. Anesthetics are commonly taken into the system by the gills during respiration. As the pirarucu is an obligatory air-breathing fish; the use of anesthetics diluted in water can cause death by drowning due to the risk of not recovering the air-breathing reflex is very high. The anesthetic induction in pirarucu occurred shortly after chloroform inhalation (10 ± 3 s). The recovery time recorded for chloroform was 15 ± 4 min, which is much longer than the average of 3 to 5 min reported for many fish species (Pickering 1998). This study demonstrates the usefulness of chloroform-induced anesthesia in air-breathing fish. Further studies on this technique for pirarucu are highly suggested.

Laparoscopic procedure

Individual laparoscopic procedures lasted about 3 minutes per animal and clear digital images of both male and female gonads were obtained. The incisions made for the trocar introduction did not cause external bleeding and no any apparent damage to the internal organs was found by image inspection. Similar results were observed by Hernandez-Divers *et al.* (2004) for sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. Froehlich *et al* (1999) suggested that there is always a risk in any surgical procedure, but the risk is generally low with laparoscopy, as shown in sturgeons. The relationship between fish size and risk of mortality from the procedure may be an important consideration when using endoscopy on rare fish (Swenson *et al.* 2007). In the present study all specimens survived the laparoscopic surgical procedure. Our findings indicate the laparoscopy procedure to be an efficient, practical, and less stressful procedure for sex determination of pirarucu.

Male and female differentiation

It was possible to clearly differentiate male from female gonads based on image analysis for all examined subjects. Laparoscopic images from obtained from male fish showed a single testis with long, opaque, smooth, milky aspect located on the left side of the body close to the bladder and visible along the length of the body cavity (Figure 2A). Although

the ability to differentiate fat from male testes was limited in endoscopic studies of shovelnose sturgeon (Wildhaber *et al.* 2005), male pirarucu testes could be differentiated from fat based on color. Images from females showed that a single fusiform ovary located along the abdominal cavity wall near the bladder. Through the laparoscopic process individual or multiple developing oocytes were easily identified by their semi-transparent green color. The presence of oocytes in different developmental stages was observed (Figure 2B).

Scale color for sex determination

Based on the intensity of the scale coloration, eight of the ten examined pirarucu were believed to be female, and two to be males. The laparoscopic examination revealed six female and four male, fact that leads us to believe that scale coloration patterns of sexually immature fish was not reliable as a characteristic for sexual differentiation. Chu-Koo *et al.* (2008) achieved 95% efficiency in sex determination of 2.8 year-old pirarucu by using enzyme-immuno-assay while laparoscopy produced 100% accuracy (present work) by direct observation of oocytes, leading us to believe that laparoscopy is a reliable method for sex determination in immature pirarucu and can be considered a powerful tool in the management of aquaculture facilities.

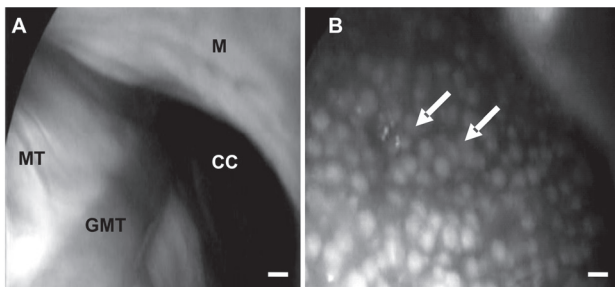


Figure 2 - Detail of laparoscopic examination of pirarucu gonads. A: male (CC) shows celomic cavity. (MT) muscular tissue and (GMT) gonadal male tissue. B: Female endoscopic view, white arrows show individual oocytes. Space bar: 1,0 mm.

CONCLUSION

The use of chloroform as an anesthetic for pirarucu proved to be effective for allowing the complete and successful execution of the laparoscopy procedure. Scale color patterns were not effective on their own when used as a criteria for gender determination. The images generated by the laparoscopic procedure produced a high rate of accuracy for identification of both male and female gonads. Our study suggests that the use of laparoscopy in pirarucu culture is an efficient method for sex identification at early ages. The ability to observe intact gonads in anesthetized fish can provide an important management tool for fingerling production.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr. Nestor dos Santos Vieira Costa Neto for his technical assistance. C. R. P. Carreiro thanks to DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) for use of laboratory facilities, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FUNCAP (Fundação Cearanse de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the scholarship provided.

