



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

ERIVÂNIA GOMES TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO  
CULTIVADA NO ESTADO DO CEARÁ

FORTALEZA  
2013

ERIVÂNIA GOMES TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO  
CULTIVADA NO 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: Biotecnologia de Recursos Aquáticos

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Silvana Saker-Sampaio

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley

FORTALEZA  
2013

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

- 
- T265c      Teixeira, Erivânia Gomes.  
              Caracterização e criopreservação de sêmen de tilápia-do-Nilo cultivada no Estado do Ceará /  
Erivânia Gomes Teixeira. – 2013.  
              92 f. : il. color., 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, 2013.  
              Área de Concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.  
              Orientação: Profa. Dra. Silvana Saker-Sampaio.  
              Coorientação: Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley.
1. Tilápia (Peixe) - Espermatozoides. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. I. Título.

---

CDD 639.2

ERIVÂNIA GOMES TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO  
CULTIVADA NO ESTADO DO CEARÁ

Tese 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: Biotecnologia de Recursos Aquáticos

Aprovada em 22/02/2013

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup> Silvana Saker Sampaio, PhD (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup> Carmindia Sandra Brito Salmito-Vanderley, DSc

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>ª</sup> Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, DSc

Universidade Potiguar - Renorbio

---

Prof<sup>ª</sup> Helena Mathews-Cascon, PhD

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Alexandre Holanda Sampaio, PhD

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, à minha família, aos meus amigos e a Peiroll Vismara pelo amor, apoio, incentivo e amizade.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação, pelo auxílio concedido na forma de Bolsa de Doutorado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) do Governo do Estado do Ceará, pelo apoio financeiro ao Projeto.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca que comigo compartilharam do seu saber.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) pela concessão da estrutura logística e laboratorial, sem a qual não seria possível a execução desta Tese.

Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) por ter cedido o material biológico necessário para realização dos experimentos que compõem esta Tese.

À professora, orientadora e amiga, Silvana Saker Sampaio, pelo apoio e suas o hifemvaliosas orientações nas mais diversas áreas de conhecimentos.

À professora Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley, da Universidade Estadual do Ceará, pelo apoio científico e logístico, assim como pelo entusiasmo com que acompanhou a realização deste estudo.

À mestre em reprodução animal, Liliane Veras Leite, pela valiosa colaboração no desenvolvimento das pesquisas dessa Tese.

Aos meus amigos Antônio Glaydson L. Moreira, Francisco Roberto dos Santos Lima e Fellipy Augusto H. Chaves pela colaboração em todas as etapas desse trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho que compunham a equipe da Estação de Piscicultura Prof. Dr. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

Ao amigo Paulo Alcântara pelo apoio.

Aos membros do Núcleo Integrado de Biotecnologia da UECE, que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento da pesquisa e pelo convívio harmonioso.

Finalmente, agradeço àqueles que, de uma ou outra forma, colaboraram para a concretização deste estudo.

“A vida sem luta é um mar morto no centro do organismo universal”.

*Machado de Assis*

## RESUMO

O estudo trata da indução anestésica, caracterização do líquido seminal, refrigeração e congelamento do sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. No primeiro capítulo foram testados os anestésicos naturais mentol e eugenol em espécimes adultos objetivando determinar a concentração ideal para manejo de tilápia-do-Nilo. No segundo capítulo, o líquido seminal da tilápia-do-Nilo foi caracterizado de acordo com os seguintes parâmetros: volume coletado, que revelou a viabilidade de coleta em volumes suficientes, sem a necessidade de sacrificar o peixe; concentração espermática, que mostrou relevante variação entre espécimes; pH e osmolaridade, que ratificam as informações presentes na literatura; tempo de motilidade, que comprovou ser o espermatozoide de tilápia diferenciado quanto à energia acumulada quando comparado a outras espécies de água doce; e morfometria da cabeça do espermatozoide por meio das seguintes medidas: comprimento, largura, perímetro e área. Também foram registrados quatro parâmetros derivados do formato da cabeça: elipticidade, rugosidade, alongação e regularidade. No terceiro capítulo foi avaliada a viabilidade do sêmen de tilápia-do-Nilo submetido a diferentes diluentes e refrigerado a 4°C. A avaliação foi realizada por meio da taxa de motilidade espermática determinada pelo sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Neste, o ACP-104, diluente à base de água de coco em pó, ofereceu melhor taxa de motilidade dos espermatozoides por até 72 horas de estocagem. Esta resposta mostrou que o ACP-104 é um diluente promissor para o sêmen da referida espécie. No quarto capítulo foi avaliado o efeito de diferentes criodiluentes sobre do sêmen de tilápia-do-Nilo pós-descongelamento, utilizando o *software* (*Sperm Class Analyser*, SCA). Os resultados de motilidade espermática e de parâmetros de velocidade do espermatozoide revelaram que o ACP-104 combinado ao dimetilsulfóxido apresenta-se como um criodiluyente promissor para a criopreservação do sêmen de tilápia-do-Nilo em longo prazo.

**Palavras chave:** *Oreochromis niloticus*, indução anestésica, caracterização espermática, conservação de gametas.

## ABSTRACT

The present study deals with anesthetic induction, characterization of sperm fluid, cooling and freezing of sperm of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. In the first chapter the natural anesthetics menthol and eugenol were tested in adult specimens aiming to determine the ideal concentration for handling the Nile tilapia. In the second chapter the sperm fluid of the Nile tilapia was characterized according to the following parameters: collected volume, which showed the feasibility of collect in sufficient volume without the need of sacrificing the fish; sperm concentration, which showed significant variation between specimens; pH and osmolarity, which confirm the information of the literature; sperm motility time, which proved that the spermatozoa of tilapia are differentiated concerning accumulated energy when compared to other freshwater species; and sperm head morphometry, characterized by size (length, width, perimeter and area) and head shape (ellipticity, rugosity, elongation and regularity). In the third chapter we evaluated the feasibility of preservation of tilapia sperm using different extenders and cooled at 4°C. The sperm motility rate was evaluated with the aid of the Computer-assisted Sperm Analyzer (CASA) System. In this, the ACP-104, media based on powdered coconut water, showed best sperm motility rate for up to 72 hours after storage. In the fourth chapter was evaluated the effects of different cryoprotectants on the post-thaw Nile tilapia sperm, using the software Sperm Class Analyzer (SCA). The results of the sperm motility rate and sperm velocity parameters revealed that ACP-104 in combination with dimethylsulfoxide is a promising cryodiluent for Nile tilapia sperm in long-term conservation.

**Key works:** *Oreochromis niloticus*, anesthetic induction, sperm characterization, conservation of gametes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> .....	17
Figura 2 -	Dados oficiais da produção de tilápias no Brasil.....	18
Figura 3 -	Aspectos gerais de um indivíduo submetido a estágios de anestesia e recuperação. (a) Sedação leve. (b) Sedação profunda. (c) Narcose. (d) Anestesia profunda. (e) Anestesia cirúrgica. (f) Recuperação.....	25
Figura 4 -	Tilápia-do-Nilo em processo de indução anestésica com eugenol.....	34
Figura 5 -	Coleta de sêmen de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , em tubo de microcentrífuga (a). Coleta de sêmen utilizando micropipeta (b).....	34
Figura 6 -	Aspecto geral da amostra de sêmen de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , livre de contaminação.....	35
Figura 7 -	Gabarito de uma câmara de Neubauer (a). Esquema de contagem de espermatozoides nos cantos e centro da câmara de Neubauer (b).....	36
Figura 8 -	Detalhes da região urogenital de espécimes macho e fêmea de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> .....	38
Figura 9 -	Análise morfométrica da cabeça do espermatozoide. (a) Antes da digitalização. (b) Após a digitalização no casa.....	43
Figura 10 -	Morfometria do espermatozoide de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> . (a) Comprimento. (b) Largura (c) Perímetro (d) Área.....	44
Figura 11 -	Micrópila do óvulo de tilápia-do-Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> .....	47
Figura 12 -	Apresentação do ACP – Água de coco em pó.....	52
Figura 13 -	Câmara de Makler para observação da motilidade do sêmen refrigerado de tilápia-do-Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> .....	55
Figura 14 -	Taxa de motilidade de sêmen de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , diluído e refrigerado a 4°C nos diferentes intervalos de tempo.....	57
Figura 15 -	Espermatozoides de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> com velocidade rápida ou média nos diferentes intervalos de tempo, submetidos à refrigeração (4°C).....	59
Figura 16 -	Equipamento para congelamento de sêmen - <i>Dry shipper</i> .....	63
Figura 17 -	Imagem captada do monitor do sistema CASA no momento da análise de motilidade espermática.....	68

Figura 18 - Velocidades medidas pelo sistema CASA. VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade linear progressiva; VAP = velocidade média da trajetória.....	69
Figura 19 - Palhetas transparentes de 0,5 mL utilizadas para criopreservação de sêmen de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais espécies produzidas no Brasil (toneladas).....	19
Tabela 2 -	Estágios de anestesia em peixes.....	24
Tabela 3 -	Eventos comportamentais (em segundos) de adultos de tilápia-do-Nilo, expostos a diferentes concentrações de mentol <sup>(1)</sup> .....	28
Tabela 4 -	Eventos comportamentais (em segundos) de adultos de tilápia-do-Nilo expostos a diferentes concentrações de eugenol <sup>(1)</sup> .....	28
Tabela 5 -	Formato da cabeça do espermatozoide analisado pelo <i>Computer Assisted Semen Analysis (CASA)</i> .....	38
Tabela 6 -	Amostras de sêmen de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , livres de contaminação de acordo com o método de coleta empregado. Amostra contaminada (X). Amostra não contaminada (O).....	40
Tabela 7 -	Estatística descritiva das características seminais (n=20) de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> .....	42
Tabela 8 -	Valores médios (média $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros morfométricos obtidos da cabeça do espermatozoide de tilápia-do-Nilo.....	44
Tabela 9 -	Diluentes utilizadas em peixes.....	50
Tabela 10 -	Formas de utilização de água de coco na preservação de sêmen de diversas espécies.....	51
Tabela 11 -	Motilidade (%; média $\pm$ desvio padrão) do sêmen de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , diluído em diferentes soluções e armazenado a 4-6°C por até 72 horas.....	58
Tabela 12 -	Criodiluidores usados para diferentes espécies de peixes.....	65
Tabela 13 -	Motilidade (%; média $\pm$ desvio padrão) de espermatozoides pós-descongelamento de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , usando quatro diluentes associados a dois crioprotetores através da avaliação objetiva.....	73
Tabela 14 -	Parâmetros de velocidade do espermatozoide de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , pós-descongelamento.....	75

## LISTA DE SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
ACP-104	Água de coco em pó adaptada para sêmen de peixes
ASMA	Análise da morfometria espermática assistida por computador ( <i>Automated Sperm morphology Analyses</i> )
CASA	Análise da motilidade espermática auxiliada por computador ( <i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> )
CPA	Centro de Pesquisa em Aquicultura Rodolpho 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> )
LBRP	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
SCA	Sistema de análise de sêmen auxiliado por computador ( <i>Sperm Class Analyser</i> )
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear progressiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 1 - MENTOL E EUGENOL COMO ANESTÉSICOS PARA TILÁPIA-DO-NILO, <i>Oreochromis niloticus</i>.....</b>	<b>16</b>
2.1	INTRODUÇÃO.....	16
2.1.1	<i>A aquicultura e a tilapicultura mundiais.....</i>	17
2.1.2	<i>Utilização de anestésicos na aquicultura.....</i>	19
2.1.3	<i>O mentol como anestésico.....</i>	21
2.1.4	<i>Óleo de cravo (eugenol) como anestésico.....</i>	22
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.2.1	<i>Mentol.....</i>	23
2.2.2	<i>Eugenol.....</i>	24
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.3.1	<i>Anestesia com mentol.....</i>	26
2.3.2	<i>Anestesia com eugenol.....</i>	28
2.4	CONCLUSÕES.....	30
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO- NILO <i>Oreochromis niloticus</i> USANDO ANÁLISE COMPUTADORIZADA.....</b>	<b>31</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	31
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.2.1	<i>Métodos de coleta.....</i>	33
3.2.2	<i>Caracterização do sêmen.....</i>	35
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.3.1	<i>Métodos de coleta.....</i>	38
3.3.2	<i>Caracterização do sêmen de tilápia.....</i>	40
3.4	CONCLUSÕES.....	45
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 3 - RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO- NILO UTILIZANDO ACP® COMO DILUIDOR.....</b>	<b>46</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	46
4.1.1	<i>Conservação de sêmen sob refrigeração.....</i>	48
4.1.2	<i>Soluções diluentes.....</i>	48

4.1.3	<i>Água de coco em pó – ACP</i> .....	50
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.2.1	<i>Diluentes e Ativador</i> .....	53
4.2.2	<i>Coleta e Avaliação do sêmen</i> .....	54
4.2.3	<i>Refrigeração do sêmen</i> .....	54
4.2.4	<i>Avaliação da taxa de motilidade espermática</i> .....	55
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.4	CONCLUSÕES.....	60
	<b>CAPÍTULO 4 – CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TILAPIA-</b>	
<b>5</b>	<b>DO-NILO UTILIZANDO ACP-104 ADICIONADO DE</b>	
	<b>CRIOPROTETOR</b> .....	61
5.1	INTRODUÇÃO.....	61
5.1.1	<i>Criopreservação</i> .....	62
5.1.2	<i>Soluções crioprotetoras e Taxa de congelamento</i> .....	64
5.1.3	<i>Toxicidade dos crioprotetores</i> .....	66
5.1.4	<i>Descongelamento</i> .....	67
5.1.5	<i>Utilização da análise computadorizada para avaliação espermática</i> .....	68
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
5.2.1	<i>Coleta das amostras e Formação dos pools</i> .....	70
5.2.2	<i>Criodiluentes e Solução ativadora</i> .....	70
5.2.3	<i>Diluição, Envase e Congelamento</i> .....	70
5.2.4	<i>Descongelamento e Avaliação</i> .....	71
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.4	CONCLUSÕES.....	75
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Esta Tese de Doutorado apresenta um estudo sobre anestesia de espécimes adultos de tilápia-do-Nilo, caracterização, refrigeração e congelamento de gametas masculino da mesma espécie. A tilápia *Oreochromis niloticus*, espécie de origem africana foi introduzida no Brasil no início da década de 1970, cujo cultivo foi disseminado em todo país e atualmente ocupa a primeira posição no *ranking* nacional de espécies cultivadas.

A motivação para realização desse estudo foi a possibilidade de oferecer aos piscicultores e pesquisadores, ferramentas que possam subsidiar a implantação de um banco de sêmen, com vistas ao estabelecimento de programas de melhoramento genético de tilápia-do-Nilo. Também foi considerada a necessidade do estabelecimento de técnicas que facilitem seu manejo durante procedimentos laboratoriais, sem prejuízos à sanidade do animal.

A Tese está apresentada em quatro capítulos. O primeiro descreve os resultados obtidos em testes de anestesia com espécimes adultos de tilápia. Foram testados dois fármacos naturais, o mentol e o eugenol, em diferentes concentrações. Os estágios de anestesia aos quais os peixes foram induzidos foram devidamente identificados e cronometrados. Também foram monitorados os intervalos de tempo necessários para a completa recuperação dos animais. De posse desses dados, foram estabelecidos protocolos de indução anestésica de tilápia-do-Nilo com os referidos fármacos naturais.

O segundo capítulo descreve o sêmen da tilápia quanto ao volume coletado, pH e osmolaridade, objetivando facilitar a formulação de diluentes e criodiluentes adequados para a espécie. O espermatozoide também foi estudado quanto à morfometria da cabeça, informação importante para o bom desempenho da fertilização de ovócitos. Ainda nesse capítulo foi determinada a concentração do sêmen de tilápia, dado que permite o estabelecimento adequado da relação de sêmen/óvulo. Foi ainda determinado o tempo de motilidade espermática, mostrando que a tilápia possui espermatozoides com grande período de motilidade. Essas informações podem contribuir para a seleção de reprodutores como indicadores de qualidade.

O terceiro capítulo apresenta os resultados obtidos em testes de refrigeração do sêmen de tilápia adicionado de diferentes diluentes, com destaque para a água de coco em pó (ACP-104). A eficácia dos diluentes foi verificada por meio da taxa de espermatozoides móveis e pela porcentagem de células com velocidade média e rápida. Os resultados obtidos nesse capítulo apontam o ACP-104 como potencial diluente, para o desenvolvimento de técnicas de criopreservação de células espermáticas de tilápia-do-Nilo e subsidiar o

estabelecimento de um programa de melhoramento genético da espécie na região Nordeste do Brasil.

No quarto capítulo são relatados os resultados da congelação do sêmen de tilápia-do-Nilo utilizando os diluentes glicose, ACP-104, ringer e sacarose combinados aos crioprotetores DMSO (dimetilsulfóxido) e DMA (dimetilacetamida). Nesse capítulo, a eficácia do criodiluentes é verificada através da taxa de motilidade espermática e de parâmetros de velocidade do espermatozoide.

O objetivo geral desta Tese foi desenvolver protocolos para fornecer tecnologias na área de manejo e conservação de células espermáticas de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* utilizando diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104). Os objetivos específicos dessa Tese foram: determinar a concentração recomendada dos fármacos naturais mentol e eugenol para anestesia de espécimes adultos de tilápia-do-Nilo, caracterizar o sêmen de tilápia-do-Nilo e testar o ACP-104 como diluente para manutenção das células reprodutivas masculinas em refrigeração, bem como verificar a eficácia do ACP-104 adicionado de diferentes crioprotetores.

## **CAPÍTULO 1 - MENTOL E EUGENOL COMO ANESTÉSICOS PARA TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus***

Este capítulo apresenta a utilização de fármacos naturais mentol e eugenol como anestésicos, e os resultados obtidos para indução ao estágio de anestesia adequado para facilitar o manejo de espécimes adultos de tilápia-do-Nilo.

### **2.1 INTRODUÇÃO**

O objetivo da disseminação das tilápias pelo mundo, originalmente, foi a criação de peixes para subsistência em países em desenvolvimento, no entanto devido a sua facilidade de reprodução, rusticidade, tolerância à ampla variação de qualidade de água, salinidade e temperatura além de boa aceitação no mercado (KHAW; PONZONI; DANTING, 2008). Este grupo de peixes perde somente para as carpas em termos de produção mundial (FAO, 2008).

Tilápia é a denominação comum de grande parte das espécies pertencentes à família Cichlidae, são oriundas da África, e distribuem-se originalmente do centro-sul da África até o norte da Síria (POPMA; PHELPS, 1998). São amplamente cultivadas em mais de 100 países das regiões tropical e subtropical (EL-SAYED; MANSOUR; EZZAT, 2005; ROMANA-EGUIA *et al.*, 2004) ocupando diversos nichos ecológicos. Aproximadamente 22 espécies de tilápias são cultivadas comercialmente no mundo, destacando-se a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia mossâmbica (*O. mossambicus*), a tilápia azul (*O. aureus*), além de *O. macrochir*, *O. hornorum*, *O. galilaeus*, *Tilapia zillii* e *T. rendalli*, como as espécies de maior preferência para o cultivo (EL-SAYED, 1999).

Pesquisas relacionadas ao cultivo de tilápia datam do início do século XIX, quando despertaram o interesse devido sua adaptabilidade e características ideais para a piscicultura rural. A partir de 1924 o cultivo de tilápia se intensificou no Quênia, no entanto foi na Malásia onde se obteve os melhores resultados e se iniciaram seu progressivo cultivo (CASTILLO, 2001).

Em 1939, a tilápia *O. mossambicus* foi a primeira espécie a ser exportada e introduzida, inicialmente na Indonésia e posteriormente, nas décadas de 1950 e 1960, em vários outros países, principalmente nas Américas (LOVSHIN, 1997). Porém, esta espécie demonstrou baixo desempenho para utilização na aquicultura, e o entusiasmo por esta cultura como fonte de alimento diminuiu com o problema de superpopulação e reprodução precoce em viveiros (LAZARD; ROGNON, 1997; POPMA; PHELPS, 1998). Entretanto, no final dos

anos 70, a espécie *O. niloticus* (Figura 1), oriunda do leste africano, demonstrou alto potencial para a aquicultura, em vários sistemas de criação (LAZARD; ROGNON, 1997).

Figura 1 - Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.



Fonte: <http://www.pisciculturasaojeronimo.com.br/portfolio/tilapia-nilotica/>.