REFERENCES

- Alcantara, F. 1991. Observations on reproductive behavior of paiche, *Arapaima gigas*, in captivity. *Folia Amazonica*, 2: 165–168. (In Spanish with English abstract).
- Andrade, J.I.A.; Ono, E.A.; Menezes, G.C.; Brasil, E.M.; Roubach, R.; Urbinati, E.C.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 576–580.
- Bryan, B.J.L.; Wildhaber, M.L.; Papoulias, D.M.; Tillitt, D.E.; Annis, M.L. 2007. Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. *Journal Applied Ichthyology*, 23: 411–419.
- Castello, L. 2004. A Method to count pirarucu, *Arapaima gigas*: fishers, assessment, and management. *North American Journal of Fish Management*, 24: 379–389.
- Cavero, B.A.S. 2002. *Stocking density of pirarucu juvenile, Arapaima gigas (Cuvier, 1829) in cages with small volume*. Dissertation, University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil. 51 p. (In Portuguese with English abstract).
- Chu-Koo, F.; Dugué, R.; Aguilar, M.A.; Daza, A.C.; Bocanegra, F.A.; Veintemilla, C.C.; Duponchelle, F.; Renno, J.F.; Tello, S.; Nuñez, J. 2008. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 125–136.
- Craig, A.D. 2003. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annual Review of Neuroscience*, 26: 1–30.
- Devlin, R.H.; Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191–364.
- Fontenele, O. 1955. *Contribution to the knowledge of pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier) in captivity (Actinopiterygii, Osteoglossidae)*. Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), Fortaleza, Ceara, Brazil. 16p. (In Portuguese).
- Froehlich, F.; Gonvers, J.J.; Dubois, R.W.; Burnand, B. 1999. Appropriateness of gastrointestinal endoscopy: risk of complications. *Endoscopy*, 31: 684–686.
- Gandra, A.L. 2002. *Food Frequency Study of the pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829)*. Dissertation, University of Amazonas, Manaus, Amazonas, 36 p. (In Portuguese with English abstract).

- Hernandez-Divers, S.M.; Dover, S.R. 2004. Endoscopic sex determination and gonadal manipulation in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of Zoology and Wildlife Medicine*, 35: 459–470.
- Hurvitz, A.; Jackson, K.; Degani, G.; Levavi-Sivan, B. 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*, 270: 158–166.
- Imbiriba, E.P. 2001. Potential of farm fishing pirarucu, *Arapaima gigas*, in captivity. *Acta Amazonica*. 31: 299-316. (In Portuguese with English abstract).
- Keegan, R. D. , 2005. Inhalant anesthetics: The Basics. In: R.D. Gleed (ed.). *Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: pets*. Ithaca : International Veterinary Information Service (www.ivis.org); No. A1402.1005 document. 12 pp.
- Kynard, B.; Kieffer, M. 2002. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 505–508.
- Ortenburger, A.I.; Jansen, M.E.; Whyte, S.K. 1996 - Nonsurgical videolaproscopy for determination of reproductive status of the arctic char. *Canadian Veterinary Journal*, 37: 96–100.
- Pickering, A.D. 1998. Stress responses of farmed fish. In K. D. Black and A. D. Pickering (eds.). *Biology of farmed fish*. Sheffield Academic Press, Sheffield, U.K. pp. 222–255
- Ross, L.G.; Ross, B. 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. Oxford: Blackwell Science. 3rd edition, 236 p.
- Saavedra-Rojas, E.; Quintero-Pinto, L.; Landines Parra, M. 2005. *Reproductive aspects: Biology and cultivation of pirarucu, Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae): INCODER-UNC, Bogota, Colômbia, 109 p. (in Spanish).
- Saint-Paul, U. 1986. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*, 54: 205-240
- Swenson, E.A.; Rosenberger, A.E.; Howell, P.J. 2007. Validation of endoscopy for determination of maturity in small salmonids and sex of mature individuals. *Transactions of the American Fisheries Society*, 136: 994–998.
- Wildhaber, M.L.; Papoulias, D.B.; DeLonay, A.J.; Tillitt, D.E.; Bryan, J.L; Annis, M.L; Allert, J.A. 2005. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to pallid sturgeon. *Journal of Fish Biology*, 67:114–132.
- Zahl, I.H.; Kiessling, A.; Samuelsen, O.B.; Hansen, M.K. 2009 - Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – effect of re-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture*, 295: 52-59.