A classificação taxonômica da tilápia-do-Nilo é a seguinte:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Classe: Osteichthyes

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Subfamília: Pseudocrenilabrinae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *O. niloticus*

Linnaeus, 1758

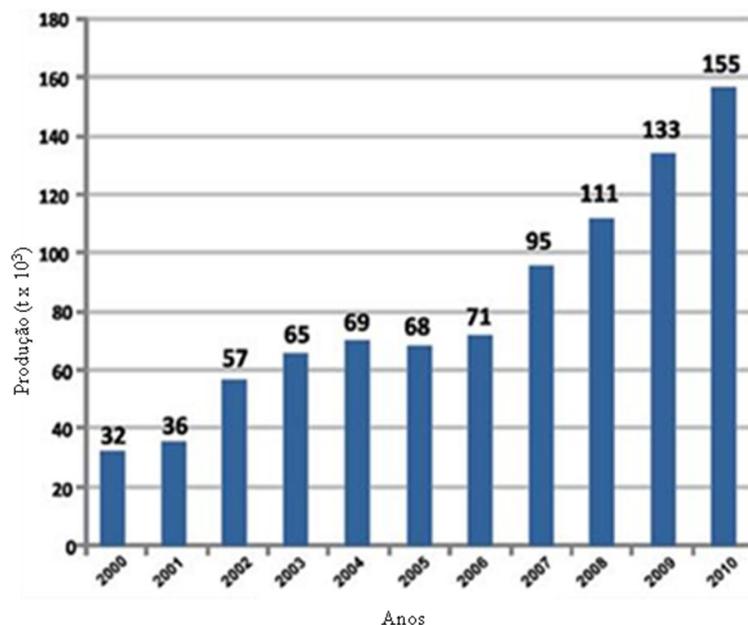
### ***2.1.1 A aquicultura e a tilapicultura mundiais***

A aquicultura mundial cresceu rapidamente nos últimos cinquenta anos contribuindo com o suprimento global de pescado, passando de 3,9% da produção total em peso, em 1970 para aproximadamente 41% em 2011 (FAO, 2012). Esta atividade é um dos sistemas de produção de alimento que mais cresce no mundo, sendo a piscicultura de água

doce uma das mais promissoras, principalmente no que diz respeito ao cultivo de tilápia. De acordo com a FAO (2012), a produção mundial de pescado em 2010 foi de 148,5 milhões de toneladas, sendo que a aquicultura correspondeu a 40,4% desse total, ou seja, 59,9 milhões de toneladas. Na década de 1980, 9% do pescado consumido eram provenientes da aquicultura e, nas três últimas décadas (1980 a 2010), a produção aquícola para consumo humano incrementou aproximadamente 12 vezes, a uma taxa média anual de 8,8% (FAO, 2012; FARIA *et al.*, 2009).

O Brasil detém 13% da água doce do mundo além de um litoral de mais de 8.500 km. Este potencial justifica o crescimento da aquicultura brasileira, com uma média de 18,1% ao ano no período de 1990 a 2009 atingindo, em 2010, 479.398 toneladas representando 38% da produção nacional do pescado naquele ano, desse total, 82% vêm da piscicultura em água doce (MPA, 2012), sendo a tilápia responsável por 155.450 toneladas (Figura 2). A produção dessa espécie cresceu em média 17% ao ano, entre 2000 e 2010, enquanto que a aquicultura cresceu, nesse mesmo período, em média 10% (KUBITZA *et al.*, 2012).

Figura 2 - Dados oficiais da produção de tilápias no Brasil.



Fonte: IBAMA até 2007; MPA a partir de 2008.

A produção mundial de tilápia nos últimos anos foi influenciada fortemente pela rápida expansão da espécie *O. niloticus*, cultivada na China, nas Filipinas, na Tailândia, na Indonésia e no Egito (WAGNER *et al.*, 2004). A China possui tradição milenar em

aquicultura e em 2008 produziu 45% da produção mundial de tilápia (LIPING *et al.*, 2012), tendo incrementado a exploração desta atividade a partir da década de 1970.

No Brasil, a tilápia lidera a produção total de pescado de águas continentais com um crescimento de 40% entre os anos de 2007 e 2009 (Tabela 1). Os cultivos de tilápia se intensificaram particularmente no Nordeste e Sudeste do Brasil, tendo como fatores decisivos em sua expansão a produção massiva de alevinos sexualmente revertidos, a introdução de linhagens com melhor qualidade genética, o cultivo em tanques-rede, a elaboração de rações de boa qualidade, a utilização dos grandes reservatórios do país e a elaboração de produtos diferenciados como o filé (KUBITZA *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Principais espécies produzidas no Brasil (toneladas).

Espécies	2007	2009	Crescimento (%)
Tilápia	95.081	132.957	40
Carpa	36.631	60.695	66
Tambaqui	30.598	46.454	52
Tambacu	10.854	18.492	70
Pacu	12.397	18.171	47

Fonte: MPA (2010).

A região Nordeste vem liderando o cultivo da espécie desde 2003, indicando claramente uma tendência de crescimento ancorada nas suas condições climáticas, na disponibilidade de tecnologia de cultivo e em um mercado crescente de consumo da tilápia em nível regional e nacional (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Em 2004 o Ceará consolidou sua liderança como produtor de tilápia, aumentando para 18.000 toneladas sua produção, distanciando-se ainda mais do segundo produtor, ao produzir 6.000 toneladas a mais que o Paraná (IBAMA, 2007), e a expectativa para 2012 é que a produção alcance 30.000 toneladas, mantendo a taxa de expansão dos últimos anos (MAZZA, 2012). Este rápido crescimento fez com que os produtores sentissem a necessidade de maior organização da cadeia produtiva e, portanto, a realização de mudanças em seus vários elos, desde a produção, passando pelo processamento, uso de tecnologias e aplicação da biotecnologia para obtenção de melhor resposta econômica e facilidade de manejo.

### 2.1.2 Utilização de anestésicos na aquicultura

Substâncias anestésicas são utilizadas na aquicultura e em trabalhos experimentais para reduzir a atividade dos peixes durante o transporte, pesagem, extrusão de gametas, marcação, além de outras manipulações (GRUSH; NOAKES; MOCCIA, 2004; PIRHONEN; SCHRECK, 2002; VIDAL *et al.*, 2006). A escolha do anestésico geralmente depende de considerações tais como: disponibilidade, custo-benefício, facilidade de uso e possíveis efeitos colaterais aos peixes, aos seres humanos e ao meio ambiente (CHO; HEATH, 2000; MARKIN; MAYER, 1985).

O fármaco deve ser solúvel em água. No entanto, alguns necessitam primeiramente, ser dissolvidos em um solvente orgânico para reduzir seu caráter hidrofóbico (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009). Em peixes, os anestésicos geralmente são ministrados através de banhos de imersão e entram no sistema circulatório do animal através das brânquias e pele, bloqueando algumas ações reflexas (SUMMERFELT; SMITH, 1990 *apud* DELBON, 2006). No entanto as brânquias consistem na principal via de entrada e excreção de anestésicos e qualquer fator que afete a ventilação branquial como a temperatura, por exemplo, pode comprometer a eficácia do anestésico e a eliminação dos resíduos (DELBON, 2006; HIKASA *et al.*, 1986). O tempo necessário para a total eliminação residual depende do tipo de droga utilizada, da espécie e da concentração, que pode ser de algumas horas a várias semanas (ROSS; ROSS, 2008). Estes resíduos podem, principalmente, afetar o sabor natural do peixe, quando forem consumidos.

O anestésico ideal deve produzir anestesia em até três minutos e recuperação em menos de cinco, não apresentar toxicidade aos peixes durante o tratamento, não apresentar problema de segurança para mamíferos, deixar pouco resíduo após período de depuração de uma hora ou menos, e ter custo acessível (MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008). Porém, alguns inconvenientes quanto ao uso destes produtos podem ser observados como a perda de muco, irritações das brânquias e danos na córnea (INOUE; SANTOS-NETO; MORAES, 2003).

A eficácia das substâncias anestésicas varia dentre e entre espécies e de acordo com a influência de fatores bióticos e abióticos. Peixes com tamanho, idade e sexo diferentes podem responder de forma contrária a uma concentração em particular. Estas respostas também podem ser influenciadas por fatores tais como pH, salinidade, temperatura e nível de oxigênio dissolvido na água (PARK *et al.*, 2008; ZAHL *et al.*, 2009). Diferentes anestésicos exigem concentrações diferentes para induzir ao estágio de anestesia desejado, justificando,

assim, a necessidade da determinação de concentrações adequadas para a espécie de interesse de acordo com o procedimento a ser realizado.

Durante a indução anestésica, o peixe passa sequencialmente por alguns estágios de anestesia. No entanto, ocorrem variações nas diferentes espécies, no tipo de anestésico empregado e na dose aplicada. Alguns estágios comumente descritos não ocorrem no processo anestésico de certos peixes. Roubach *et al.* (2005) descreveram cinco estágios de indução anestésica quando utilizaram eugenol para anestésiar tambaqui *Colossoma macropomum* enquanto que Weber *et al.* (2009) identificaram três estágios durante a indução de *Solea senegalensis* com diferentes anestésicos. Mundialmente, vários estudos já foram realizados com diferentes substâncias anestésicas mostrando sua eficácia (IVERSEN *et al.*, 2003; KEENE *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2008; TSANTILAS *et al.*, 2006), seus efeitos fisiológicos (COOKE *et al.*, 2004; COTTER; RODNICK, 2006; ORTUÑO; ESTEBAN; MESEGUER, 2002) e o processo de recuperação dos peixes (INOUE; SANTOS-NETO; MORAES, 2003; VIDAL *et al.*, 2007).

A anestesia de tilápia durante o manuseio é importante, uma vez que os raios duros que formam a nadadeira dorsal desta espécie facilmente ocasionam ferimentos aos operadores e aos outros peixes, caso não estejam anestesiados. Ainda, o mercado de carnes para exportação pode no futuro solicitar práticas de manejo sem estresse ou com estresse mínimo (SIMÕES; GOMES, 2009). Outro importante motivo para se desenvolver protocolos de anestesia para esta e outras espécies de peixe é que os comitês de ética em experimentação com animais estão solicitando procedimentos que diminuam o estresse ou proporcionem sofrimento mínimo aos animais.

### **2.1.3 O mentol como anestésico**

O mentol é um óleo essencial extraído de plantas do gênero *Mentha* (PATEL; ISHIUJI; YOSIPOVITCH, 2007), com conhecida propriedade anestésica (RUPPERT; BARNES, 1994) e anti-inflamatória (LORENZO *et al.*, 2002). De acordo com estudos realizados pelo *National Cancer Institute*, o mentol não apresenta efeitos carcinogênicos quando testado em ratos e camundongos (NCI, 1979). Gelal (2008) classifica este fármaco como álcool terpeno monocíclico, constituinte principal do óleo essencial da menta (*Mentha* spp.), amplamente empregado na indústria de cosméticos, farmacêuticos, de higiene pessoal (GELAL, 2008; LORENZO *et al.*, 2002).

Os estudos sobre o uso de substâncias naturais, como o mentol, para anestésico em aquicultura têm origem na necessidade de se encontrar produtos alternativos eficazes em substituição aos anestésicos sintéticos legalmente utilizados. Estas substâncias naturais, geralmente apresentam baixo custo e fácil aquisição (ROUBACH *et al.*, 2005).

O mentol tem sido testado com sucesso como anestésico para algumas espécies de peixes tais como: tambaqui, *Colossoma macropomum* (FAÇANHA; GOMES, 2005); pacu, *Piaractus mesopotamicus* (GONÇALVES *et al.*, 2008); dourado, *Salminus brasiliensis* (PADUA *et al.*, 2010) e robalo, *Centropomus parallelus* (SOUZA *et al.*, 2012). Porém, as pesquisas utilizando o mentol como anestésico para organismos aquáticos ainda são poucas.

#### **2.1.4 Óleo de cravo (*eugenol*) como anestésico**

O óleo de cravo é extraído do caule, das flores e das folhas das espécies *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica* e tem como princípio ativo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), considerado seguro para humanos, animais e ambiente. O eugenol é utilizado como flavorizante na indústria alimentícia e como agente analgésico, antibacteriano, antifúngico, antiviral e anestésico local na odontologia (GRIFFITHS, 2000; KEENE *et al.*, 1998; ROSS; ROSS, 2008). De acordo com Yang *et al.* (2003), o eugenol provoca depressão do sistema nervoso central por meio da interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, é agonista sobre o ácido gama-amino-butírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).

O óleo de cravo tem sido amplamente testado com sucesso como anestésico para diversas espécies de peixes de água doce (HAJEK; KLYSZEJKO; DZIAMAN, 2006; OKAMOTO *et al.*, 2008; ROUBACH *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007) e marinhas (COOKE *et al.*, 2004; IVERSEN *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009). Sua eficiência e segurança para anestesia estão descritas na literatura para várias espécies de peixes, tanto para o manejo nas condições de criação intensiva, quanto nas pesquisas em laboratório (DERIGGI *et al.*, 2006; GUÉNETTE *et al.*, 2007; RIBAS *et al.*, 2007).

O experimento descrito neste capítulo teve como objetivo geral o desenvolvimento de protocolos de anestesia para adultos de tilápia-do-Nilo. Os objetivos específicos foram determinar a concentração recomendada dos fármacos naturais mentol e eugenol para anestesia de espécimes adultos de tilápia-do-Nilo.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento foram testados dois anestésicos no período de dezembro de 2008 a março de 2009, na Estação de Piscicultura Prof. Dr. Raimundo Saraiva da Costa, pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará e no Centro de Pesquisa em Aquicultura (CPA) do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (Pentecoste, Ceará) onde os peixes foram adquiridos.

Foram utilizados 144 espécimes de tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, variedade chitralada, nunca expostos a anestésico anteriormente. Os peixes foram divididos em dois tratamentos: T1 – testes com mentol; e T2 – testes com eugenol. Para aclimação dos animais, foram utilizados tanques providos de aeração constante. Durante cinco dias os peixes foram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia com ração comercial com 28% de proteína bruta. Todos os indivíduos obedeceram a um jejum de 24 horas antes da realização dos experimentos e foram avaliados diariamente quanto à atividade, aparência externa e alimentação.

### 2.2.1 Mentol

O peso médio dos indivíduos utilizados no T1 foi de  $660,0 \pm 91,5$  g e a exposição ao anestésico foi conduzida em aquários de vidro com 60 L de água, sempre providos de aeração constante, mantida através de pedra porosa acoplada a um soprador. A temperatura, oxigênio e pH foram mantidos dentro dos parâmetros recomendados para a espécie de acordo com Vinatea (1997). Foi utilizado o mentol ( $C_{10}H_{20}O$ ) puríssimo, em forma de cristal, da marca Vetec<sup>®</sup>, que foi diluído em álcool etílico absoluto (99,9%) resultando em uma solução estoque com concentração de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Para se determinar a ação do mentol sobre a indução e a recuperação anestésicas dos animais, seis concentrações anestésicas (30, 60, 120, 180, 240 e  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram testadas. As concentrações usadas foram estabelecidas a partir de resultados obtidos para outras espécies (FAÇANHA; GOMES, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2008). Para cada subtratamento, doze peixes foram submetidos, individualmente, ao banho anestésico por 10 minutos. Durante a imersão, foi registrado o tempo para atingir cada estágio de anestesia, conforme descrito por Ross e Ross (2008) e mostrado na Tabela 2.

A ausência de reação aos estímulos foi verificada pelo toque na lateral dos peixes com um bastão de vidro, e a perda do tônus muscular foi considerada quando, ao ser retirado

da água e colocado em posição lateral, a cauda do peixe permanecia totalmente pendida para baixo (VIDAL *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Estágios de anestesia em peixes.

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

Fonte: ROSS; ROSS (2008).

Ao final dos 10 minutos, os peixes foram retirados do aquário de indução e transferidos, individualmente, para caixas de fibra de vidro com capacidade para 360 L, com circulação constante de água.

O indivíduo foi considerado recuperado quando retomou totalmente seu equilíbrio e capacidade natatória, de acordo com Vidal *et al.* (2008). Os tempos de indução aos diferentes estágios de anestesia e de recuperação foram aferidos com auxílio de cronômetro digital. Os peixes foram monitorados por 24 horas para observar a taxa de sobrevivência.

### 2.2.2 Eugenol

Para o T2, foram utilizados 72 espécimes com peso médio de  $557,0 \pm 160$  g. O eugenol (Sigma<sup>®</sup>) foi diluído em álcool etílico absoluto (99,9%), resultando em uma solução estoque com concentração de  $1.000 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para a indução anestésica, foi utilizado um aquário com volume útil de 250 L, sendo utilizado 100 L de água.

Foram realizados seis subtratamentos com concentrações de 30, 60, 120, 180, 240 e  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , visando determinar a influência das diferentes concentrações de eugenol, na indução anestésica e na posterior recuperação. Para cada concentração testada, foram imersos

individualmente, 12 peixes. Durante a exposição de 10 minutos, foram observados os diferentes estágios de anestesia (Figura 3), conforme os critérios propostos por Ross e Ross (2008) descritos na Tabela 2. O tempo necessário para atingir cada estágio foi aferido com auxílio de um cronômetro digital. Depois de anestesiados, os peixes foram removidos da solução anestésica e transferidos para as caixas circulares de fibra (310 L), com renovação constante de água ( $150 \text{ L h}^{-1}$ ), para monitoramento da recuperação.

O peixe foi considerado recuperado ao retornar ao seu equilíbrio normal e com sua natação ativa, sendo o tempo necessário para a recuperação novamente aferido. Após o experimento, todos os indivíduos foram monitorados por 24 horas para observar a taxa de sobrevivência.

Figura 3 - Aspectos gerais de um indivíduo submetido a estágios de anestesia e recuperação. (a) Sedação leve. (b) Sedação profunda. (c) Narcose. (d) Anestesia profunda. (e) Anestesia cirúrgica. (f) Recuperação.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As médias foram analisadas por meio da Análise de Variância Fator Único (ANOVA unifatorial) e quando encontradas diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa BIOESTAT versão 5.0 em nível de significância de 5%.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peixes utilizados no experimento apresentaram atividade e aparência externa normais indicando sanidade, ratificada pela ausência de mortalidade durante o tempo de aclimatação. Também não foi observado nenhuma mortalidade ou efeito adverso dentro de 24 horas após o procedimento experimental. Inoue, Santos-Neto e Moraes (2003), utilizando óleo de cravo como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*), também não registraram mortalidade em período de observação semelhante.

Durante a indução anestésica foi observada a passagem sequencial pelos diversos estágios conferidos pelos seguintes padrões comportamentais: redução dos movimentos, batimento opercular lento, perda de reação a estímulos externos, natação errática, perda do tônus muscular, ausência total de reação e movimentos operculares lentos e irregulares. Vidal *et al.* (2008), empregando eugenol para indução anestésica de tilápia, relataram que a passagem gradativa pela sequência de estágios não foi evidenciada nas maiores concentrações testadas devido à velocidade de ação do anestésico, enquanto Mylonas *et al.* (2005) observaram a progressiva sequência dos estágios anestésicos alcançada por *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* anestesiados com eugenol e 2-fenoxietanol.

### 2.3.1 Anestesia com mentol

Os resultados registrados para indução e recuperação de peixes submetidos à anestesia por mentol, para os diferentes estágios são mostrados na Tabela 3. As menores concentrações de mentol (30, 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) não induziram os indivíduos ao estágio de anestesia profunda. A concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> induziu a tilápia adulta somente ao estágio de sedação leve, enquanto que as concentrações de 60 e 120 mg L<sup>-1</sup> possibilitaram a indução até o estágio de narcose, sem diferença estatisticamente significativa entre os tempos ( $p > 0,05$ ). Iversen *et al.* (2003) ratificam que fatores biológicos tais como estágios de ciclo de vida e idade, comprimento e peso, teor de lipídios e sanidade precisam ser considerados durante a utilização de anestésicos. Conforme Woody, Nelson e Ramstad (2002), espécimes maiores necessitam de concentrações mais elevadas de anestésico para atingir a indução.

Para as concentrações de 30, 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>, a recuperação dos animais foi imediata após sua exposição à água sem anestésico.

As maiores concentrações (180, 240 e 300 mg L<sup>-1</sup>) induziram ao estágio de anestesia profunda, ideal para manejos rápidos e biometrias. Não houve diferença

estatisticamente significativa entre os tempo para as duas últimas concentrações ( $p > 0,05$ ), que por sua vez diferiram da concentração de  $180 \text{ mg L}^{-1}$ . As concentrações de  $240$  e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  também permitiram aos peixes alcançarem o estágio de anestesia cirúrgica. Conforme os resultados alcançados neste trabalho, para manejos rápidos e biometrias, a concentração recomendada para tilápia adulta é de  $240 \text{ mg L}^{-1}$ , pois a mesma permite a indução e recuperação em tempos de  $210,5 \pm 17,3 \text{ s}$  e  $328,6 \pm 32,0 \text{ s}$ , respectivamente, obedecendo as recomendações de Bell (1987 *apud* BERNIER; RANDALL, 1998 ), que afirma ser segura a indução ao estágio de anestesia profunda em tempo de  $240 \text{ s}$ . Para tambaqui (*C. macropomum*), Façanha e Gomes (2005) determinaram a concentração de mentol de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  para sedação com finalidade de biometria. Conforme Hikasa *et al.* (1986), a resistência e a tolerância aos diferentes anestésicos variam de indivíduo para indivíduo e entre espécies. A concentração anestésica determinada para uma espécie pode levar a resultados perigosos para outra (TSANTILAS *et al.*, 2006). Os mesmos autores afirmam que relação peso corpóreo/área da superfície branquial está diretamente relacionada à concentração anestésica exigida. De acordo com Ross e Ross (2008), existe uma relação inversa entre a taxa metabólica e peso corpóreo. Portanto a determinação de dosagens recomendadas para cada espécie e classe de comprimento é fundamental para procedimentos seguros durante a utilização de uma substância anestésica.

Tabela 3 - Eventos comportamentais (em segundos) de adultos de tilápia-do-Nilo, expostos a diferentes concentrações de mentol<sup>(1)</sup>.

Dose ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Evento comportamental (segundos)					
	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	Estágio V	Recuperação
30	$142,7 \pm 10,0^a$	*	*	*	*	*
60	$56,2 \pm 4,7^b$	$121,9 \pm 14,4^a$	$215,1 \pm 22,1^a$	*	*	*
120	$53,4 \pm 4,3^b$	$112,5 \pm 13,8^{ab}$	$184,2 \pm 21,4^a$	*	*	*
180	$36,1 \pm 2,7^{bc}$	$75,0 \pm 5,9^{bc}$	$120,8 \pm 12,3^b$	$291,9 \pm 38,6^a$	*	$246,6 \pm 13,0^a$
240	$27,0 \pm 1,5^c$	$52,2 \pm 3,3^c$	$91,9 \pm 6,2^b$	$210,5 \pm 17,3^b$	$384,1 \pm 23,9^a$	$328,6 \pm 32,0^a$
300	$21,2 \pm 1,8^c$	$39,9 \pm 3,2^c$	$63,7 \pm 4,5^b$	$151,3 \pm 12,2^b$	$320,1 \pm 16,2^b$	$247,4 \pm 17,9^a$

\*Estágio não alcançado. <sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra em coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### 2.3.2 Anestesia com eugenol

Os dados referentes ao tempo de indução anestésica e de recuperação dos adultos de tilápia-do-Nilo expostos a diferentes concentrações de eugenol encontram-se na Tabela 4. Segundo Park *et al.* (2009), a concentração ótima de anestésico deve minimizar os impactos negativos do manejo, reduzir o estresse nos peixes, produzir anestesia em período menor ou igual a três minutos e permitir uma recuperação em prazo máximo de 10 minutos. Para um procedimento de manejo, o estágio mais adequado é o de anestesia profunda, pois neste estágio o peixe fica completamente imóvel pela perda do tônus muscular e do equilíbrio. Seguindo as recomendações dos autores citados, a concentração ideal de eugenol, encontrada no presente trabalho, para procedimentos de biometria para adultos de tilápia-do-Nilo foi de 120 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 4 - Eventos comportamentais (em segundos) de adultos de tilápia-do-Nilo expostos a diferentes concentrações de eugenol<sup>(1)</sup>.

Dose (mg L <sup>-1</sup> )	Evento comportamental (segundos)					
	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	Estágio V	Recuperação
30	60,8 ± 5,9 <sup>a</sup>	174,2 ± 16,7 <sup>a</sup>	339,7 ± 25,7 <sup>a</sup>	*	*	*
60	37,4 ± 2,0 <sup>b</sup>	75,9 ± 3,6 <sup>b</sup>	115,6 ± 5,2 <sup>b</sup>	206,3 ± 15,5 <sup>a</sup>	421,2 ± 26,4 <sup>a</sup>	360,8 ± 24,5 <sup>bc</sup>
120	29,8 ± 2,3 <sup>bc</sup>	60,6 ± 4,7 <sup>bc</sup>	102,6 ± 5,6 <sup>bc</sup>	186,2 ± 20,9 <sup>ab</sup>	356,2 ± 33,4 <sup>ab</sup>	393,2 ± 31,0 <sup>bc</sup>
180	29,9 ± 1,7 <sup>bc</sup>	57,1 ± 1,8 <sup>bc</sup>	86,8 ± 2,4 <sup>bcd</sup>	147,2 ± 11,2 <sup>bc</sup>	302,5 ± 28,1 <sup>b</sup>	519,8 ± 48,3 <sup>ab</sup>
240	24,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	45,8 ± 1,7 <sup>bc</sup>	74,6 ± 2,7 <sup>cd</sup>	97,3 ± 5,2 <sup>cd</sup>	163,0 ± 9,5 <sup>c</sup>	357,1 ± 23,6 <sup>c</sup>
300	23,6 ± 2,0 <sup>c</sup>	38,1 ± 2,6 <sup>c</sup>	53,8 ± 2,5 <sup>d</sup>	77,8 ± 4,2 <sup>d</sup>	129,9 ± 8,4 <sup>c</sup>	652,5 ± 61,0 <sup>a</sup>

\*Estágio não alcançado. <sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra em coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Peixes expostos durante 10 minutos à concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> atingiram somente o estágio de narcose. Para os demais tratamentos, todos os estágios de anestesia foram alcançados. Foi observado que os peixes somente necessitavam de recuperação após atingirem o estágio de anestesia profunda. Indivíduos anestesiados até o estágio de narcose voltavam a nadar ativamente e mantinham seu equilíbrio imediatamente após a imersão no aquário de recuperação que continha água sem solução anestésica.

A concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> foi o tratamento que necessitou de maior tempo para atingir o estágio desejado de anestesia profunda (206,3 s), contudo não houve diferença em relação à concentração de 120 mg L<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ). Usando esta mesma dosagem de eugenol, Hisano *et al.* (2008) anestesiaram juvenis de dourado, *Salminus brasiliensis*, em 88 s. No

presente trabalho, concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> foi o tratamento que atingiu este estágio mais rapidamente (77,8 s), não havendo diferença com a concentração de 240 mg L<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ). Resultado semelhante (67,5 s) foi encontrado por Park *et al.* (2008), quando anestesiaram garoupas *Epinephelus bruneus* com peso médio de 105,3 ± 11,43 g com eugenol na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup>.

Os peixes submetidos às menores concentrações levaram mais tempo para atingir os estágios anestésicos. Este comportamento também foi avaliado por Walsh e Pease (2002) utilizando eugenol em enguias, *Anguilla reinhardtii*. Cunha e Rosa (2006) corroboraram esta afirmativa em seus estudos quando anestesiaram sete diferentes espécies de peixes marinhos, utilizando o mesmo anestésico.

Quanto ao tempo de recuperação, apenas a concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> (652,5 s) ultrapassou o tempo recomendado de 10 minutos, entretanto esta concentração não diferiu estatisticamente da concentração de 180 mg L<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ). O menor tempo de recuperação foi verificado para 240 mg L<sup>-1</sup> (357,1 s), no entanto, este tratamento não teve diferença com as concentrações de 60 e 120 mg L<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ).

Park *et al.* (2009), avaliando o efeito do óleo de cravo em *rock bream* *Oplegnathus fasciatus* (139,5 ± 39,24 g de peso e 14,8 ± 1,66 cm de comprimento), observaram diferença estatística para o tempo de recuperação nas concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150 mg L<sup>-1</sup>.

Os fármacos naturais utilizados no presente trabalho são de fácil aquisição no mercado nacional, baixo custo e fácil manejo. No entanto, baseado nos resultados e observações comportamentais, o mais recomendado para anestesia profunda em adultos de tilápia-do-Nilo é o eugenol. Esta indicação é ratificada por Sladky *et al.* (2001); Woody, Nelson e Ramstad (2002) e Kildea, Allan e Kearney (2004) que afirmam ser o eugenol completamente eliminado do tecido muscular e corrente sanguínea em tempo inferior a 48 horas após o uso, o que garante ao mesmo a condição de um composto orgânico considerado seguro, enquanto que para o mentol não constam informações sobre a existência de resíduos na musculatura, modificações do sabor e alterações fisiológicas nos peixes submetidos a procedimentos anestésicos utilizando esse produto (GONÇALVES *et al.*, 2008).

## 2.4 CONCLUSÕES

A utilização do mentol como anestésico mostrou-se eficaz, e a concentração recomendada para anestesia profunda, ideal para manejos rápidos e biometrias, foi de  $240 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que para o eugenol a concentração recomendada para os mesmos tipos de procedimento foi de  $120 \text{ mg L}^{-1}$ . Na presente pesquisa, os resultados mostraram que o mentol foi eficiente para anestesia de adultos de tilápia-do-Nilo, no entanto, com base em observações comportamentais imediatamente após a imersão dos indivíduos, estes parecem apresentar desconforto na presença do produto, comportamento que não foi acentuado durante a utilização do eugenol sugerindo, portanto que este último é mais recomendado para a espécie.

## **CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus* USANDO ANÁLISE COMPUTADORIZADA**

Neste capítulo estão relatadas as características gerais do sêmen de tilápia-do-Nilo, dados importantes para determinação de protocolos de refrigeração e congelamento tais como pH, osmolaridade e concentração. Também estão registradas informações importantes como tempo de motilidade e caracteres morfométricos que estão diretamente relacionados à qualidade do sêmen e ao bom desempenho durante a fertilização de ovócitos.

### **3.1 INTRODUÇÃO**

A produção global de tilápia vem crescendo nos últimos anos, com estimativas para alcançar cerca de 8,9 milhões de toneladas até o ano de 2020 (TACON; METIAN, 2008). Este crescimento se deve em parte ao aumento dos sistemas de cultivo o que exige grandes quantidades de alevinos para suprir a demanda dos piscicultores (NG; WANG, 2011). Apesar da alta produção, as práticas de manejo podem reduzir a variabilidade genética dos reprodutores, seja por falta de planejamento dos programas de seleção genética, seja pelo uso reduzido de indivíduos na formação do plantel, o que conseqüentemente aumenta a probabilidade de endocruzamentos (HILSDORF; DERGAM, 1999 *apud* MOREIRA *et al.*, 2007). De acordo com Carneiro (2007), o estabelecimento de um banco genético com sêmen criopreservado de peixes é uma alternativa eficiente para manter o tamanho da população sem a manutenção de muitos reprodutores. Os gametas de vários machos conservados em um banco genético podem ser utilizados para a fertilização dos óvulos de algumas fêmeas, reduzindo os riscos do endocruzamento (JORSTAD; NAEVDAL, 1996 *apud* CARNEIRO, 2007) e a perda de qualidade do material genético.

Para projetar protocolos de preservação de gametas, os estudos sobre as propriedades do sêmen são necessários, pois os espermatozoides dependem principalmente do substrato extracelular para atender suas necessidades energéticas (VASCONCELOS *et al.*, 2009). Cabe salientar, que a função do plasma seminal é oferecer um ambiente adequado para o armazenamento dos espermatozoides dentro e fora dos testículos (CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2000). Portanto a descrição das características físico-químicas do sêmen é um pré-requisito necessário para o desenvolvimento de diluentes e crioprotetores para armazenamento dos espermatozoides em baixas temperaturas (SUQUET *et al.*, 1993). Características como pH, temperatura e osmolaridade podem afetar a qualidade

do esperma (ALAVI; COSSON, 2006) e comprometer os resultados esperados. Em mamíferos, a avaliação de alterações morfológicas dos espermatozoides é considerada um parâmetro importante para uma boa avaliação do sêmen (HAFEZ; HAFEZ, 2000; VALE-FILHO, 1980).

Também é importante saber que para se alcançar uma boa taxa de fertilização é necessária uma avaliação dos gametas antes de sua utilização, e o desenvolvimento de métodos de análise da qualidade do sêmen representa um sério problema (TAATI *et al.*, 2010). Densidade do sêmen, capacidade de fertilização, composição do plasma seminal, concentração espermática, volume e tempo de motilidade são utilizados como parâmetros de qualidade do sêmen e servem de base para a diluição do material fecundante, além de medir a capacidade de produção de cada reprodutor (BILLARD *et al.*, 1995; SALISBURY; VANDEMARK, 1964 *apud* NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2002).

A concentração espermática é um parâmetro quantitativo que relaciona o número de espermatozoides em função do volume seminal. Para a mensuração deste parâmetro, diversas técnicas podem ser utilizadas, como a câmara de Makler (TAITSON; GODINHO, 2003), câmara hematimétrica de Neubauer (LUZ *et al.*, 2001), hemocitômetro, espectrofotometria e citometria de fluxo (CHRISTENSEN; STENVANG; GODFREY, 2004; HANSEN *et al.*, 2002). A concentração espermática varia entre as espécies de peixes, mas geralmente costuma ser elevada quando comparada com mamíferos, chegando à ordem de bilhões de espermatozoides mL<sup>-1</sup> (BILLARD *et al.*, 1995; CRUZ-CASALAS *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2000).

Variações na pressão osmótica induzem a motilidade espermática em muitas espécies de peixe (SUQUET *et al.*, 1994) e, ao contrário, alta osmolaridade inibe a atividade espermática em ciprinídeos, como o *Carassius auratus*, a carpa-comum *Cyprinus carpio* (MORISAWA, 1983) e os salmonídeos (MORISAWA; SUZUKI, 1980; TURDAKOV, 1970 *apud* SHIMODA *et al.*, 2007). Fatores como o pH ou íons presentes podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática dos peixes (MORISAWA, 1999). A osmolaridade do diluente, quando iso-osmótica ao plasma seminal, suprime a motilidade espermática que, em peixes de água doce, tem início quando o sêmen é exposto ao meio hiposmótico (TAKAI; MORISAWA, 1995 *apud* RURANGWA *et al.*, 2004).

Vários estudos vêm sendo realizados, sejam estes de interesse comercial ou para fins de conservação, no sentido de se conhecer as propriedades do sêmen de espécies de água doce como carpa, *Cyprinus carpio* (BOZKURT *et al.*, 2009; EMRI *et al.*, 1998), tambaqui, *Colossoma macropomum* (FARIAS *et al.*, 1999; MARIA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2011),

bagre africano, *Clarias macrocephalus* (TAN FERMIN *et al.*, 1999), suruvi, *Steindachneridion scripta* (LUZ *et al.*, 2001), jundiá, *Rhamdia quelen* (FERREIRA *et al.*, 2001), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (MARIA *et al.*, 2004; VIVEIROS *et al.*, 2011), pirapitinga, *Brycon nattereri* (OLIVEIRA *et al.*, 2007), dourado, *Salminus maxillosus* (SREIT JR. *et al.*, 2008) e curimatá, *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS *et al.*, 2010). A determinação dessas propriedades possibilita o estabelecimento de protocolos de refrigeração do material genético para utilização em curto prazo.

Este capítulo teve como objetivo geral caracterizar o sêmen de tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, com auxílio do *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA). Os objetivos específicos foram: estabelecer um método mais eficiente para coleta de sêmen de tilápia, determinar a médias de pH, osmolaridade e concentração bem como registrar informações importantes como tempo de motilidade e caracteres morfométricos dos espermatozoides.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado na Estação de Piscicultura Professor Dr. Raimundo Saraiva da Costa pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (LBRP-NIB/UECE).

Tilápias adultas ( $n = 20$ ) com peso médio de  $723,5 \pm 120,3$  g foram estocadas em hapas instalados em tanque de  $32 \text{ m}^2$ , e alimentadas duas vezes ao dia com ração comercial com 28% de proteína bruta.

### **3.2.1 Métodos de coleta**

Em virtude da grande dificuldade para obtenção de sêmen de tilápia-do-Nilo livre de contaminação, foram testados dois métodos de coleta. Para execução dos testes foram utilizados 20 peixes. Os animais foram capturados individualmente com auxílio de puçá, anestesiados com eugenol (Figura 4) e envolvidos em toalha úmida para facilitar o manejo e minimizar o estresse.

Figura 4 - Tilápia em processo de indução anestésica com eugenol.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira.

Para reduzir os riscos de contaminação, a papila urogenital foi limpa e seca com toalha de papel e foram efetuadas suaves compressões manuais sobre a parede celomática no sentido ântero-posterior. Os métodos de coletas foram: I - posicionando o tubo de micro centrífuga na base da papila urogenital e II - com auxílio de micropipeta graduada, coletando diretamente na abertura da papila urogenital (Figura 5). Imediatamente após a coleta, uma alíquota do sêmen foi depositada sobre lâmina de microscopia e observada ao microscópio de luz, previamente focalizado em aumento de 400X. A taxa de motilidade foi determinada subjetivamente, e as amostras com menos de 5% de espermatozoides móveis foram consideradas livres de contaminação.

Figura 5 – Coleta de sêmen de tilápia, *Oreochromis niloticus*, em tubo de micro centrífuga (a). Coleta de sêmen utilizando micropipeta (b).



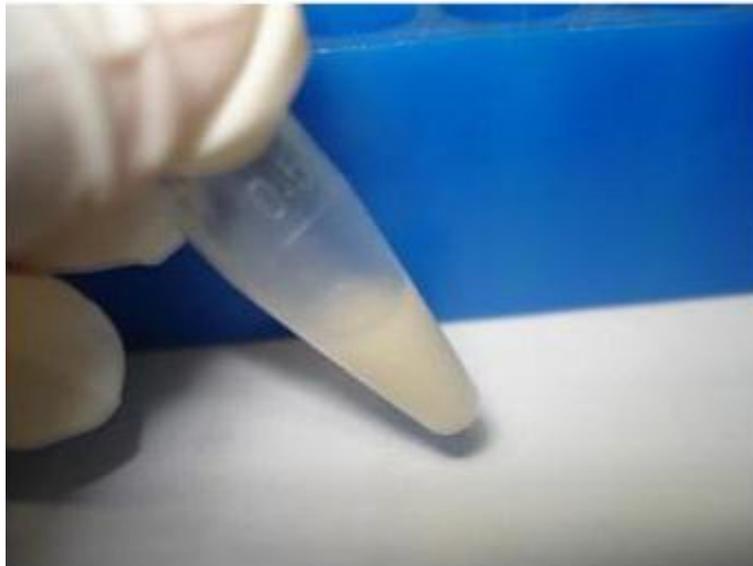
Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

### 3.2.2 Caracterização do sêmen

Para a caracterização do sêmen, os animais foram capturados individualmente com auxílio de puçá, anestesiados com eugenol conforme metodologia supramencionada. A coleta foi executada com auxílio de micropipeta seguindo os procedimentos descritos anteriormente. As amostras foram observadas em microscópio de luz, previamente focalizado em aumento de 400X para certificar a ausência de contaminação.

As amostras que apresentaram taxas de motilidade acima de 5% foram descartadas e aquelas consideradas livres de contaminação (por fezes, urina ou água) foram estocadas em tubos de micro centrífuga previamente identificados, com capacidade para 2 mL e conservados sob refrigeração (4 - 6°C) em caixa isotérmica. O aspecto geral da amostra livre de contaminação está apresentado na Figura 6. Alguns parâmetros foram imediatamente observados, na própria Estação de Piscicultura/UFC, enquanto outros foram determinados no LBRP-NIB/UECE.

Figura 6 – Aspecto geral da amostra de sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, livre de contaminação.



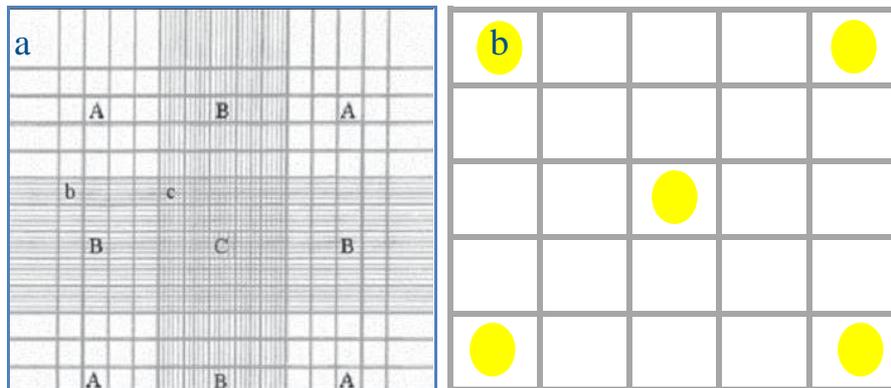
Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

As amostras foram conduzidas ao laboratório e os parâmetros analisados sobre o sêmen de tilápia-do-Nilo foram:

a) Volume do sêmen ( $\mu\text{L}$ ): verificado com auxílio de micropipeta com volume variável. As amostras foram transferidas para um tubo de micro centrífuga e o volume foi registrado.

b) Concentração espermática (número de espermatozoides por mL de sêmen): amostras de sêmen ( $n = 20$ ) foram diluídas em 1 mL de solução formol-citrato (3,94 g de citrato de sódio, 4 mL de formaldeído e 100 mL de água destilada) na proporção de 1:40 (sêmen:solução formol citrato), utilizando-se uma pipeta de 25  $\mu\text{L}$ . Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi transferida para a câmara hematimétrica de Neubauer e focalizada ao microscópio com aumento de 400X, onde permaneceu em repouso por cinco minutos. A contagem dos espermatozoides foi feita no quadrado de contagem C do gabarito da câmara, nos cantos e no centro de cada retículo (Figura 7). A contagem que apresentou mais de 10% de diferença entre os retículos foi descartada e refeita para a mesma amostra.

Figura 7 – Gabarito de uma câmara de Neubauer (a). Esquema de contagem de espermatozóides nos cantos e centro da câmara de Neubauer (b).