Recebido em 14/06/2010

Aceito em 05/08/2010

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 576–580, 2007.
- ALCANTARA, F. Observations on reproductive behavior of paiche, *Arapaima gigas*, in captivity. **Folia Amazonica**, v. 2, p. 165–168, 1991.
- AGUILAR, J. A. Y.; CHACÓN, M. S., CHU-KOO, F. W.; PALMIRA, P.P.; PINEDO, L, P. **Influencia de la alimentación con peces forraje en el crecimiento de juveniles de paiche *Arapaima gigas* en ambientes controlados**. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana- BIODAMAZ. 2007. 10pp.
- BACA, L. C. **Historia biológica del Paiche, *Arapaima gigas*, bases para cultivo en la Amazonía**. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) Programa de Biodiversidad. Iquitos, Perú Junio 2001. 27pp
- BARD, J.; IMBIRIBA, E. P. **Piscicultura do pirarucu *Arapaima gigas***. Belem: EMBRAPA – CPATU. (Circular Técnica. 52). 1986. 17 p.
- BARRERO, N. M. L. **Diversidade genética de *Bryconorbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural**. 92f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá 2007.
- BAZZOLI N. **Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora**. In: Godinho HP, Godinho AL (Org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.291-306.
- BOCANEGRA, F. A.; WUST, W. H.; MARTIN, S.T.; ALFARO, M. R.; TORRES, D. D. C. **Paiche. El gigante del Amazonas**. Instituto de Investigaciones de la Amazônia Peruana, Iquitos, Peru, 2006.
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Birmingham. Publishing Co., Birmingham, Alabama. 482 pp. 1990

BRYAN, B. J. L.; WILDHABER, M. L.; PAPOULIAS, D. M.; TILLITT, D. E.; ANNIS, M. L. Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. **Journal Applied Ichthyology**, v. 23, p. 411–419, 2007.

BROWSER, B.; Kieffer, M. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, p. 505–508, 2002.

BOLGER, T. ; CONNOLLY, P. L. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**, v. 34, p. 171-182, 1989.

CARREIRO C. R. P. **Identificação de Populações da Lagosta Vermelha, *Panulirus Argus*, no Norte e Nordeste do Brasil, usando marcadores moleculares do tipo RAPD**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, 2001.

CARO, I. V.; SILVA, I. J. O.; MOURA, D. J.; PANDORFI, H.; SEVEGNANI, K. B. Eficiência das leitoras fixas utilizadas na identificação de animais por radio-frequência. **Revista Brasileira de Agroinformática**, v. 5, n.2, p.49-58, 2003.

CAVERO, B.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R, ITUASSÚ, D.; GANDRA, A.; CRESCÊNCIO, R. **Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de Pirarucu em ambiente confinado**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)/Universidade Federal do Amazonas, Manaus-Brasil. 2003.

CAVERO, B. A. S.; ITUASSÚ, D. R.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; BORDINHON, A. M.; FONSECA, F. A. L.; ONO, E. A. Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1011-1015. 2003.

CASCUDO, L. D. C. **História da alimentação no Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, Volume 323 – A. 1968

CASTELLO, L. A Method to count pirarucu, *Arapaima gigas*: fishers, assessment, and management. **North American Journal of Fish Management**, v. 24, p. 379–389. 2004.

CHAGAS, E.C.; MESQUITA-SAADE, L. F. B.; ARIDE, T. H. R.; MENDES, F. A.; ALMEIDA- VAL, V. M. A. F.; VAL, A. L., 2003. **Vitamins C, D and E in fish**. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Adaptation*. Science Publishers, USA, pp. 141–178.

CHU-KOO, F.; DUGUÉ, R.; AGUILAR, M. A.; DAZA, A. C.; BOCANEGRA, F. A.; VEINTEMILLA, C. C.; DUPONCHELLE, F.; RENNO, J. F.; TELLO, S.; NUÑEZ, J. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 125–136, 2008.