Fonte: (a) VIEIRA (2000 *apud* LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004) (b) Erivânia Gomes Teixeira

A quantificação foi uniformizada estipulando-se que as células sobre os limites inferior e direito dos quadrados não fossem contadas, evitando assim que uma mesma célula fosse quantificada mais de uma vez. O número de espermatozoides foi determinado segundo a fórmula seguinte (TIBA *et al.*, 2009), e os resultados expressos em espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ .

$$CE = N \times F_c$$

Onde:

CE = concentração de espermatozoides por  $\text{mm}^3$ ;

N = número de células contadas na câmara de Neubauer;

F<sub>c</sub> = fator de correção, que foi calculado como:

$$F_c = \frac{q \times fd}{d}$$

Em que:

$q = 5$ , razão entre o número total de quadrados da câmara de Neubauer e o número de quadrados de realização da contagem (25/5);

$fd$  = diluição da alíquota de sêmen;

$d = 0,1$  mm (profundidade da câmara de Neubauer).

c) pH do sêmen: 100  $\mu$ L de cada amostra de sêmen fresco foram transferidos para tubo de micro centrífuga e o pH foi medido em um pHmetro digital (Hanna HI 7004L,) provido de microeletrodo.

d) Osmolaridade do líquido seminal (mOsm/kg): 18 amostras de sêmen foram transportados sob refrigeração (4 - 6°C) até o LBRP-NIB/UECE, onde alíquotas de 100  $\mu$ L foram submetidas à leitura da osmolaridade em osmômetro digital, modelo Roebling automatic.

e) Tempo de motilidade (minutos): uma alíquota de 2  $\mu$ L de cada amostra ( $n = 16$ ) foi depositada sobre lâmina de microscopia e observada em microscópio óptico previamente focalizado (400X). Posteriormente foi ativada mediante adição de 20  $\mu$ L de meio ativador, água destilada e o tempo da motilidade foi cronometrado do início da ativação até o momento em que todas as células se tornaram imóveis.

f) Morfometria da cabeça do espermatozoide: uma fração do sêmen coletado de cada animal ( $n = 20$ ) foi diluído individualmente na proporção de 1:50 em solução formol-salina 1%. Foram realizados esfregaços de cada amostra que consistiu na deposição de 2  $\mu$ L de sêmen em solução salina sobre lâmina de microscopia e arrasto da amostra com uma segunda lâmina. Posteriormente, cada lâmina foi corada com o *kit* Panótico de Hemograma Instant-Prov. Em seguida, a lâmina foi deixada por dois minutos para secagem e, então, uma lamínula foi afixada sobre a lâmina com verniz vitral. Finalmente a morfometria da cabeça de 100 espermatozoides por amostra foi registrada usando o *software* SCA (*Sperm Class Analyser*, versão 3.2.0). Os parâmetros avaliados referentes à cabeça do espermatozoide foram: comprimento (C), largura (L), perímetro (P) e área (A). De posse desses dados o *software* forneceu informações sobre o formato dos espermatozoides - elipticidade, rugosidade, alongação e regularidade, as quais estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5 – Formato da cabeça do espermatozoide analisado pelo *Computer Assisted Semen Analysis* (CASA).

Formato da cabeça	Cálculo	Significado dos valores
Elipticidade	$\frac{C}{L}$	= 1 – Redonda
		> 1 – Alongada
Elongação	$\frac{C-L}{C+L}$	= 0 – Não alongada (redonda)
		> 0 – Elongada
		< 0 – Plana
Rugosidade	$\frac{4\pi A}{P^2}$	= 1 – Não rugosa
		< 1 – Rugosa
Regularidade	$\frac{\pi CL}{4A}$	= 1 – Elipse perfeita
		< 1 – Elipse imperfeita

Fonte: LEITE (2011).

C: comprimento; L: largura; P: perímetro; A: área;  $\pi = 3,1416$ .

Caracterizando-se como um trabalho descritivo, os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, calculados no Microsoft Office Excel 2007.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Métodos de coleta

A fêmea de tilápia apresenta três orifícios na região urogenital (ânus, abertura urinária e genital) diferentemente do macho que apresenta somente dois, ânus e orifício urogenital (Figura 8).

Esta característica do macho dificulta a colheita de sêmen da espécie, pois durante o procedimento de coleta, geralmente ocorre a contaminação por urina, fezes, muco ou água. De acordo com Maria e Carneiro (2012), estes contaminantes podem ativar a motilidade espermática tornando o material impróprio para utilização em processos de criopreservação (refrigeração ou congelamento). A qualidade do sêmen de peixes pode variar individualmente nos diversos parâmetros (MOJICA, 2004), e estas variações podem ser influenciadas por fatores como variabilidade genética, sazonalidade e método de coleta utilizado (RANA, 1995 *apud* BROMAGE; ROBERTS, 1995).

A coleta de sêmen de peixes pode ser realizada em recipientes como placas de Petri, tubos Falcon e seringas (YASUI, 2007). No caso particular da coleta de amostras de

sêmen de tilápias, a característica de região genital é um dos fatores que contribuem grandemente para sua contaminação e dificuldade de obtenção direta em recipientes como tubos de ensaio, micro tubos ou outros normalmente utilizados para outras espécies. Também se deve levar em consideração o pequeno volume de sêmen produzido pela espécie que, dependendo do tipo de recipiente utilizado, pode ainda haver perdas durante os procedimentos.

Figura 8 – Detalhes da região urogenital de espécimes macho e fêmea de tilápia-doNilo, *Oreochromis niloticus*.



Fonte: Carlos Riedel

No presente trabalho, nas coletas realizadas diretamente em tubos de micro centrífugas (I) 70% das amostras se contaminavam, enquanto que com a utilização de micropipetas (II), as amostras impróprias para utilização foram reduzidas para 40% (Tabela 6), comprovando a maior eficiência do uso de micropipeta (II). Outra facilidade oferecida pelo uso de micropipeta é a imediata determinação do volume coletado, corroborando com Godinho, Amorim e Peixoto (2003) que afirmam que a utilização de recipientes graduados facilita a avaliação do volume no momento da coleta. Apesar da dificuldade de coleta apresentada, principalmente por algumas espécies de água doce, a literatura não dispõe de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de métodos apropriados para colheita de sêmen de espécies específicas. Para tilápia, Godinho, Amorim e Peixoto (2003) e Mataveli *et al.* (2007) utilizaram seringas de 1 mL para coleta de sêmen. O mesmo método foi utilizado para coleta de sêmen de piapara por Streit-Jr *et al.* (2008). Para tambaqui, Leite *et al.* (2011) e Vieira *et al.* (2011) utilizaram tubos de polietileno graduados, enquanto que para piabinha foram utilizados tubos de 5 mL (SHIMODA *et al.*, 2007).

Tabela 6 – Amostras de sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, livres de contaminação de acordo com o método de coleta empregado. Amostra contaminada (X). Amostra não contaminada (O).

Método de coleta	Amostras contaminadas (X) e livres de contaminação (O) por animal										Amostras não contaminadas (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Micro tubo	X	X	O	X	X	O	X	X	X	O	30
Micropipeta	O	O	O	X	X	O	O	O	X	X	60

### 3.3.2 Caracterização do sêmen de tilápia

Existe uma grande variação entre as características seminais das diversas espécies de peixes, e o seu conhecimento é fundamental para a fertilização artificial (MURGAS *et al.*, 2011), bem como para o estabelecimento de protocolos de conservação do sêmen. Routray *et al.* (2007) afirmam que a descrição do fluido espermático é realizada com base em propriedades físicas como volume, motilidade e concentração, além das características morfológicas. Estas informações, somadas ao tempo de motilidade e à concentração espermática, são indicadores da qualidade do sêmen no momento da fertilização (FELIZARDO *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste trabalho para as características físico-químicas do sêmen de tilápia-do-Nilo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Estatística descritiva das aracterísticas seminais (n = 20) de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Volume ( $\mu\text{L}$ )	110,0	720,0	454,0	177,2	39,0
Concentração ( $\times 10^8$ spz $\text{mL}^{-1}$ )	1,2	3,4	2,4	0,7	29,2
pH	7,3	8,6	7,9	0,3	3,8
Osmolaridade (mOsm/kg)	212,0	398,0	310,8	39,1	12,6
Tempo de motilidade (s)	501,0	1.112,0	712,4	194,1	27,2

No presente trabalho, o volume de sêmen coletado apresentou grande variação (39%) entre os espécimes. De acordo com Godinho (2000), o volume de sêmen de peixes varia entre espécies e espécimes de acordo com idade, método e época de coleta. Esta informação foi ratificada por Alavi *et al.* (2007), que também verificaram grande variação de volume entre espécimes de *Perca fluviatilis*. O volume médio de sêmen coletado de

454,0 ± 177,2 µL foi semelhante ao encontrado por Matavelli *et al.* (2007) para a mesma espécie, que foi de 0,4 mL, superior ao volume médio de 0,3 mL coletado por Chao *et al.* (1987) em algumas espécies do gênero *Oreochromis*, entre as quais a tilápia-do-Nilo.

Quanto à concentração, o valor médio registrado no presente estudo foi de  $2,4 \times 10^8$  espermatozoides mL<sup>-1</sup> de sêmen, valor inferior aos valores médios encontrados para a mesma espécie,  $24,6 \times 10^8$  por Mataveli *et al.* (2007) e para *Tilapia zillii*,  $7,7 \times 10^8$  por Chao *et al.* (1987). De acordo com Nynca e Ciereszko (2009), o conhecimento da concentração de espermatozoides permite o controle da reprodução de peixes através do estabelecimento adequado da relação de espermatozoide/óvócito. A determinação dessa relação propicia uma melhor taxa de fecundação sem desperdício de gametas.

O valor médio de pH igual a  $7,9 \pm 0,3$  encontrado para o sêmen de tilápia-do-Nilo nesta pesquisa ficou dentro da variação individual de 6,2 a 8,2, encontrada por Chao *et al.* (1987) para sêmen de *Oreochromis* sp. e próxima aos valores médios de  $8,09 \pm 0,26$  (VIEIRA *et al.*, 2011) e de  $8,0 \pm 0,1$  (MARIA *et al.*, 2010) determinados para sêmen de tambaqui, *Colossoma macropomum* hormonalmente induzido e não induzido, respectivamente. Informações semelhantes foram encontradas por Tabares *et al.* (2005) que afirmam ser o pH do sêmen de peixes de águas continentais variável de 6,5 a 8,5.

A osmolaridade do sêmen de peixes é em média igual a 300 mOsm/kg (MORISAWA; SUSUKI, 1980), corroborando com os resultados desse trabalho que registrou uma variação de 212 a 398 mOsm/kg. De acordo com Vieira *et al.* (2011), a variabilidade da osmolaridade pode estar relacionada a característica individual e espécie-específicas, uma vez que esta variação também foi registrada para um tipo de caracídeo (VIEIRA *et al.*, 2011), salmonídeos e ciprinídeos (ALAVI; COSSON, 2006).

A motilidade espermática é induzida quando o espermatozoide entra em contato com o ambiente aquoso durante a reprodução natural ou com a solução ativadora durante a reprodução artificial (ALAVI; COSSON, 2006). A diferença da osmolaridade do plasma seminal em relação à do meio ambiente pode inibir ou ativar a motilidade espermática. Portanto, o conhecimento da osmolaridade do sêmen de peixes é importante para a elaboração de soluções ativadoras e diluentes para conservação dos gametas. Alteração desse parâmetro pode iniciar a motilidade espermática que para muitas espécies é de poucos segundos. De acordo com Carneiro (2007), a ativação do espermatozoide é irreversível e o tempo de motilidade é curto, depois do qual o espermatozoide perde sua capacidade de fertilização, pois suas reservas energéticas são esgotadas. Portanto, conhecer o tempo de motilidade do espermatozoide da espécie pesquisada é fundamental para o sucesso do processo de

fecundação ou de conservação dos gametas. No presente trabalho, o tempo de motilidade do espermatozoide de tilápia variou de 501 a 1.112 s. Essa grande amplitude também foi verificada para *Rhamdia hilarii* (KAVAMATO; FOGLI DA SILVEIRA, 1986), *Leporinus obtusidens* (MURGAS *et al.*, 1999) e *Carassius gibelio* (TAATI *et al.*, 2010). Vale salientar que o tempo de motilidade espermática em peixes de água doce pode variar entre espécies (MURGAS *et al.*, 2011) e entre espécimes de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos.

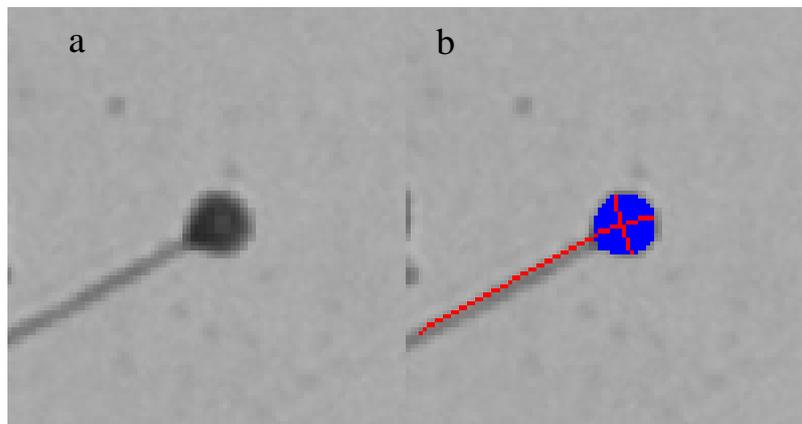
As células espermáticas de peixes variam em estrutura (JAMIESON, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (JANVIER, 1999). Segundo Nagahama (1983 *apud* MURGAS *et al.*, 2011), os espermatozoides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda e, a carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração deste gameta (COSSON, 1999 *apud* ALAVI; COSSON, 2005). De acordo com Downing-Meisner, Klaus e O'Leary (2005), as dimensões e formato do espermatozoide podem diferir entre espécies e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (THURSTON *et al.*, 2001) refletindo no seu modo de fertilização (NAGAHAMA, 1983 *apud* MURGAS *et al.*, 2011) e adequando-se a abertura da micrópila do ovócito. Segundo Tsakmakidis, Lymberopoulos e Khalifa (2010), a morfologia do espermatozoide é uma característica que pode ser usada para prever a capacidade de um macho para fertilizar um óvulo. Assim, o conhecimento do padrão dos parâmetros do gameta é importante, pois a presença de anomalias poderá refletir na taxa de fertilização, fator determinante para um reprodutor de sucesso.

Alguns métodos são utilizados para examinar aspectos relacionados à morfologia dos espermatozoides, principalmente as dimensões e o formato da cabeça, dentre os quais se destaca o CASA, por meio de seu programa conhecido como ASMA (*Automated Sperm Morphology Analysis*), que embora tenha sido desenvolvido para estudos do sêmen humano (MONSERRAT *et al.*, 1995), tem sido adaptado a outras espécies de mamíferos (GRAVANCE *et al.*, 1996), e vem sendo utilizado para estudos das dimensões morfométricas de algumas espécies de peixes como tambaqui, *Colossoma macropomum* (LEITE, 2011) e pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (MELO, 2010a), com precisão e exatidão aceitáveis (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Os dados da análise morfométrica da cabeça do espermatozoide de tilápia-do-Nilo antes e após digitalização no SCA estão apresentados na Figura 9. De acordo com Melo (2010a), a utilização do sistema de análise da morfometria espermática assistida por computador (ASMA) busca superar o problema da subjetividade das técnicas de avaliação

visual, pois é totalmente automatizado. Logo, possibilita maior precisão, objetividade e repetibilidade fornecendo resultados confiáveis, inclusive quanto à morfometria. Marco-Jiménez *et al.* (2008), em experimentos realizados com *Diplodus puntazzo* e *Sparus aurata*, confirmam a eficiência do ASMA mostrando que as medidas morfométricas da cabeça dos espermatozoides obtidas através desse sistema foram similares às aquelas mensurações obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 9 - Análise morfométrica da cabeça do espermatozóide. (a) Antes da digitalização. (b) Após a digitalização no CASA.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

A Tabela 8 mostra os valores médios dos parâmetros morfométricos registrados para a cabeça do espermatozoide de tilápia-do-Nilo. Nesse trabalho, o comprimento da cabeça do espermatozoide variou de 2,6 a 2,73  $\mu\text{m}$  enquanto que a largura registrada apresentou valor mínimo de 2,42  $\mu\text{m}$  e máximo de 2,53  $\mu\text{m}$ . A área e o perímetro da cabeça do espermatozoide apresentaram amplitude de variação de 0,45  $\mu\text{m}^2$  e 0,31  $\mu\text{m}$ , respectivamente, com valores médios de  $6,13 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$  e  $8,64 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , na mesma ordem. Conhecer o padrão das dimensões morfométricas (Figura 10) dos espermatozoides de determinada espécie pode colaborar para futuros estudos da qualidade seminal de planteis de reprodutores ou ainda para seleção de gametas com maior potencial fecundante a serem utilizados em programas de melhoramento genético. De acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa, o espermatozoide de tilápia-do-Nilo é menor do que o de pirapitinga, cuja área e perímetro são de  $7,72 \pm 0,53 \mu\text{m}^2$  e  $10,06 \pm 0,44 \mu\text{m}$ , respectivamente (MELO, 2010a) e inferior também às dimensões do espermatozoide de tambaqui, *Colossoma macropomum* que possui área média de  $7,59 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$  e perímetro médio de  $9,67 \pm 0,2 \mu\text{m}$  (LEITE, 2011). No entanto, comparando com gameta masculino de enguia europeia, cujas dimensões são de  $5,36 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$  e  $14,68 \pm 0,13 \mu\text{m}$ , observa-se que o de tilápia tem maior área e menor

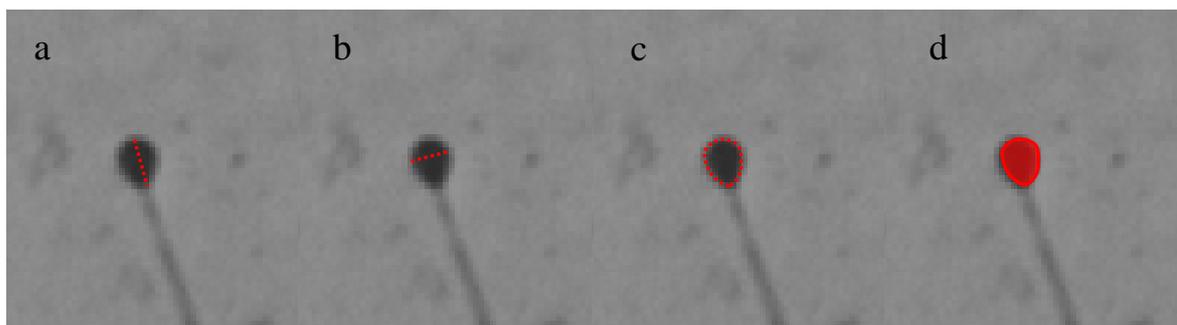
perímetro, por ter o espermatozoide da enguia maior elipicidade e maior alongação (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2006).

A cabeça do espermatozoide de tilápia apresentou valores semelhantes em comprimento e largura ( $2,67 \pm 0,03 \mu\text{m}$  e  $2,48 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ) gerando valores de elipicidade próximo a um e alongação próximo a zero ( $0,04 \pm 0,01$ ). Este resultado caracteriza a cabeça do espermatozoide de tilápia-do-Nilo como tendo formato arredondado.

Tabela 8 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros morfométricos obtidos da cabeça dos espermatozoides de tilápia-do-Nilo.

Variáveis morfométricas da cabeça do espermatozoide	Média ( $\pm$ desvio padrão)
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	$2,67 \pm 0,03$
Largura ( $\mu\text{m}$ )	$2,48 \pm 0,03$
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$6,13 \pm 0,11$
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$8,64 \pm 0,07$
Elipticidade	$1,08 \pm 0,02$
Rugosidade	$1,03 \pm 0,01$
Elongação	$0,04 \pm 0,01$
Regularidade	$0,85 \pm 0,01$

Figura 10 – Morfometria da cabeça do espermatozoide de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. (a) Comprimento. (b) Largura (c) Perímetro (d) Área.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira.

### 3.4 CONCLUSÕES

A obtenção do sêmen de tilápia-do-Nilo livre de contaminantes, sem o sacrifício do animal, foi dificultada por fatores intrínsecos e extrínsecos e o uso de micropipeta graduada, não eliminou, mas reduziu os riscos de contaminação. Esse método, com micropipeta, foi inédito para coleta de sêmen de peixes.

O volume de sêmen coletado por animal foi inferior a 1 mL, o que geralmente dificulta a realização de pesquisas que necessitam de maior quantidade para sua execução, exigindo a formação de *pools* para obtenção de maiores volumes.

A utilização de microeletrodo para a determinação do pH do sêmen de tilápia-do-Nilo possibilitou o conhecimento preciso desse parâmetro individualmente, facilitando assim o cálculo exato do pH médio que, juntamente com a osmolaridade também determinada nesse trabalho, forneceu maior confiabilidade no ajuste dessas variáveis para os diluidores e criodiluentes que foram utilizados nos processos de conservação de gametas.

A concentração espermática mostrou considerada variação entre os espécimes, indicando que esse parâmetro pode ser influenciado por fatores inerentes ao organismo.

O espermatozoide de tilápia-do-Nilo apresentou tempo de motilidade espermática superior aos espermatozoides da grande maioria das espécies de peixes de água doce. Esse fato sugere que a espécie possui maior tempo útil para fertilização de ovócitos.

O conhecimento das dimensões e formato da cabeça do espermatozoide da tilápia-do-Nilo possibilitará a utilização dessa informação como parâmetro para seleção de reprodutores mais eficientes, desde que combinadas a outros parâmetros relevantes, por exemplo, o tempo de motilidade e o volume de sêmen produzido.

## CAPITULO 3 – REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO UTILIZANDO ACP-104 COMO DILUENTE

Este capítulo descreve o uso de diferentes soluções como agente diluente do sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, conservado em refrigeração (0 - 4°C), verificando sua qualidade quanto à motilidade espermática em diferentes intervalos de tempo e destacando o ACP-104 como potencial diluente para o sêmen dessa espécie.

### 4.1 INTRODUÇÃO

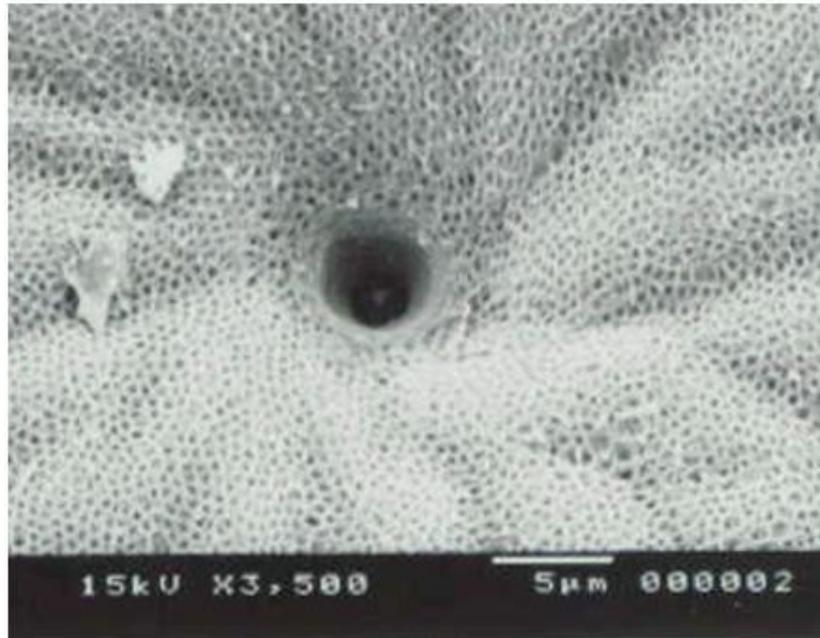
Em geral, os peixes, assim como outros animais, possuem testículos em par, que se originam do tecido mesoderma e estão localizados na parte posterior da cavidade abdominal, próximos aos rins e à bexiga natatória. O sêmen é composto de espermatozoide e de plasma seminal, que contém carboidratos como fonte de energia, além de enzimas (KOVÁCS, 1990).

Os espermatozoides de peixes de água doce são imóveis nas gônadas onde o plasma seminal possui osmolaridade de aproximadamente 300 mOsmol/kg e perdem essa quiescência quando em contato com a água ou outro meio hiposmótico. Portanto, durante a preservação espermática, é importante primar por um meio com osmolaridade capaz de assegurar a imobilidade das células a fim de preservar as reservas energéticas (MARIA *et al.*, 2004). Durante a reprodução natural, a motilidade é induzida depois da liberação dos gametas do trato genital do macho, dentro do ambiente aquoso onde se encontram componentes favoráveis, principalmente íons (COSSON, 2004). O espermatozoide da tilápia assim como de outras espécies de peixes não possui acrossoma, e a fecundação é realizada através de um orifício cônico chamado micrópila (Figura 11). O óvulo ao entrar em contato com o meio aquoso inicia seu processo de hidratação causando o fechamento da micrópila (MACHADO; RIGOLINO; TABATA, 2007). Portanto, o tempo de motilidade do espermatozoide deve ser suficiente para atingir a micrópila dentro do período em que esta permanece aberta.

Na maioria das espécies de peixes de água doce, os espermatozoides apresentam movimento inferior a 2 minutos e, em alguns casos, perdem a atividade em aproximadamente 20 segundos (KIME *et al.*, 2001). O modo como o sêmen é conservado pode afetar de forma negativa o tempo de motilidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, a qualidade do material, refletindo na taxa de fertilização. A refrigeração é uma das técnicas de conservação de gametas que possibilita o armazenamento do sêmen por um período de horas ou alguns

dias (OLIVEIRA *et al.*, 2007), dependendo da espécie, facilitando os processos de reprodução induzida e fertilização em laboratório.

Figura 11 – Micrópila do óvulo de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*.



Fonte: VALENTIN (2007).

#### **4.1.1 Conservação de sêmen em refrigeração**

A refrigeração de sêmen é uma técnica de fácil execução, na qual o material coletado pode ser armazenado, puro ou diluído em soluções adequadas, em temperaturas variando entre 0 e 4°C. É um método de custo reduzido, que facilita a troca de material genético entre laboratórios e permite aos piscicultores trabalharem com um plantel menor, reduzindo, portanto, os gastos de manutenção de reprodutores (CARNEIRO *et al.*, 2006). Segundo Franciscatto *et al.* (2002), a conservação seminal em curto período de tempo permite que o sêmen esteja apto para a fecundação de ovócitos sem a presença do macho, melhorando a eficiência das reproduções em cativeiro.

A estocagem do sêmen puro em temperatura inferior à fisiológica reduz a atividade metabólica dos espermatozoides, estendendo, portanto, sua viabilidade temporal (SANCHES; CERQUEIRA, 2011); essa viabilidade pode ser incrementada quando o sêmen é adicionado de soluções diluentes osmoticamente semelhantes (PEÑARANDA *et al.*, 2010). A diluição aumenta a disponibilidade de oxigênio para as células e também reduz a concentração de proteínas do plasma seminal que podem se degenerar com o tempo,

comprometendo a qualidade do sêmen (BILLARD; COSSON, 1992; PADHI; MANDAL, 2000 *apud* YASUI, 2007). No entanto, o diluente utilizado, oscilação de temperatura e oxigenação podem interferir na qualidade do sêmen mantido em refrigeração.

A busca constante pela otimização de processos técnicos na preservação de espermatozoides de peixes é condizente com os objetivos econômicos e ecológicos (MURGAS *et al.*, 2004). Assim vários pesquisadores têm avaliado a viabilidade de sêmen refrigerado de algumas espécies em relação ao tempo de estocagem. As tilápias em geral podem ter os espermatozoides conservados em refrigeração por até cinco dias (CHAO *et al.*, 1987). O sêmen de pirapitinga, *Brycon nattereri* pode ser mantido em refrigeração por até sete dias diluído em BTS<sup>®</sup> (OLIVEIRA *et al.*, 2007), enquanto que o sêmen de *Gadus morhua* mantém sua motilidade espermática por 40 dias quando armazenado em temperaturas de refrigeração (DEGRAAF; BERLINSKY, 2004). Outras espécies como *Clarias gariepinus* (MANSOUR; LAHNSTEINER; BERGER, 2004), *Prochilodus lineatus* (MARQUES; GODINHO, 2004), *Urechis unicinctus* (KANG *et al.*, 2004), *Lutjanus synagris* e *L. analis* (SANCHES; CERQUEIRA, 2010, 2011), também já foram estudadas quanto ao tempo de estocagem dos espermatozoides em temperaturas entre 0 e 4°C.

#### **4.1.2 Soluções diluentes**

O choque térmico imposto pela refrigeração do sêmen, quando realizado de forma inadequada, reduz a taxa de motilidade interferindo, conseqüentemente na taxa de fertilização (BEZERRA, 2010). Para minimizar esses efeitos, são utilizados diluentes que consistem em soluções de sais e/ou carboidratos. Sua composição pode ser simples ou complexa de acordo com o interesse da diluição, se um simples diluente para aumentar o volume, ou se para conservação sob refrigeração por um maior intervalo de tempo (ANDRADE *et al.*, 2008; MARIA, 2005).

Os diluentes evitam a acidificação do ambiente e protegem a célula do choque térmico (CAVALCANTI, 1998 *apud* BARROS; TONIOLLI, 2011), e quanto maior a similaridade entre o diluente e o líquido seminal menor o impacto negativo sobre a qualidade do espermatozoide. Gomes e Cerqueira (2010) afirmam que assegurar o pH, a pressão osmótica e a composição iônica do diluente além das condições de estocagem do sêmen, reduz os efeitos indesejados sobre os espermatozoides de peixes. O diluente deve ser capaz de manter a imobilidade espermática, ter estabilidade durante o armazenamento, ser estéril e ter funcionalidade quando adicionado de crioprotetores (MARIA, 2005). As pesquisas sobre

diluentes buscam manter a estabilidade físico-química do plasma seminal durante o período de refrigeração e obter uma alta taxa de motilidade espermática (TAN-FERMIN *et al.*, 1999).

A Tabela 9 mostra uma variedade de diluentes pesquisadas nos últimos anos. Essas soluções são compostas basicamente por sais e também podem ser utilizadas como soluções imobilizadoras para atenuar os efeitos da contaminação por urina, podendo, inclusive, reimmobilizar os espermatozoides natantes devido ao aumento da osmolaridade (BILLARD; ZHANG, 2001 *apud* WATSON; HOLT, 2001; LINHART *et al.*, 2005).

Tabela 9 – Diluentes utilizadas em peixes.

Solução diluidora	Componentes	Espécie	Referências
BTS ( <i>Beltsville thawing solution</i> ) + KCl	BTS® 5% + KCl 0,16%	<i>Leporinus obtusidens</i>	MURGAS <i>et al.</i> (2002)
Soluções diluidoras à base de sais e açúcares	350 mM glicose 30 mM Tris 300 mM sacarose 30 mM Tris 350 mM frutose 30 mM Tris	<i>Cyprinus carpio</i>	HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI (2003)
NaCl	NaCl 1,2%	<i>Brycon insignis</i>	SHIMODA (2004)
Água de coco Kero-coco®	Cálcio 0,02%; sódio 0,02%; magnésio 0,01%; potássio 0,32%; fósforo 0,01%; carboidratos 5%	<i>B. orbignyanus</i>	MARIA (2005)
Solução fisiológica de NaCl 0,9%	NaCl 154 mM	<i>B. orbignyanus</i> <i>Prochilodus lineatus</i>	MARIA <i>et al.</i> (2006) VIVEIROS <i>et al.</i> (2009a)
NaCl + NaHCO <sub>3</sub>	NaCl 200 mM; NaHCO <sub>3</sub> 32,38 mM	<i>Perca fluviatilis</i>	ALAVI <i>et al.</i> (2007)
Ringer	NaCl (7,8 g L <sup>-1</sup> ); KCl (0,2 g L <sup>-1</sup> ); CaCl <sub>2</sub> (0,21 g L <sup>-1</sup> ); NaHCO <sub>3</sub> (0,021 g L <sup>-1</sup> ).	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i> <i>Siniperca chuatsi</i>	PAN <i>et al.</i> (2008) DING <i>et al.</i> (2009)
CCSE ( <i>Common Carp Sperm Extender</i> )	NaCl, KCl, frutose, glicose, NaOH 307 mOsmol/kg	<i>C. carpio</i>	IRAWAN; WUTHIPHANDCHAIA; NIMRAT (2010)
ACP-104	ACP-104 (300 mOsmol/kg)	<i>C. macropomum</i>	LEITE <i>et al.</i> (2011)
BTS™ (Minitüb)	80% glicose, 12.7% citrato de sódio, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO <sub>3</sub> , 1.5% KCl, 0.5% sulfato de gentamicina	<i>B. orbignyanus</i> <i>P. lineatus</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> (2012)

Associados aos diluentes, também podem ser utilizados alguns aditivos que ajudam a manter a integridade das células, por exemplo, oxigênio (BENCIC *et al.*, 2000) e antibióticos (BILLARD; COSSON; NOVEIRI, 2004; MANSOUR; LAHNSTEINER;

BERGER, 2004). Vale salientar que a ativação dos espermatozoides deve ser possível com adição de uma solução ativadora no momento de sua utilização. Portanto, o desenvolvimento de um diluente para uma espécie de peixe exige estudos que avaliem possíveis efeitos tóxicos e sua consequência sobre a qualidade do sêmen (CARNEIRO, 2007).

#### **4.1.3 Água de coco em pó – ACP®**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) foi introduzido na Região Nordeste do Brasil pelos portugueses onde é predominantemente cultivado em áreas litorâneas (CUENCA *et al.*, 2002 *apud* ARAGÃO, 2002), pode ser aproveitado integralmente com objetivos artesanais, nutricionais, alimentícios, agroindustriais, medicinais e biotecnológicos (CARVALHO *et al.*, 2006).

O coco atinge seu peso máximo com aproximadamente seis meses de idade, mantendo-se constante por um ou dois meses. Posteriormente, ocorre um decréscimo acentuado de peso devido à perda de água (BENASSI *et al.*, 2007; GOMES, 1984 *apud* BENASSI, 2007). O albúmen líquido começa a se formar a partir dos dois meses após a inflorescência (RESENDE *et al.*, 2002 *apud* BENASSI *et al.*, 2007) e corresponde a 25% do peso do fruto. A parte interna do fruto é composta por 95,5% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C, vitaminas do complexo B e sais minerais (ARAGÃO, 2000).

A água de coco é um alimento rico em minerais, aminoácidos e possui propriedades de reposição de eletrólitos perdidos durante os esforços físicos (PENHA, 1998 *apud* LIMA, 2008). Nas últimas três décadas a água de coco vem sendo explorada na área de biotecnologia da reprodução, pois apresenta características que a classificam como um potencial meio de conservação para gametas. Segundo Barros e Toniolli (2011), devido ao seu potencial, a água de coco foi testada como diluente de diversas formas (Tabela 10).

Diante dos resultados promissores da utilização da água de coco como diluente para sêmen de diversas espécies animais, muitos pesquisadores se empenharam na busca da padronização e da estabilização do produto em forma de pó, foi então, elaborado o ACP® – água de coco em pó – (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil), meio comercial de conservação que possui composição bioquímica semelhante à forma *in natura*, resultado alcançado em 2002 (LEITE, 2011; SALGUEIRO; NUNES, 2012).

Tabela 10 – Formas de utilização de água de coco na preservação de sêmen de diversas espécies.

Água de coco	Descrição	Espécie	Referência
<i>In natura</i> (ACN)	50% de água de coco filtrada + 25% de água destilada + 25% citrato de sódio a 5%	<i>Colossoma macropomum</i> Suíno	FARIAS <i>et al.</i> (1999) TONIOLLI (1994)
Estabilizada (ACE)	envazada, esterilizada e refrigerada	Suíno	BARROS (2010)
Em gel (ACG)	em forma de gel	Caprino	SALES (1989)
Em pó (ACP)	obtida por liofilização em alto vácuo	<i>Colossoma macropomum</i> <i>Piaractus brachypomus</i> Caprino	LEITE <i>et al.</i> (2011) MELO (2010a) SALGUEIRO; NUNES; OLIVEIRA (2002)

Para utilização em peixes, o ACP<sup>®</sup> (Figura 12) foi ajustado de acordo com as exigências verificadas, surgindo o ACP-104, produto específico para a conservação de sêmen de peixes. Vários estudos já foram realizados com sucesso para espécies como: *Brycon orbignyanus* (MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003), *Colossoma macropomum* (LEITE, 2011; VIEIRA, 2010), *Piaractus brachypomus* (PESSOA, 2009; VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008) e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS *et al.*, 2010). Diante do exposto, Melo *et al.* (2010b) afirmam ser o ACP-104 uma inovação tecnológica como alternativa mercadológica para subsidiar a reprodução de peixes.

Figura 12 – Apresentação do ACP – Água de coco em pó.



Fonte: MELO (2010a).

O objetivo geral do trabalho descrito nesse capítulo foi avaliar a eficácia de diferentes diluentes durante a refrigeração sobre a motilidade de espermatozoides de tilápia-do-Nilo. Os objetivos específicos foram: testar o ACP-104 para o sêmen de tilápia-do-Nilo armazenado em refrigeração e verificar sua eficácia através da taxa de motilidade espermática e porcentagem de espermatozoides com velocidade média e rápida, por meio do *software* SCA (*Sperm Class Analyzer*).

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

A primeira parte do experimento, que consistiu na coleta de sêmen e na seleção das amostras não contaminadas, foi realizada na Estação de Piscicultura Prof. Dr. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca/UFC, onde os peixes foram mantidos em hapas montados em tanque de alvenaria. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (28% PB). A segunda parte do trabalho que foi a avaliação da taxa de motilidade dos espermatozoides em refrigeração, nos diferentes intervalos de tempo foi executada no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (LBRP-NIB/UECE).

### 4.2.1 Diluentes e Ativadores

Foram testados quatro diluentes elaborados conforme o seguinte protocolo:

a) Glicose (350 mOsm/kg): 6,3 g glicose + 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,9. Cálculo da quantidade de glicose (g) necessária para o preparo de 1 litro da solução a 350 mOsm/kg :

$$\begin{array}{r}
 180 \text{ mg glicose} \text{-----} 1 \text{ mOsm/kg} \\
 X \text{-----} 350 \text{ mOsm/kg} \\
 X = \frac{350 \text{ mOsm/kg} \times 180 \text{ mg}}{1 \text{ mOsm/kg}} = 63.000 \text{ mg L}^{-1}
 \end{array}$$

Para 100 mL de solução de glicose:

$$\begin{array}{r}
 63.000 \text{ mg} \text{-----} 1.000 \text{ mL} \\
 X \text{-----} 100 \text{ mL} \\
 X = 6,300 \text{ mg ou } 6,3 \text{ g}
 \end{array}$$

b) Ringer modificado para peixes (300 mOsm/kg): NaCl 6,5 g/L; KCl 3,0 g/L; NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g/L; CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,3 g/L; pH 7,8 (RANA, 1995 *apud* BROMAGE; ROBERTS, 1995).

c) Sacarose (300 mOsm/kg): 10,26 g sacarose + 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,5. Cálculo da quantidade de sacarose (g) necessária para a preparação de 1 litro da solução a 300 mOsm/kg:

Para um litro de solução de sacarose:

$$\begin{array}{l} 342,29 \text{ mg sacarose} \text{-----} 1 \text{ mOsm/kg} \\ X \text{-----} 300 \text{ mOsm/kg} \\ X = \frac{300 \text{ mOsm/kg} \times 342,29 \text{ mg}}{1 \text{ mOsm/kg}} = 102.687 \text{ mg L}^{-1} \end{array}$$

Para 100 mL de solução de sacarose:

$$\begin{array}{l} 102.687 \text{ mg} \text{-----} 1.000 \text{ mL} \\ X \text{-----} 100 \text{ mL} \\ X = 10.268,7 \text{ mg ou } 10,26 \text{ g} \end{array}$$

d) ACP-104 (339 mOsm/kg): 6g de ACP-104 tamponado + 100 mL de água destilada com pH 7,8.

A solução ativadora utilizada foi NaCl 25 mM: 0,146 g NaCl + 100 mL água destilada. A osmolaridade das soluções foi conferida por meio de osmômetro digital, (Roebing Automatic, Alemanha).

#### 4.2.2 Coleta e Avaliação do sêmen

Os peixes foram anestesiados com solução anestésica de eugenol na concentração de 120 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente os espécimes foram dispostos individualmente sobre a bancada envolvidos em toalha úmida, e a região urogenital foi seca com papel toalha. Foram realizadas massagens na região pélvica, no sentido crânio-caudal, e a coleta do sêmen expelido foi feita com uma micropipeta volumétrica. Imediatamente após a coleta, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto à contaminação. Para constatar a ausência de motilidade uma alíquota de 2 µL de sêmen foi colocada sobre lâmina ao microscópio de luz previamente focalizado em

400X. Amostras com mais de 5% de motilidade foram descartadas. As amostras livres de contaminação foram utilizadas para formação de cinco *pools* compostos pela doação de 150  $\mu\text{L}$  de sêmen de três peixes, totalizando 450  $\mu\text{L}$  de sêmen por *pool*. Durante os procedimentos as amostras foram mantidas em micro tubos em caixa isotérmica com gelo (aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente as amostras foram conduzidas ao NIB para dar continuidade ao experimento.