COLOMBO, R. E.; WILLIS, P. S.; GARVEY, J. E. Use of ultrasound imaging to determine sex of shovelnose sturgeon. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 24, n. 1, p. 322–326, 2004.

CRAIG, A.D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annual Review of Neuroscience**, v. 26, p. 1–30, 2003.

CRESCÊNCIO, R.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; PEREIRA FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; GANDRA, A. L. Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.12, p.1217-1222, 2005.

CUNICO, A. M.; GRAÇA, W. J.; VERÍSSIMO, S.; BINI, L. M. Influência do nível hidrológico sobre a assembléia de peixes em lagoa sazonalmente. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 383-389, 2002.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364, 2002.

ESCORVO, J. D. 2004. **O agronegócio da aqüicultura: perspectivas e tendências**. (Zootecnia e o Agronegócio – Zootec. Brasília, 28-31 maio 2004). Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/agronegocio_aquicultura.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2007.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995

FONTENELE, O. Contribuição para o Conhecimento da Biologia do Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 8, n. 166, p. 237-251. 1948.

FONTENELE, O.; VASCONCELOS, E. A. O pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817), nos açudes do Nordeste: Resultados de sua aclimação e prováveis causas de depleção de seus estoques. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v.1, n.40, p.43–66, 1982.

FOSTER, G. D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation: Principles and Practice**. England: John Wiley & Sons, 1996. 426 pp

FROEHLICH, F.; GONVERS, J. J.; DUBOIS, R. W.; BURNAND, B. Appropriateness of gastrointestinal endoscopy: risk of complications. **Endoscopy**, v. 31, p. 684– 686, 1999.

FROESE, R.; C. PAPASISI. The use of modern relational databases for identification of fish larvae. **Journal Applied Ichthyology**. v. 6, p. 37-45, 1990.

GONÇALVES, A. F. N.; SANTOS, E. C. C.; FERNANDES, J. B. K.; TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **ActaScientiarum. Animal Science**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GONÇALVES, M. M.; LEMOS, M. V. F.; FREITAS, P. D.; FURTADO NETO, M. A. A. Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (*Penaeidae*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n.2, p. 267-270, 2005.

GUERRA, H. **Manual de producción y manejo de alevinos de Paiche**. Instituto de investigaciones de la amazonia peruana. IAP 20 años. EdiT.. Pueblo Libre, Lima, Perú, 2002. 98p

GREENWOOD, P. H.; ROSEN, D. E.; WEITZMAN, S. H.; MYERS, G. S. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 131, n. 4, 1966.

HACKBARTH, A.; HONORATO, C. A.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Perfil lipídico de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido a diferentes velocidades de natação contínua. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., Mato Grosso do Sul. *Anais...* Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2007.

HAMMER, S.A.; BLANKENSHIP, H. L. Cost comparison of marks, tags, and mark with-tag combinations used in salmonid research. **North. American Journal Aquaculture**, v. 63, p. 171–178, 2001.

- HARDING, G. C.; KENCHINGTON, E. L.; BIRD, C. J.; PEZZACK, D. S.; LANDRY, D. C. Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. **Canadian of Journal Fisheries Aquatic Science**, v. 54, p. 1762-1771, 1997.
- HARVEY, B; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. 1993 Disponível em: < www.cbra.org.br >. Acessado em 03/07/07
- HERNANDEZ-DIVERS, S.M.; DOVER, S. R.. Endoscopic sex determination and gonadal manipulation in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). Journal of Zoology and Wild life Medicine, v. 35, p. 459-470, 2004.
- HILL, M. S.; ZYDLEWSKI, G. B.; ZYDLEWSKI, J. D.; GASVODA J. M., Development and evaluation of portable PIT tag detection units: PITpacks. **Fisheries Research**, v.77, p. 102-109, 2005.
- HOLLAND, K. N.; KAJIURA, S. M.; ITANO, D. G. Tagging techniques can elucidate the biology and exploitation of aggregated pelagic species. **Am. Fish. Soc. Symp**, v. 25, p. 211-218, 2001.
- HOLM, S.; BRUNGOT J, A. R.; LARS, H. V.; KAI, M. K., 2006. Acoustic passive integrated transponders for fish tagging and identification. **Aquacultural Engineering** v. 36, p.122-126, 2007.
- HURVITZ, A.; JACKSON, K.; DEGANI, G.; LEVAVI-SIVAN, B. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. **Aquaculture**, v. 270, p. 158-166, 2007.
- IMBIRIBA, E. P. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazonica**, v.31, p. 299-316, 2001.
- KUCHERKA, W. D.; KHAN, I. A. Sex steroids for gender identification in red drum, *Sciaenopsocellatus*. **World Aquaculture**. v. 38, p. 53-65, 2007.
- KEEGAN, R. D. 2005. Inhalant anesthetics: The Basics. In: R.D. Gleed (ed.). *Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: pets*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org); No. A1402.1005 document. 12 p.