#### **4.2.3 Refrigeração do sêmen**

No LBRP-NIB, foram delineados cinco tratamentos com cinco repetições: 150  $\mu\text{L}$  de sêmen *in natura* de cada *pool* (TI). Para os demais tratamentos, cada *pool* de sêmen foi acrescentado dos diluidores: ACP-104 (TII), glicose (TIII), ringer (TIV) e sacarose (TV). A proporção sêmen/diluyente foi de 1:4, constituindo 50  $\mu\text{L}$  de sêmen em 200  $\mu\text{L}$  do diluyente. Os tubos de micro centrífuga com os tratamentos foram estocados em *rack* transparente, contendo em cada “poço” um volume de 1,5 mL de água destilada para evitar oscilação de temperatura, e acondicionados em refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . A temperatura interna do refrigerador foi monitorada por meio de um termômetro digital dotado de um sensor que foi inserido em um dos poços do *rack*.

#### **4.2.4 Avaliação da taxa de motilidade espermática**

As avaliações de cada unidade experimental foram realizadas imediatamente após a diluição (0 h), 24, 48 e 72 horas após refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ , mediante utilização de um sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), composto por um microscópio de contraste de fase (Nikon<sup>TM</sup> H550S, ECLIPSE 50i, Japão) ligado a uma câmera de vídeo (*Basler Vision Technologies*<sup>TM</sup> A312FC, Ahrensburg, Alemanha) que transmitiu as imagens ao computador contendo o *software Sperm Class Analyzer*<sup>®</sup> (SCA<sup>®</sup> 2005 *Microptic*, SL versão 3.2.0, Barcelona, Espanha).

Para a análise da motilidade, 5  $\mu\text{L}$  da amostra foram colocados em câmara de Makler<sup>TM</sup> (Figura 13), com adição de 25  $\mu\text{L}$  de solução de ativação (NaCl 25 mM). A câmara foi exposta ao sistema SCA (zoom de 400X, filtro verde, posição – pH1) e foi utilizado o módulo de motilidade em SCA<sup>®</sup>. Os espermatozoides foram considerados imóveis quando a VCL foi inferior a  $10 \mu\text{m s}^{-1}$ . Também foi avaliada a porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida e média.

Figura 13 – Câmara de Makler para observação da motilidade do sêmen refrigerado de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

Os dados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão. As médias foram analisadas pela Análise de Variância (ANOVA), e quando encontradas diferenças significativas entre as médias foi aplicado o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa BIOESTAT versão 5.0 em nível de significância de 5%.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de 1,5 mL de água nos poços do *rack* de estocagem do sêmen diluído em refrigeração impediu a variação de temperatura durante os procedimentos de determinação da taxa de motilidade, evitando os danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozoides, que segundo Salamon e Maxwell (1995) afetam negativamente a motilidade espermática.

As soluções inibidoras da motilidade espermática, cujas composições físico-químicas se assemelham a do plasma seminal, são utilizadas na diluição do sêmen no processo de refrigeração, com o propósito de aumentar o tempo útil do espermatozoide sem alterar significativamente a qualidade seminal (PEÑARANDA *et al.*, 2010). A diluição também reduz a competição por espaço e oxigênio (SANCHES; OLIVEIRA; SERRALHEIRO, 2009) possibilitando condição para maior longevidade. Porém o sucesso do diluente é incerto, exigindo estudos preliminares à sua utilização. Diluentes com bons resultados para uma espécie podem ser inadequados para outras. Esses fatores incentivam a busca por novos diluidores adequados à espécie de interesse.

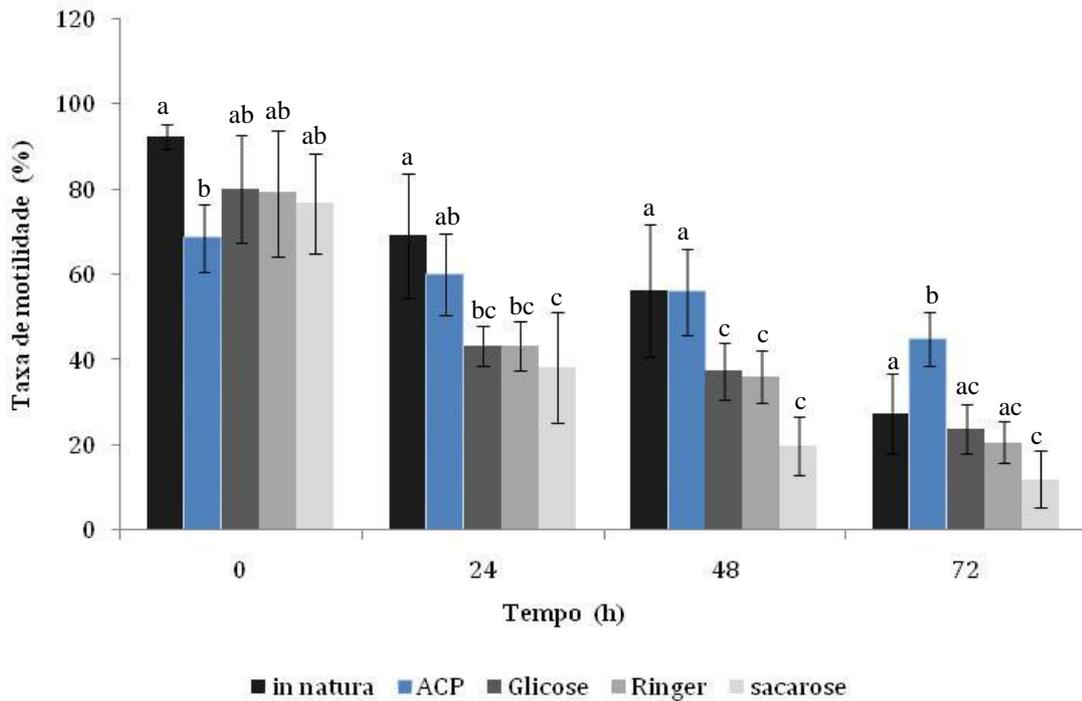
No presente trabalho, não houve diferença para a taxa de motilidade espermática imediatamente após a diluição do sêmen *in natura* quando comparado ao sêmen nos diluentes glicose, ringer e sacarose ( $p > 0,05$ ). Para o ACP-104, a taxa de motilidade não apresentou diferença entre os demais diluentes, porém essa diferença foi registrada quando comparada ao sêmen *in natura* ( $p < 0,05$ ). Também foi possível observar uma menor média de motilidade espermática para o sêmen diluído em ACP-104, o que sugere um choque imediato sobre as células mais frágeis. Porém estudos mais aprofundados devem ser realizados para elucidar o real motivo desse efeito provocado pelo ACP-104 sobre os espermatozoides.

Quando analisada 24 horas após a refrigeração, a média da taxa de motilidade espermática do sêmen *in natura* não diferiu da média da motilidade do sêmen em ACP-104 (Figura 14). Uma redução significativa foi observada para os demais diluentes em relação ao sêmen *in natura*. Nesta observação, os resultados sugerem que o ACP-104 possui maior capacidade de manutenção espermática.

A média da taxa de motilidade espermática registrada 48 horas após a estocagem das amostras em refrigeração não apresentou diferença entre os tratamentos com glicose ringer e sacarose ( $p > 0,05$ ). Também não foi verificada diferença estatística entre o sêmen *in natura* e o diluído em ACP-104. Os registros da taxa de motilidade espermática após 72 horas de estocagem em refrigeração ( $0 - 4^{\circ}\text{C}$ ) ratificam a capacidade do ACP-104 em manter a qualidade dos espermatozoides durante esse período, tendo em vista que nessa observação a taxa de motilidade do sêmen diluído no supracitado diluente apresentou diferença entre os demais diluentes, com valores superiores, inclusive em relação ao sêmen *in natura* ( $p < 0,05$ ).

A solução de glicose a 5% é um dos diluentes mais utilizados na criopreservação de sêmen de peixes, agindo como componente osmótico, fonte de energia e agente protetor graças ao seu elevado peso molecular (HOLT, 2000; SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012) e oferecendo resultados satisfatórios para uma variedade de espécies. No presente trabalho os resultados mostraram que a taxa de motilidade espermática registrada para o sêmen de tilápia diluído em glicose 350 mOsm/kg, logo após a diluição foi de 80,1%, superior a motilidade de 73,33% obtida para o sêmen de *Brycon orbignyanus* diluído em glicose 5% (MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003). No entanto essa taxa obtida apresentou uma redução significativa quando verificada 24 horas após a diluição, atingindo 23,9% após 72 horas de estocagem.

Figura 14 – Taxa de motilidade de sêmen de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*, diluído e resfriado a 4°C nos diferentes intervalos de tempo.



Quanto aos resultados registrados para o sêmen diluído em ringer, a Tabela 11 mostra que a taxa de motilidade espermática sofreu uma redução significativa entre o tempo zero e 24 horas após a estocagem, mantendo a estabilidade por até 48 horas e novamente sofrendo um decréscimo significativo 72 horas após a diluição e estocagem em refrigeração. Portanto esses resultados indicam que após 72 horas em temperatura de refrigeração, o sêmen de tilápia diluído em ringer apresentou baixa qualidade, provavelmente inviável para congelamento.

A sacarose, assim como a glicose, é um diluente testado na conservação de espermatozoides, principalmente na criopreservação combinada com crioprotetores. Estudos nesse sentido foram realizados para o sêmen de *Esox masquinongy* (CIERESZKO *et al.*, 1999), de carpa comum (HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI, 2003) e de *Paralichthys orbignyanus* (LANES, 2008).

Para o ACP-104, a taxa de motilidade diminuiu gradativamente no intervalo entre a primeira (0 h) e a quarta observação (48 h), no entanto não apresentou diferença significativa. A motilidade registrada para 72 h após a diluição e refrigeração foi de 44,9%, sem diferença estatística em relação às duas observações anteriores (Tabela 11).

Tabela 11 - Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão) do sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* diluído em diferentes soluções e armazenado a 0 - 4°C por até 72 horas.

Diluyente	0	24	48	72
Sêmen não diluído	92,3 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	69,1 $\pm$ 14,6 <sup>b</sup>	56,1 $\pm$ 15,5 <sup>b</sup>	27,3 $\pm$ 9,3 <sup>c</sup>
ACP-104	68,4 $\pm$ 8,0 <sup>a</sup>	59,9 $\pm$ 9,6 <sup>ab</sup>	55,8 $\pm$ 10,2 <sup>ab</sup>	44,9 $\pm$ 6,3 <sup>b</sup>
Glicose	80,1 $\pm$ 12,7 <sup>a</sup>	43,3 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	37,3 $\pm$ 6,8 <sup>bc</sup>	23,9 $\pm$ 5,8 <sup>c</sup>
Ringer	79,1 $\pm$ 13,2 <sup>a</sup>	43,2 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	36,0 $\pm$ 6,0 <sup>b</sup>	20,6 $\pm$ 4,9 <sup>c</sup>
Sacarose	76,7 $\pm$ 11,7 <sup>a</sup>	38,2 $\pm$ 12,9 <sup>b</sup>	19,9 $\pm$ 6,9 <sup>c</sup>	11,9 $\pm$ 6,7 <sup>c</sup>

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre si significativamente ( $p < 0,05$ ).

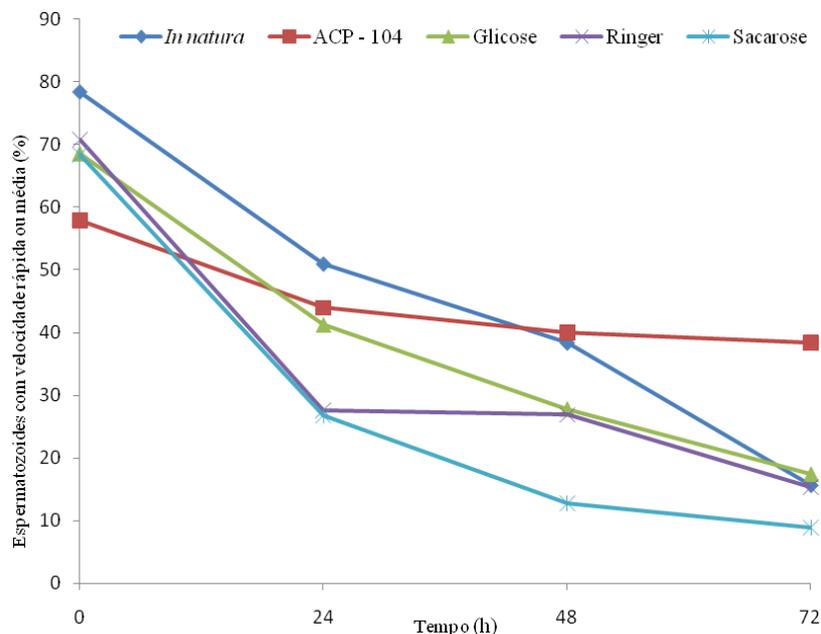
A motilidade espermática logo após a diluição em ACP-104 foi de 76,6%, esse valor foi inferior ao encontrado por Oliveira (2012) para sêmen de *Collossoma macropomum* diluído em ACP-104 combinado com diferentes crioprotetores e refrigerado. Porém a taxa de motilidade registrada após 24 horas em refrigeração foi semelhante à observada pelo mesmo autor para tambaqui, em tempo similar. Maria *et al.* (2006), usando água de coco industrializada como diluyente para sêmen de piracanjuba, obtiveram taxa de motilidade de 8%, 24 horas depois de submetido a baixas temperaturas. Os valores de motilidade registrados para o sêmen de tilápia diluído em ACP-104, 48 e 72 horas após a refrigeração foram superiores aos obtidos para tambaqui, no mesmo período de observação (OLIVEIRA, 2012).

Foi possível verificar que as amostras refrigeradas *in natura* apresentaram maior porcentagem média (78,4  $\pm$  5%) de espermatozoides com velocidade média e rápida, logo após a diluição (tempo zero). As amostras diluídas em glicose, ringer e sacarose, apresentaram 68,40%, 70,74% e 68,36% de espermatozoides com velocidades médias e rápidas, respectivamente. Nessa avaliação, o sêmen diluído em ACP-104 apresentou menor porcentagem (57,95%) de espermatozoides com velocidade média e rápida. Porém, 24 horas depois da diluição do sêmen e estocagem sob refrigeração, as amostras em ACP-104 apresentaram resultados superiores aos registrados para os demais diluentes ficando inferior somente, quando comparadas ao sêmen *in natura* (Figura 15).

A avaliação realizada 48 horas após a diluição do sêmen revelou que as amostras em ACP-104 apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com velocidade média e rápida, superando inclusive o sêmen estocado *in natura*. Observou-se também que entre os intervalos de 48 e 72 horas, os demais tratamentos apresentaram uma porcentagem de espermatozoides com velocidade média e rápida inferior a 20% com exceção das amostras diluídas em ACP-104, que apresentaram uma aparente constância entre esses dois intervalos de observação mantendo, portanto, a qualidade em relação à variável considerada. Algumas informações acerca das características do sêmen utilizado no momento da fertilização de

ovócitos são essenciais para o sucesso da reprodução manipulada. Rurangwa *et al.* (2004) e Viveiros *et al.* (2010) afirmam que o bom desempenho reprodutivo de peixes está associado à taxa de motilidade espermática e à velocidade do espermatozoide. Esses dois parâmetros podem estar relacionados à maior possibilidade do espermatozoide alcançar a micrópila do ovócito.

Figura 15 - Espermatozoides de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* com velocidade rápida ou média nos diferentes intervalos de tempo, submetidos à refrigeração (4°C).



#### 4.4 CONCLUSÕES

Os resultados da taxa de motilidade espermática do sêmen de tilápia mantido em refrigeração sugeriram que o ACP-104 impôs um choque imediato sobre as células mais frágeis. Porém manteve a boa qualidade dos gametas por até 72 horas após a diluição e refrigeração.

A afirmação sobre a melhor qualidade do sêmen diluído em ACP-104 foi fortalecida pela maior porcentagem de espermatozoides com velocidade média e rápida após 72 horas de estocagem a 4°C.

O ACP-104 pode colaborar para o desenvolvimento de técnicas de manutenção e conservação de espermatozoides de tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, e subsidiar o estabelecimento de um programa de melhoramento genético da espécie na Região Nordeste do Brasil.

## **CAPÍTULO 4 – CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO UTILIZANDO ACP-104 ADICIONADO DE CRIOPROTETOR**

Este capítulo relata a utilização de diferentes diluentes adicionados de crioprotetores para criopreservação do sêmen de tilápia. Os resultados indicam que o criodiluyente à base de ACP-104 tem potencial para ser utilizado na conservação do sêmen da tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

### **5.1 INTRODUÇÃO**

O conhecimento sobre a preservação de sêmen de peixe vem avançando desde a década de 1950. Os primeiros trabalhos foram realizados por Barret (1951 *apud* MARQUES; GODINHO, 2004), que verificou a viabilidade de células germinativas de salmónídeo depois da estocagem, e por Blaxter (1953 *apud* CARNEIRO, 2007), que procurou viabilizar o cruzamento de duas variedades de arenque que desovam em diferentes épocas do ano.

O desenvolvimento de técnicas para o armazenamento de sêmen de peixes pode ser justificado tanto por razões ambientais quanto econômicas. As agressões ambientais promovidas nos últimos anos, principalmente a ambientes aquáticos, afetam diretamente as populações de espécies de peixes nativos, que mesmo antes de entrarem para a lista daquelas ameaçadas de extinção, algumas de suas características genéticas podem ter sido alteradas ou perdidas como estratégia de adaptação às condições ambientais alteradas (CARNEIRO, 2007). As estratégias de recuperação da ictiofauna de corpos d'água que passam por modificações em consequência da deterioração genética podem ser grandemente auxiliadas por sêmen coletado em um período anterior e armazenado em baixas temperaturas (RANA, 1995 *apud* BROMAGE; ROBERTS, 1995).

Quanto à questão econômica que está diretamente relacionada à aquicultura existem muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes. O cultivo intensivo e a propagação artificial requerem tecnologias próprias de manipulação dos gametas, as quais incluem o armazenamento em curto prazo para facilitar a reprodução artificial ou mesmo para melhorar sua eficácia (KOVÁKS, 1990).

Dentre os diversos benefícios da preservação do sêmen, pode-se destacar a exclusão da assincronia reprodutiva entre fêmeas e machos, conservação da variabilidade genética em populações domesticadas e facilidade no estabelecimento de programas de

melhoramento genético (CAROLSFELD *et al.*, 2003; RIBEIRO; GODINHO, 2003; SUQUET *et al.*, 2000).

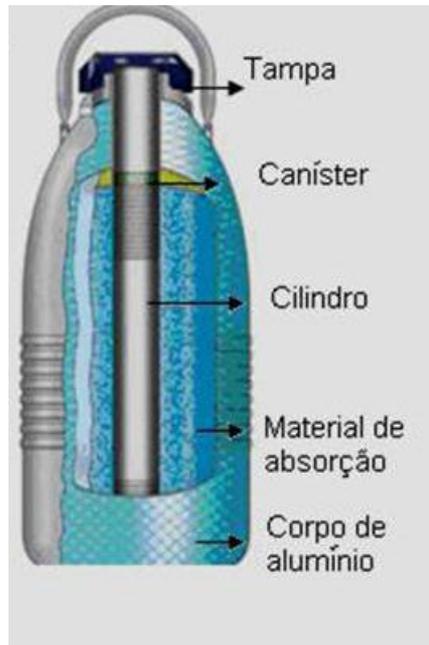
A preservação de gametas pode ser realizada em curto prazo, que consiste em manter a viabilidade espermática por um período de horas ou dias em temperatura de refrigeração (SUQUET *et al.*, 2000) e, em longo prazo, que envolve procedimentos de armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (MURGAS *et al.*, 2007).

### **5.1.1 Criopreservação**

A criopreservação de sêmen consiste na preservação de gametas masculinos em nitrogênio líquido, à temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , por tempo indeterminado e sem prejuízos a sua estrutura e função. Durante esse processo alguns fatores como diluição, congelação e descongelação exigem atenção. A criopreservação de sêmen de peixes envolve os seguintes procedimentos: (1) preparo dos criodiluentes; (2) coleta do sêmen; (3) seleção por microscopia de amostras aptas; (4) adição de diluentes e crioprotetores; (5) envase; (6) congelação em vapor de nitrogênio; (7) armazenamento em nitrogênio líquido; (8) descongelação; e (9) utilização do material descongelado. Segundo Lezcano (2001) e Melo (2010a), durante o processo de congelação a célula espermática passa por três etapas. Na primeira há substituição de grande parte da água intracelular por solução crioprotetora. Na segunda ocorre regulação da osmolaridade em relação ao meio extracelular, podendo sofrer impacto osmótico. Na terceira e última etapa ocorre redução da temperatura, passando pelo ponto de congelação dos meios líquidos, com risco da formação de cristais.

O sucesso da criopreservação depende da eficácia da técnica aplicada em eliminar a água excedente do interior da célula espermática impedindo assim, a formação de cristais de gelo intracelular (CARNEIRO, 2007; MARIA; CARNEIRO, 2012), que é um dos principais problemas durante a criopreservação de sêmen (MATEOUS-REX; AGUILLAR, 1996 *apud* VIEIRA, 2010). A congelação em *dry shipper* (Figura 16), que um recipiente utilizado para transporte em temperatura criogênica, foi utilizado com sucesso para o congelação de sêmen de piracanjuba (MURGAS; FRANCISCATO; SANTOS, 2003), de pirapitinga (MELO, 2010a; NASCIMENTO *et al.*, 2010) e de curimba (VIVEIROS *et al.*, 2008). No entanto outros equipamentos podem ser utilizados para esta etapa do processo.

Figura 16 – Equipamento para congelamento de sêmen - *Dry shipper*.



Fonte: MELO (2010a)

Várias atividades podem ser otimizadas com o uso de sêmen congelado, incluindo sua obtenção em tempos e locais diferentes e utilização em programas de melhoramento genético. A criopreservação de sêmen tem alcançado grandes progressos na área da aquicultura e tem sido estudada com diferentes protocolos em mais de 200 espécies de peixes de água doce como: *catfishs*, *Silurus glanis*, *Pangasius hypophthalmus* e *Clarias gariepinus* (KWANTONG; BART, 2009; LINHART *et al.*, 2005; VIVEIROS; SO; KOMEN, 2000), carpa, *Labeo rohita* (ROUTRAY *et al.*, 2006) e truta, *Salmo trutta caspius* (SARVI *et al.*, 2006), e mais de 32 espécies marinhas como esturjão, *Acipenser sturio* (KOPEIKA; WILLIOT; GONCHAROV, 2000), *Lutjanus campechanus* (RILEY *et al.*, 2004), salmão, *Oncorhynchus tshawytscha* (ROSENGRAVE *et al.*, 2008), e *Lutjanus argentimaculatus* (VUTHIPHANDCHAI; CHOMPETHAWACH; NIMRAT, 2009).

Segundo Maria e Carneiro (2012), atualmente no Brasil, existem vários protocolos bem definidos para algumas espécies das famílias Characidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Pimelodidae (CAROLSFELD *et al.*, 2003; VIVEIROS, 2011; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

A congelação do sêmen de peixe deve ser realizada mediante prévia diluição em soluções contendo diluentes e crioprotetores. Estas soluções crioprotetoras devem evitar as crioinjúrias dos espermatozoides e a iniciação da motilidade.

### 5.1.2 Soluções crioprotetoras e Taxa de congelamento

O sucesso da criopreservação depende não somente da escolha certa dos crioprotetores e diluentes, mas também do protocolo utilizado (MARIA, 2005). As substâncias adicionadas para exercer função crioprotetora diretamente sobre a célula espermática são divididas em crioprotetores intracelulares e extracelulares. Os intracelulares devem ser capazes de substituir parte da água da célula reduzindo sua temperatura de congelamento interior e impedindo a formação interna de cristais de gelo (CARNEIRO *et al.*, 2007). Os crioprotetores extracelulares têm função de impedir a formação do gelo, protegendo a membrana contra injúrias e de promover a desidratação celular (NEVES, 2008). O produto mais conhecido e utilizado em sêmen de peixe como crioprotetor intracelular é o dimetilsulfóxido (DMSO), entretanto outras substâncias como a dimetilacetamida (DMA) (RILEY *et al.*, 2004), o glicerol (BAG *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2009) e o metanol (MURGAS *et al.*, 2007) também têm sido empregadas para algumas espécies (SUQUET *et al.*, 2000). Segundo Viveiros (2005), estes crioprotetores oferecem melhores resultados para sêmen de peixes, registrando boas taxas de motilidade pós-decongelação e percentuais de fecundação satisfatórios. Miliorini (2006) verificou que a utilização de DMSO como crioprotetor para o sêmen de curimba, *Prochilodus lineatus*, reduziu a ocorrência de defeitos na cauda do espermatozoide quando comparado com metanol como crioprotetor, e Cruz (2001) registrou maior duração média de motilidade espermática para o sêmen da mesma espécie utilizando criodiluidor à base de DMSO.

O DMA, embora menos utilizado como crioprotetor para sêmen de peixes do que o DMSO apresenta resultados de sucesso para algumas espécies. Reza *et al.* (2001) registraram maior porcentagem de espermatozoides rápidos quando utilizaram DMA como criodiluidor de sêmen de *catfish*, *Sorubim cuspicaudus*. Horváth e Urbányi (2000) utilizaram DMA como crioprotetor para sêmen de *catfish*, *Clarias gariepinus* e obtiveram taxa de fertilização acima de 85%.

Para proteção extracelular do espermatozoide, os produtos mais utilizados são glicose, sacarose, lactose, trealose e manitol (DENNISTON *et al.*, 2000; NEVES, 2008). Outro protetor comumente usado é a gema de ovo, que além de funcionar como fonte de nutrientes, também tem ação crioprotetora por conter ácidos graxos e antioxidantes (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

A Tabela 12 mostra uma variedade de produtos e combinações utilizadas em soluções crioprotetoras para algumas espécies de peixes. Segundo Kasai (1996) e Vajta

(2000), a combinação de dois ou mais crioprotetores, bem como a utilização de produtos menos tóxicos, são estratégias utilizadas para reduzir os danos às células. A eficiência dos crioprotetores intracelulares pode ser maximizada quando combinados a outro de ação extracelular (DENNISTON *et al.*, 2000).

As taxas de diluição do sêmen em criodiluinte são amplamente pesquisadas e variam entre espécies. Assim, Tian *et al.* (2008) utilizaram uma diluição de 1:2 (sêmen:diluinte) para *halibut*, *Verasper variegatus*; Viveiros *et al.* (2009a) utilizaram diluição de 1:9 para curimba, *Prochilodus lineatus*; Vuthiphandchai, Chomphuthawach e Nimrat (2009) utilizaram taxa de diluição de 1:1 para *red snapper*, *Lutjanus argentimaculatus*; e Godinho, Amorim e Peixoto (2003) utilizaram diluição de 1:9 para tilápia-do-Nilo.

Os crioprotetores e a taxa de congelação simultaneamente determinam os danos causados aos espermatozoides devido à formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1977). Para que ocorra a congelação adequada dos espermatozoides, o tempo e a velocidade de congelamento devem ser considerados. No caso de uma refrigeração muito rápida, a água intracelular poderá ser congelada antes que ocorra a desidratação completa, provocando assim a morte da célula, no entanto se a congelação for muito lenta pode ocorrer o choque osmótico, quando as células são desidratadas satisfatoriamente, mas a concentração de solutos se torna muito alta, o que poderá causar a remoção da água de ligação celular (KOVÁCS, 1990).

Tabela 12 – Criodiluentes usados para diferentes espécies de peixes.

Criodiluentes	Espécie	Referência
Glicose 5% + metanol + gema de ovo	<i>Oreochromis niloticus</i>	GODINHO; AMORIM; PEIXOTO (2003)
Frutose + Tris + metanol	<i>Cyprinus carpio</i>	HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI (2003)
Glicose + metanol + gema de ovo	<i>Salmo trutta caspius</i>	SARVI <i>et al.</i> (2006)
BTS <sup>®</sup> ( <i>Beltsville thawing Solution</i> ) - metilglicol NaCl 200 mM + DMSO	<i>Brycon nattereri</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2007)
Ringer + metanol	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	PAN <i>et al.</i> (2008)
Glicose 5% + metilglicol	<i>Prochilodus lineatus</i>	VIVEIROS <i>et al.</i> (2009a)
Sacarose + DMSO	<i>C. carpio</i>	IRAWAN; VUTHIPHANDCHAI; NIMRAT (2010)
ACP-104 + DMSO	<i>Colossoma macropomum</i>	LEITE <i>et al.</i> (2011)
Glicose 6% + DMSO	<i>Prochilodus magdalenae</i>	MARTÍNEZ; TARAZONA-MORALES; PARDO-CARRASCO (2012)

Taxas de congelamento situadas entre  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  são consideradas adequadas para a criopreservação de sêmen de peixes. A temperatura do sêmen deve ser levada rapidamente até  $-50^{\circ}\text{C}$ , porém entre  $-50^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  a velocidade deve ser um pouco mais lenta. Desse modo, o sêmen pode ser transferido para nitrogênio líquido e a temperatura levada a  $-96^{\circ}\text{C}$  (HARVEY; CAROLSFELD, 1993 *apud* MURGAS *et al.*, 2007). Algumas espécies apresentam alta taxa de motilidade espermática pós-descongelamento quando criopreservadas em combinações de diferentes taxas de congelamento (SANSONE *et al.*, 2002). Por exemplo, Viveiros, So e Komen (2000) utilizaram uma taxa de congelamento para o sêmen de *catfish* (*Clarias gariepinus*) de  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $5^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ , mantendo sob esta temperatura por 5 min, depois imergindo em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) e obtiveram taxas de eclosão dos ovos semelhantes às do sêmen *in natura*. Yang *et al.* (2009) desenvolveram um protocolo de criopreservação de sêmen de *Xiphophorus couchianus* em que a taxa de congelamento foi de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $5^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  com imersão imediata em nitrogênio líquido.

Vários protocolos foram desenvolvidos utilizando diferentes taxas e métodos de congelamento para diversas espécies de peixes como: *Morone saxatilis* (THIRUMALA *et al.*, 2006), *Maccullochella peelii peelii* (DALY *et al.*, 2008), *Siniperca chuatsi* (DING *et al.*, 2009) e *Carassius auratus* (MORITZ; LABBE, 2008).

### 5.1.3. Toxicidade dos crioprotetores

Por serem quimicamente tóxicos, os crioprotetores podem causar injúrias aos espermatozoides, portanto devem ser utilizados em baixas concentrações e a exposição das células ao produto deve ser breve, com rápidas taxas de refrigeração (VAJTA; HOLM; KUWAYAMA, 1998). As substâncias utilizadas como crioprotetores, quando tóxicas provocam lesões na membrana celular. Essa reação foi verificada por Martinez, Tarazona-Morales e Pardo-Carrasco (2012), utilizando 15% de DMSO como crioprotetor para o sêmen de *Prochilodus magdalenae*. Portanto a concentração de crioprotetor a ser utilizada durante os procedimentos de congelamento é limitada pela sua toxicidade. Segundo Martino, Pollard e Leibo (1996), a refrigeração rápida possibilita a redução dos danos celulares uma vez que passa rapidamente pela zona de perigo situada entre  $+15^{\circ}\text{C}$  e  $-5^{\circ}\text{C}$ . Diante disso, o desenvolvimento de uma solução crioprotetora exige testes para estabelecimento das concentrações adequadas do protetor, podendo variar entre espécies. Proporções inadequadas podem causar alta toxicidade prejudicando a integridade e funcionalidade do espermatozoide (MARIA; CARNEIRO, 2012).

Dentre os crioprotetores mais utilizados, o metanol possui a maior capacidade de penetração na célula, no entanto também apresenta maior toxicidade exceto para o sêmen de tilápia-do-Nilo (HARVEY; CAROLSFELD, 1993 *apud* MURGAS *et al.*, 2007). Já o DMSO possui baixa toxicidade e é considerado eficiente em proteger o espermatozoide dos efeitos negativos da refrigeração (PELETEIRO; CHEREGUINI; CAL, 1996 *apud* SANCHES; OLIVEIRA; SERRALHEIRO, 2009). De acordo com Chao e Liao (2001), o DMSO é um dos crioprotetores mais utilizados em congelação espermática.

De acordo com Kasai (1996), uma das características de um agente crioprotetor eficiente é a baixa toxicidade com rápida capacidade de penetração reduzindo o tempo de exposição da célula ao crioprotetor durante a passagem pela temperatura crítica, prevenindo assim as injúrias osmóticas.

#### **5.1.4 Descongelação**

A congelação do sêmen consiste na perda de água e na desidratação das células, enquanto que durante a descongelação a célula é reidratada, através do influxo de água para seu interior (HOLT, 2000). Grande parte das células suporta a descongelação rápida necessária para evitar a recristalização, quando os pequenos cristais se reúnem e formam cristais maiores que danificam a célula (LEUNG, 1991 *apud* YANG; TIERSCH, 2009).

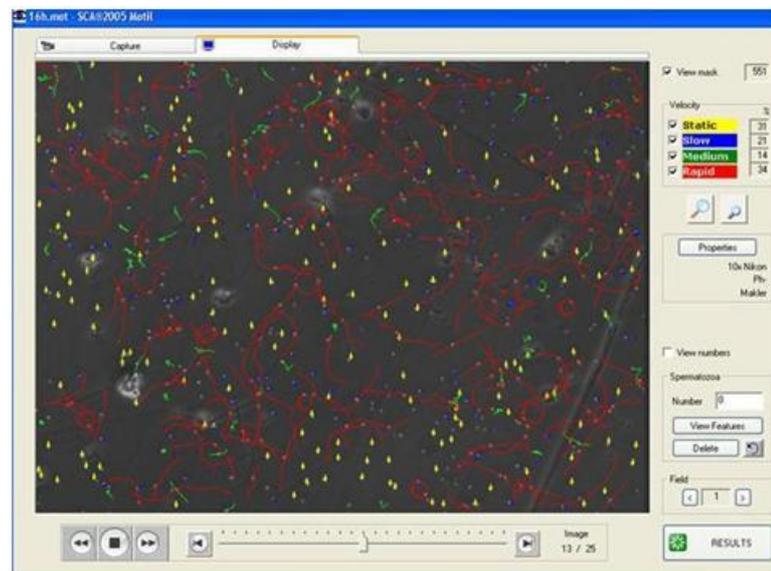
Palhetas com sêmen congelado são retiradas do botijão de nitrogênio líquido e imersas em banho térmico por curto intervalo de tempo. Geralmente, excelentes resultados são obtidos em descongelação em temperaturas variando de 50°C a 60°C. Porém, o uso de temperaturas mais elevadas pode causar superaquecimento, que é letal aos espermatozoides (MARIA, 2005). O aquecimento da palheta deve ser realizado em tempo suficiente para iniciar a descongelação do conteúdo e, naturalmente, a temperatura da palheta permanecerá em elevação completando o processo de descongelação após sua retirada da água aquecida (CAROLSFELD; HARVEY, 1999 *apud* VIVEIROS *et al.*, 2009b).

A temperatura e o tempo de imersão para a descongelação do sêmen estocado em palhetas de 0,5 mL é amplamente discutida por diversos autores. Godinho, Amorim e Peixoto (2003) descongelaram o sêmen de tilápia-do-Nilo a 30°C por seis segundos; Riley *et al.* (2004) desconglaram sêmen de *Lutjanus campechanus* a 40°C por sete segundos; Murgas *et al.* (2007) descongelaram o sêmen de *Prochilodus lineatus* a 60°C por oito segundos e Yang e Tiersch (2009) descongelaram sêmen de *Xiphophorus* sp. a 40°C por cinco segundos.

### 5.1.5 Utilização da análise computadorizada para avaliação espermática

A qualidade do sêmen está diretamente relacionada à taxa de motilidade e à velocidade do espermatozoide. Esta avaliação antes realizada subjetivamente pode ser realizada de forma mais segura através de métodos automatizados de avaliação da motilidade seminal que fornecem respostas seguras. A Análise de Sêmen Auxiliada por Computador - *Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)* é um sistema aplicado para captação de imagens, digitalização e análise sucessivas de amostras seminais, fornecendo informações precisas da movimentação de cada célula, e de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004), podendo analisar objetivamente a porcentagem de espermatozoides móveis (Figura 17) e seus parâmetros de velocidade além de características como morfometria do espermatozoide. Este método tem sido amplamente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de aves e mamíferos, sendo sua aplicação mais recente em estudos com peixes (RURANGWA *et al.*, 2001).

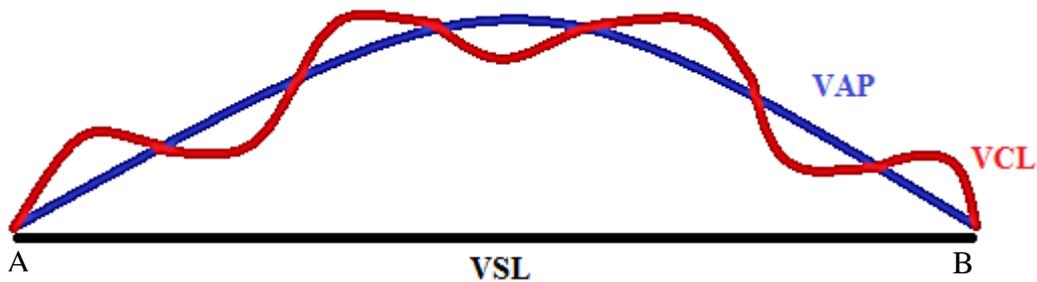
Figura 17 – Imagem captada do monitor do sistema CASA no momento da análise de motilidade espermática.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

Segundo Verstegen, Iguer-Ouada e Onclin (2002), o CASA fornece, além da taxa de motilidade espermática, informações relacionadas à velocidade e à trajetória do espermatozoide (Figura 18). As informações fornecidas sobre a velocidade são: velocidade curvilínea (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear progressiva (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ) e velocidade média da trajetória (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ).

Figura 18 - Velocidades medidas pelo sistema CASA. VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade linear progressiva; VAP = velocidade média da trajetória.



Fonte: LEITE (2011).

Para o sêmen de peixes o CASA foi utilizado em estudos de espécies como *Gadus morhua* (BABIÁK *et al.*, 2012), *Colossoma macropomum* (LEITE, 2011), *Piaractus brachypomus* (MELO, 2010a) e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS *et al.*, 2010).

Esse capítulo teve como objetivo geral avaliar diferentes soluções crioprotetoras como agentes protetores do sêmen de tilápia-do-Nilo durante a criopreservação. Os objetivos específicos foram: verificar a eficácia do ACP-104 adicionado de diferentes crioprotetores para o sêmen de tilápia-do-Nilo por meio da taxa de motilidade e determinar parâmetros de velocidade do espermatozoide pós-descongelamento da referida espécie.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento teve início na Estação de Piscicultura Prof. Dr. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca/UFC, onde foi realizada a coleta de sêmen e a seleção das amostras aptas à utilização. A segunda parte do trabalho foi executada no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes do Núcleo Integrado de Biotecnologia/UECE.

O plantel de reprodutores foi mantido em tanque de alvenaria de 30 m<sup>2</sup> e alimentado duas vezes ao dia com ração comercial (28% PB). As variáveis limnológicas foram monitoradas e mantidas dentro dos parâmetros recomendados para a espécie.

### 5.2.1 Coleta das amostras e Formação dos pools

Os peixes com peso médio de  $760,5 \pm 122,5$  g foram anestesiados individualmente em solução de eugenol à concentração de 120 mg L<sup>-1</sup>, pesados e encaminhados ao procedimento de colheita. Para a coleta dos gametas a papila genital foi

enxuta, em seguida foi feita uma massagem abdominal no sentido crânio-caudal e o sêmen foi coletado por meio de micropipeta automática e transferido para tubos de micro centrífuga.

A seleção das amostras aptas à criopreservação foi realizada pela constatação da ausência de motilidade. Para a seleção, uma alíquota de 2  $\mu$ L de sêmen foi colocada sobre lâmina previamente focalizada ao microscópio de focalizado em 400X. As amostras livres de contaminação foram utilizadas para formação de cinco *pools* compostos pela doação das mesmas quantidades de sêmen de quatro peixes totalizando 1,4 mL. Durante os procedimentos as amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo (aproximadamente 4°C).

### **5.2.2 Criodiluentes e Solução ativadora**

Foram testados oito meios criodiluentes resultantes da combinação de quatro diluentes e dois crioprotetores. Os diluidores utilizados foram glicose 350 mOsm/kg (pH 7,9), meio de conservação para sêmen de peixes à base de água de coco em pó (ACP-104, Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brazil; 300 mOsm/kg; pH 7,8), ringer modificado para peixes (NaCl 6,5g/L; KCl 3,0 g/L; NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g/L; CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,3 g/L; 300 mOsm/kg; pH 7,8;) e sacarose 300 mOsm/kg; pH 7,5). Cada solução diluente foi acrescida de 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) ou DMA (dimetilacetamida).

A solução ativadora utilizada foi NaCl 25 mM (0,146 g NaCl + 100 mL água destilada). A osmolaridade das soluções foi conferida por meio de osmômetro digital (Roebeling automatic, Alemanha).

### **5.2.3 Diluição, Envase e Congelação**

Em tubos de ensaio com tampa rosqueável, cada *pool* de sêmen foi dividido e diluído nas soluções criodiluentes na proporção de 10% de sêmen em 90% do meio (diluição 1:9).

Palhetas (IMV, France) transparentes estéreis com capacidade para 0,5 mL (Figura 19), previamente identificadas, foram mantidas em refrigeração até o momento do envase. Para cada tratamento foram utilizadas três palhetas preenchidas por sucção da amostra.

Figura 19 - Palhetas transparentes de 0,5 mL utilizadas para criopreservação de sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.



Fonte: Erivânia Gomes Teixeira

Após o envase, as palhetas foram seladas em álcool polivinílico, dispostas em globetes e estocadas em *racks* previamente identificadas. As *racks* foram imediatamente depositadas em canister e levadas ao *dry shiper* (-160°C, Chengdu Golden, Phoemix Liquid Nitrogen Container Ltda) para congelação em vapor de nitrogênio líquido por 30 min. Após esse período, as amostras de cada tratamento foram transferidas para botijão com nitrogênio líquido onde permaneceram imersas (-196°C) por 30 dias.