KYNARD, B.; KIEFFER, M. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, p. 505–508, 2002

LAM, T. J. Environmental influences on gonadal activity in fish. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1983. cap. 2, p. 99-101.

LI, G. Q.; WILSON, M. V. H.; GRANDE, L. Review of Eohiodon (Teleostei: Osteoglossomorpha) from Western North America, with phylogenetic reassessment of Hiodontidae. **Journal Paleontology**, n.71. p.1109-1124, 1997.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; CANIGUERAL, S. Essential oils of *Mentha pulegionand* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 1-6, 2002.

MARTINS, C.; PORTO-FORESTI, F.; WASKO, A. P.; LEITÃO, G. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Marcadores Genéticos e sua Aplicação na Piscicultura. **Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento**. v. 28. p. 12-15, 2002.

MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; ROMMENS. M. Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of fish using ultrasonography. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 113-120, 2001.

MENEZES, R. S.. **Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu**. Série Estudos Técnicos. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, n. 3. 1951.

MONTEIRO, L. B. B. **Caracterização do crescimento, reprodução e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro**. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca, Pernambuco, 2005.

MOREIRA, A. G.L.; TEIXEIRA, E. G.; CARREIRO, C. R.P.; MOREIRA R. L. 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 Science**, v. 32, n. 4, p. 419-423, 2010.

MOGHIM, M.; VAJHI, A. R.; VESHKINI, A.; MASOUDIFARD, M. Determination of sex and maturity in *Acipenser stellatus* by using ultrasonography. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, p. 325-328, 2002.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v. 55, p. 335-350, 1987.

NEWMAN, M. D.; LONES, P. L.; INGRAM, B. Sexing accuracy and indicators of maturation status in captive Murray cod *Maccullochella peelii peelii* using non-invasive ultrasonic imagery. *Aquaculture*, v. 279, n. 1-4, p. 113-119, 2008.

OLIVEIRA, C. E. PISCICULTURA AMAZÔNICA. A VEZ DO MAR, Rio de Janeiro, V.23, N 188. P 104-106, fev., 1944.

OLIVEIRA, S. N.; RIBEIRO, R. P.; OLIVEIRA, C. A. L.; KUNITA, M. N.; YOSHIDA, G. M.; CASTRO, S. E. **Estimativa de componentes de (co) variância e parâmetros genéticos para características de desempenho de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010. Maringá. *Anais...* Maringá, 2010.

ONO, E. A.; NUNES, E. S. S.; CEDANO, J. C. C.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações energia:proteína em juvenis de pirarucu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 249-254, 2008.

ORTENBURGER, A. I.; JANSEN, M. E.; WHYTE, S. K. Nonsurgical videolaproscopy for determination of reproductive status of the arctic charr. **Canadian Veterinary Journal**, v. 37, p. 96-100, 1996.

PATEL, T.; ISHIUJI, Y.; YOSIPOVITCH, G. Menthol: A refreshing look this ancient compound. **American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 873-878, 2007

PARK, I. S.; PARK, M. O.; HUR, J. W.; KIM, D. S.; CHANG, Y. J.; KIM, Y. J.; PARK, J. Y.; JOHNSON, S. C. Anesthetic effects of lidocaine-hydrochloride on water parameters in simulated transport experiment of juvenile winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 76-79, 2009.

PEREIRA-FILHO, M., **Engorda do Pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado**. INPA. Manaus, Brasil 2002.

QUEIROZ, H. L.; SARDINHA, A. D. A preservação e o uso sustentado dos pirarucus em Mamirauá. In: QUEIROZ, H.L.; CRAMPTON, W.G.R. (Ed.). **Estratégias para manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá; CNPq, 1999. p.108-141.

REIMERS E.; LANDMARK P.; SORSDAL T.; BOHMER E.; SOLUM T. Determination of salmonids sex, maturation and size: An ultrasound and photocell approach. **Aquaculture Magazine**, Nov./Dec, p. 41-44, 1987.

RIBEIRO, P. R.; JÚNIOR, D. P. S.; POVH, J., A.; SIROL, R. N.; URIBE, L.; VARGAS, L. D. M.; BAREIRO, N. M. L.; GOMES, P.; DIGMAYER, M. **Modelo de manejo e monitoramento para programas de repovoamento de espécies de peixes nativas migradoras**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., Mato Grosso do Sul. *Anais...* Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2007.

ROSS, L.G.; Ross, B. 2008. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Science. 3rd edition, 236 p.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo. Ed. Roca. 6o ed, 1994. 1056p.

SAAVEDRA-ROJAS, E.; QUINTERO-PINTO, L.; LANDINES PARRA, M. 2005. **Reproductive aspects: Biology and cultivation of pirarucu, Arapaima gigas** (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae): INCODER-UNC, Bogota, Colômbia, 109 p. (in Spanish).

SAINT-PAUL, U.. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.

SOARES, E. C.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; SILVA, R. C. S. Condicionamento alimentar no desempenho zootécnico do tucunaré. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, p. 35-48, 2007.

STRANGE, R. J. 1996. **Field examination of fishes**. Pages 433– 446 *In* B.R. Murphy and D.W. Willis, editors. Fisheries echniques, 2nd edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

SWENSON E, A.; ROSENBERGER, A. E.; HOWELL, P. J. Validation of endoscopy for determination of maturity in small salmonids and sex of mature individuals. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 136, p. 994–998, 2007.

SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L.S. 1990. **Anesthesia, surgery, and related techniques**. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, pp. 213–272.

TANSKLEY, S. D.; HEWITT, J. D. Use of molecular markers in breeding for soluble solids in tomato – a re-examination. *Theoretical Applied Genetics*, v. 75, p. 811-823, 1988.

TRAVADE, F.; BOMASSI, P.; BACH, J. M.; BRUGEL, C.; STEINBACK, P.; LUQUET, J. F. & G. PUSTELNICK. – “Use of radiotracking in France for recent studies concerning the EDF fishway program”. *Hydroécol. Appl*, v. 1-2, p. 33-51, 1989.

TURRA, E. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, E. A.; PRADO, S. A.; MELO, D. C.; SOUSA, A. B. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.1, p.29-36, 2010.

VAZ, L. A. L.; CARREIRO, C. R. P.; GOULART-FILHO, L. R.; FURTADO NETO, M. A. A. . Relações Filogenéticas em Raias (*Dasyatis*, *Elasmobranchii*) do Estado do Ceará, Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 39, p. 86-88, 2006.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; MACÊDO, G. R. Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *ActaScientiarum. Biological Sciences*, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.

WALKER, M. R. **Guia de Rotas da Tecnologia do Gene**. Tradução de Fernando Salvador Moreno. São Paulo: Atheneu, 1999. 334 p.

WEBB, M. A. H.; FEIST, G. W.; FOSTER, E. P.; SCHRECK, C. B.; FITZPATRICK, M. S.. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 131, p. 132–142. 2002

WILDHABER, M. L.; PAPOULIAS, D. B.; DELONAY, A. J.; TILLITT, D. E; BRYAN, J. L; ANNIS, M. L; ALLERT, J. A. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to pallid sturgeon. *Journal of Fish Biology*, v. 67, p. 114–132, 2005.

WILLIAMS, D. J.; KAZIANIS, S.; WALTER, R. B. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. *Transactions of the American Fisheries Society*. v. 127, n. 5, p. 825-832, 1998.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture*, v. 295, p. 52-59, 2009.