#### 5.2.4 Descongelação e Avaliação

A descongelação das amostras foi realizada 30 dias após o armazenamento em botijão criogênico. Cada palheta foi retirada do botijão, imediatamente exposta ao banho de imersão térmico à temperatura de 30°C por seis segundos, conforme metodologia descrita por Godinho, Amorim e Peixoto (2003). O conteúdo foi liberado em placa de Petri e imediatamente, 5 µL da amostra foram depositados em câmara de Makler® com adição de 25 µL de solução ativadora (NaCl 25 mM) para análise da taxa de motilidade e velocidade do espermatozoide por meio do módulo de motilidade do software SCA (*Sperm Class Analyzer* versão 3.2.0, Microptic, Barcelona, Espanha; zoom 400X, filtro verde, posição pH1). Os parâmetros de velocidade avaliados foram: velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s) e velocidade média da trajetória (VAP µm/s) (n > 800 espermatozoides/amostra).

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA) e quando encontradas diferenças significativas entre as médias foi aplicado o teste de Tukey. Todas as

análises foram realizadas utilizando o programa BIOESTAT versão 5.0 em nível de significância de 5%.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 13 mostra os resultados para a taxa de motilidade espermática pós-descongelamento para os diferentes criodiluentes.

Table 13 – Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão) de espermatozoides pós-descongelamento de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* usando quatro diluentes associados a dois crioprotetores através da avaliação objetiva.

Diluentes	Motilidade (%)	
	DMSO	DMA
Glicose	23,4 $\pm$ 6,3 <sup>Aa</sup>	15,3 $\pm$ 3,7 <sup>Ba</sup>
ACP-104	33,3 $\pm$ 6,6 <sup>Ab</sup>	22,9 $\pm$ 7,0 <sup>Bb</sup>
Ringer	18,3 $\pm$ 2,0 <sup>Aa</sup>	12,3 $\pm$ 4,4 <sup>Ba</sup>
Sacarose	22,5 $\pm$ 3,3 <sup>Aa</sup>	14,0 $\pm$ 6,8 <sup>Ba</sup>

Letras maiúsculas distintas representam diferença significativa entre colunas (crioprotetores) e letras minúsculas distintas representam diferença significativa entre linhas (diluentes) ( $p < 0,05$ ).

Para os quatro diluentes testados, a taxa de motilidade espermática do sêmen de tilápia criopreservado com DMSO foi sempre superior ao sêmen criopreservado em DMA ( $p < 0,05$ ). Quando o DMA foi avaliado como crioprotetor, não foi observada diferença entre o sêmen criopreservado em glicose, ringer e sacarose ( $p > 0,05$ ). A motilidade nesses diluentes são inferiores aos registrados por Godinho, Amorim e Peixoto (2003), quando testaram diferentes concentrações de metanol como crioprotetor para sêmen de tilápia-do-Nilo e obtiveram taxa de motilidade espermática de 46,3  $\pm$  15,1%. Para sêmen de tambaqui, *C. macropomum*, Menezes *et al.* (2008) registraram motilidade espermática menor que 5% quando testaram glicose acrescida de DMA.

No presente estudo, embora o DMA tenha oferecido baixa taxa de motilidade espermática, dentre os diluentes testados, o ACP-104 apresentou resultado significativamente superior quando comparado aos demais. Este resultado pode estar relacionado, entre outros fatores, ao IAA (ácido 3-indol-acético) presente na água de coco e que possui ação protetora sobre os espermatozoides, mantendo normal sua morfologia (TONIOLLI; MEDEIROS; FIGUEIREDO, 1999), protegendo-o, provavelmente da toxicidade do DMA. De acordo com Nunes, Combarous e Priscila (1994 *apud* BISPO, 2009), quando o IAA foi adicionado a

diluentes usuais do sêmen de diferentes espécies, houve incremento da motilidade espermática, da taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação por um período maior.

Ao contrário do DMA, o DMSO é utilizado com sucesso em diversas espécies de peixes, portanto considerado como melhor crioprotetor (MENEZES *et al.*, 2008) e de acordo com Chao e Liao (2001) é um crioprotetor universal. No presente trabalho, quando o DMSO foi avaliado como crioprotetor, não houve diferença significativa entre os diluentes glicose, ringer e sacarose. A taxa de motilidade espermática para o sêmen congelado em glicose + DMSO foi de  $23,4 \pm 6,3\%$ . Esse resultado foi superior ao obtido pela combinação de glicose e etilenoglicol (5,1 ± 4,9%), porém inferior à glicose 5% combinada ao DMSO ( $35,0 \pm 12,9\%$ ), registrados por Godinho, Amorim e Peixoto (2003), quando testaram a criopreservação do sêmen de tilápia-do-Nilo. Entretanto, vale salientar que a taxa de motilidade espermática determinada pelos autores em questão foi verificada subjetivamente, enquanto que no presente trabalho, os resultados provavelmente oferecem maior exatidão por terem sido determinados objetivamente.

Nesse estudo a baixa taxa de motilidade observada com o crioprotetor DMSO combinado ao diluente ringer ( $18,3 \pm 2,0\%$ ) também foi relatada para o sêmen de tambaqui por Leite (2011), utilizando criodiluyente a base de ringer.

O sêmen congelado em ACP-104 acrescido de DMSO apresentou taxa de motilidade superior aos demais criodiluyentes ( $33,3 \pm 6,6\%$ ;  $p < 0,05$ ). Este resultado foi superior aos  $20,3 \pm 1,7\%$  registrados por Leite *et al.* (2011) para o sêmen de tambaqui e aos  $21,13 \pm 2,6\%$  para o sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (PESSOA, 2009), congelados com o mesmo criodiluyente. No entanto, Vieira (2010) obteve taxa de motilidade acima de 45% para o sêmen de *Colossoma macropomum*, utilizando o mesmo criodiluyente.

Os resultados verificados neste trabalho mostraram que o ACP-104 possui grande potencialidade para utilização como diluyente na criopreservação de sêmen de tilápia-do-Nilo.

O ACP-104 também foi testado com sucesso para espécies de peixes como *Brycon orbignyanus* (RURANGWA *et al.*, 2001), *Leporinus obtusiden* (VIVEIROS *et al.*, 2008), *Piaractus brachypomum* (MELO, 2010a) e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS *et al.*, 2010).

Outra informação importante é a velocidade do espermatozoide que, associada à taxa de motilidade, pode ser utilizada como indicador da qualidade do sêmen. Segundo Vieira (2010), os parâmetros mais importantes de velocidade são a velocidade curvilinear (VCL) e a velocidade linear progressiva (VSL), enquanto que a velocidade média da trajetória (VAP) não traz respostas para o sêmen de peixes.

Esse trabalho mostra resultados pioneiros sobre as velocidades do espermatozoide de tilápia, característica importante por estar diretamente relacionada à capacidade de fertilização do espermatozoide. VCL, VSL e VAP, para o sêmen pós-descongelamento apresentaram resultados inferiores somente para sacarose + DMA quando comparado aos tratamentos que tiveram como diluentes o ACP-104. Foi verificado também que VSL e VAP foram superiores com glicose + DMSO comparadas a sacarose + DMA ( $p < 0,05$ ). Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente (Tabela 14).

Tabela 14 – Parâmetros de velocidade do espermatozoide de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, pós-descongelamento.

Velocidade ( $\mu\text{m/s}$ )	DMSO				DMA			
	Glicose	ACP-104	Ringer	Sacarose	Glicose	ACP-104	Ringer	Sacarose
VCL	28,2 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	31,8 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>	27,3 $\pm$ 2,4 <sup>ab</sup>	29,0 $\pm$ 1,8 <sup>ab</sup>	30,2 $\pm$ 4,6 <sup>ab</sup>	31,7 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	30,4 $\pm$ 9,9 <sup>ab</sup>	24,6 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>
VSL	20,1 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	19,3 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	17,9 $\pm$ 4,4 <sup>ab</sup>	16,3 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>	14,6 $\pm$ 4,3 <sup>ab</sup>	20,0 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	16,4 $\pm$ 7,4 <sup>ab</sup>	12,0 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>
VAP	23,7 $\pm$ 8,6 <sup>a</sup>	23,5 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	19,8 $\pm$ 4,3 <sup>ab</sup>	20,3 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	18,4 $\pm$ 4,3 <sup>ab</sup>	25,2 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	20,5 $\pm$ 7,5 <sup>ab</sup>	15,6 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre si significativamente ( $p < 0,05$ ).

As médias de VCL e VSL, principalmente para o sêmen congelado em meio contendo ACP-104 e glicose, foram semelhantes aos encontrados por Leite (2011) para o sêmen de *Colossoma macropomum* e inferiores aos verificados a por Nascimento *et al.* (2010) para *Piaractus brachypomus*.

Viveiros *et al.* (2011) afirmam que existe alta correlação entre a taxa de fertilização e a velocidade, principalmente VCL. Vale salientar que características de velocidade do espermatozoide podem variar entre espécies e diante do pioneirismo desse trabalho, não existe dado de comparação para a tilápia-do-Nilo.

## 5.4 CONCLUSÕES

A utilização do criodiluinte à base de ACP-104 forneceu melhores resultados de motilidade espermática, mostrando que a água de coco em pó é uma tecnologia promissora na criopreservação de gametas masculinos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Os parâmetros de velocidade do espermatozoide de tilápia-do-Nilo pós-descongelamento, registrados pela primeira vez nesse estudo, somados a taxa de motilidade espermática, podem ser utilizados como indicador da eficácia do criodiluinte e da qualidade dos gametas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tilápia-do-Nilo, embora seja uma espécie exótica, atualmente é o peixe mais cultivado no Brasil, com destaque principalmente para a Região Nordeste e, em especial, para o Estado do Ceará que é o maior produtor da espécie no País. Esse crescimento teve como consequência uma maior organização da cadeia produtiva para obtenção de melhor resposta econômica. No entanto, por se tratar de uma espécie exótica, e diante das dificuldades de introdução de novas linhagens e novos planteis, os riscos de perda na qualidade genética são reais. Esses riscos são reduzidos com a implantação de programas de melhoramento genético e formação de bancos de sêmen criopreservados.

A criopreservação de sêmen de peixes exige pesquisas antecipadas sobre as características do líquido seminal para desenvolvimento de diluentes e criodiluentes adequados para a espécie de interesse.

Essa tese forneceu informações inéditas sobre o sêmen de tilápia-do-Nilo que podem subsidiar o desenvolvimento de bancos de sêmen para programas de melhoramento genético. Nas pesquisas realizadas ao longo desse trabalho, foram reveladas as características seminais da tilápia fornecendo parâmetros como osmolaridade do líquido seminal, que tem fundamental importância para elaboração e ajuste do criodilute adequado; tempo de motilidade espermática, que em tilápia-do-Nilo revelou-se superior ao das demais espécies de água doce estudadas; e morfometria da cabeça do espermatozoide, informação que poderá ser utilizada como indicador da eficácia do bom dilute e criodilute para a espécie. Também com ineditismo, o ACP-104 foi utilizado como dilute na refrigeração e congelação do sêmen de tilápia-do-Nilo e se revelou um dilute promissor para a conservação de espermatozoides da espécie com potencial para subsidiar a implantação de um programa de melhoramento genético na região Nordeste do Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H. *et al.* Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, v. 68, p. 276-283, 2007.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v. 29, p. 101-110, 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. II. effects of ions and osmotic pressure: a review. **Cell Biology International**, v. 30, n. 4, p. 1-14, 2006.
- AMANN, R.; KATZ D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.
- ANDRADE, A. F. C. *et al.* Eficiência *in vitro* de três diluidores para sêmen de coelho. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, suplemento, p. 33-39, 2008.
- ARAGÃO, W. M. A importância do coqueiro-anão verde. 2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2461636373/>>. Acesso em: 20 jun. 2012.
- ARAGÃO, W. M. **Coco pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2002. 76p. (Frutas do Brasil, n. 29).
- BABIÁK, I. *et al.* Effects of extender, storage and sperm-to-egg ratio on cryopreservation success of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, p. 941-947, 2012.
- BAG, S. *et al.* Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 175-183, 2002.
- BARROS, T. B. **Qualidade espermática do sêmen suíno conservado a baixas temperaturas em diluentes alternativos**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2010.
- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.
- BENASSI, A. C. Caracterização biométrica de frutos de coqueiro, *Cocos nucifera* L. variedade anã-verde, em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 302-307, 2007.
- BENCIC, D. C. *et al.* Short-term storage of salmonid sperm in air versus oxygen. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 19-25, 2000.

BERNIER, N. J.; RANDALL, D. J. Carbon dioxide anaesthesia in rainbow trout: effects of hypercapnic level and stress on induction and recovery from anaesthetic treatment. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 621–637, 1998.

BEZERRA, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelamento. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 20-25, 2010.

BILLARD, R. J. *et al.* Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v. 112, p. 129-195, 1995.

BILLARD, R. J.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 12-131, 1992.

BILLARD, R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm: a review. **Aquaculture**, v. 236, p. 1-9, 2004.

BISPO, C. A. S. **Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em diferentes concentrações de gema de ovo no diluente**. 2009. 110f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

BOZKURT, Y. *et al.* Relationship between seminal plasma composition and spermatological parameters in scaly carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 12, p. 2745-2749, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, 2010**. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=300:boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010&catid=7&Itemid=303](http://www.mpa.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=300:boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010&catid=7&Itemid=303)>. Fevereiro de 2012. Acesso em: 16 abr. 2012.

BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

CARNEIRO, P. C. F. *et al.* Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

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

CAROLSFELD, J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal Fish Biology**, v. 63, p. 472-481, 2003.

CARVALHO, J. M. *et al.* Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 437-452, 2006.

CASTILLO, L. F. Situación del comercio de tilapia en el año 2000. **Panorama Acuicola**, v. 6, p. 24-27, 2001.

CHAO, N-H. *et al.* The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. **Journal of Fish Biology**, v.30, p.107-118, 1987.

CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v. 197, p. 161-189, 2001.

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

CHRISTENSEN, P.; STENVANG, J. P.; GODFREY, J. P. A. Flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 255-264, 2004.

CIERESZKO, A. *et al.* Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 128, p. 542-548, 1999.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Fertilization in landlocked sea lamprey: storage of gametes, optimal sperm: egg ratio and methods of assessing fertilization success. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 495-505, 2000.

COOKE, S. J. *et al.* Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p. 509-529, 2004.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, p. 69-85, 2004.

COTTER, P. A.; RODNICK, K. J. Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 158-165, 2006.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. 59f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2001.

CRUZ-CASALLAS, P. E. *et al.* Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 682-686, 2005.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 5, p. 1504-1512, 2006.

DALY, J. *et al.* Cryopreservation of sperm from Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. **Aquaculture**, 285, p. 117-122, 2008.

DEGRAAF, J. D.; BERLINSKY, D. L. Cryogenic and refrigerated storage of rainbow smelt *Osmerus mordax* spermatozoa. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, p. 209-216, 2004.

DELBON, M. C. **Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus***. 2006. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2006.

- DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. Principles of cryopreservation. 2000. *In: NEVES, P. R. Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)*. 2008. 87f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008.
- DERIGGI, G. F. *et al.* Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, p. 269-274, 2006.
- DING, S. *et al.* Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 229-235, 2009.
- DOWNING-MEISNER, A.; KLAUS, A. V.; O'LEARY, M. A. Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). **Journal of Morphology**, v. 263, p.179–202, 2005.
- EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v. 179, p. 149-168, 1999.
- EL-SAYED, A. F. M.; MANSOUR, C. R.; EZZAT, A. A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v. 248, p. 187-196, 2005.
- EMRI, M. *et al.* Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. **Aquaculture**, v. 167, p. 85-94, 1998.
- FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, p. 71-75, 2005.
- FAO AQUACULT- PC. Fishery information, data and statistics (FIDI), time series of production from aquaculture and capture fisheries (quantities) 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>>. Acesso em: 15 jan. 2012.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2012.
- FARIA, P. M. C. *et al.* A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no Mundo - 2008. **PUBVET**, v. 3, p. 19, 2009.
- FARIAS, J. O. *et al.* Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.
- FELIZARDO, V. O. *et al.* Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 259-263, 2010.
- FERREIRA, A. A. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

- FRANCISCATTO, R.T. *et al.* Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.
- GELAL, A. Influence of menthol on first pass elimination. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, n. 2, p. 119-124, 2008.
- GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, 2000.
- GODINHO, H. P.; AMORIM, M. C.; PEIXOTO, T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.
- GOMES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do ariacó *Lutjanus synagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 34, p. 293-305. 2010.
- GONÇALVES, A. F. N. *et al.* Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, p. 339-344, 2008.
- GRAVANCE, C. G. *et al.* Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 41-46, 1996.
- GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 1453-1464, 2000.
- GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, p. 46-53, 2004.
- GUÉNETTE, S. A. *et al.* Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, p. 262-265, 2007.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippicott Williams and Wickins, 2000. 509 p.
- HAJEK, G. J.; KLYSZEJKO, B.; DZIAMAN, R. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 36, n. 2, p. 93-97, 2006.
- HANSEN, C. *et al.* Validation of the FACS Count AF system for determination of sperm concentration in boar semen. **Reproduction Domestic Animals**, v. 37, p. 330-334, 2002.
- HIKASA, Y. *et al.* Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **Journal Veterinary of Science**, v. 48, p. 341-351, 1986.
- HISANO, H. *et al.* Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 303-307, 2008.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HORVÁTH, A.; MISKOLCZI, E.; URBÁNYI, B. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**, v. 16, p. 457-460, 2003.

HORVÁTH, A.; URBÁNYI, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. **Aquaculture Research**, v. 23, p. 317-324, 2000.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca – Brasil: grandes Regiões e unidades da Federação. 2007.** Disponível em < <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wpcontent/files/estati2005.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2012.

INOUE, L. A. K. A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, p. 943-947, 2003.

IRAWAN, H.; VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S. The effect of extenders, Cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 236-243, 2010.

IVERSEN, M. *et al.* The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 549-566, 2003.

JAMIESON, B. G. M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa.** Cambridge: Cambridge University Press. 1991. 317 p.

JANVIER, P. Catching the first fish. **Nature**, London, v. 402, n. 6758, p. 21-22, 1999.

KANG, K. H. *et al.* Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) sperm. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 13, p. 1195-1201, 2004.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas de sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim Instituto da Pesca**, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.

KEENE, J. L. *et al.* The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KHAW, H. L.; PONZONI, R. W.; DANTING, M. J. C. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. **Aquaculture**, v. 275, p. 64-69, 2008.

KILDEA, J.; ALLAN, G.; KEARNEY, R. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and Aqui-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bityanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.

KIME, D. E. *et al.* Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 425-433, 2001.

KOPEIKA, E. F.; WILLIOT, P.; GONCHAROV, B. F. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. **Boletín del Instituto Español de Oceanografía**, v. 16, p. 167-173, 2000.

KOVÁCS, G. Tecnologia da criopreservação do sêmen de peixes. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS/AGROBER. Fortaleza. 1990.

KWANTONG, S.; BART, A. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). **Aquaculture Research**, v. 40, p. 292-297, 2009.

KUBITZA, F. *et al.* Piscicultura no Brasil: estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da Aquicultura**, v. 22, p. 14-23, 2012.

LANES, C. F. C. **Caracterização, criopreservação e manipulação genética do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae)**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2008.

LAZARD, J., ROGNON, X. Genetic diversity of tilapia and aquaculture development in Côte D'Ivoire and Niger. **Israeli Journal of Aquaculture**, v. 49, p. 90-98, 1997.

LEITE, L. V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2011.

LEITE, L. V. *et al.* Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, n. 2, p. 23-29, 2011.

LEZCANO, M. **Evaluación de cuatro agentes crioprotectores en la criopreservación de espermatoforos, masa y suspensión espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931)**. 2001. 115f. Monografía (Graduação em Biología Marina) - Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, 2001.

LIMA, A. S. *et al.* Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco e suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 683-690, 2008.

LINHART, O. *et al.* Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, v. 51, p. 250-261, 2005.

LIPING, L. *et al.* Tilapia aquaculture in China: low market prices, other issues challenge as sector seeks sustainability. **Global Aquaculture Advocate**, v. 15, p. 20-21, 2012.

LORENZO, D. *et al.* Essential oils of *Mentha pulegion* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 1-6, 2002.

LOVSHIN, L. L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES. 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1997. p.137-164.

LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A. da; BIANCHI, R. A. C. Um sistema para contagem semi-automática de microorganismos. **Revista Pesquisa e Tecnologia FEI**, v. 26, p. 36-40, 2004.

LUZ, R. K. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, p. 39-42, 2001.

MACHADO, T. M.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. **Manejo reprodutivo da truta arco-íris**. 2007. Disponível em: <[http://www.pesca.sp.gov.br/textos\\_tecnicos.php](http://www.pesca.sp.gov.br/textos_tecnicos.php)>. Acesso em: 15 nov. 2012.

MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; BERGER, B. Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 232-244, 2004.

MARCO-JIMÉNEZ, F. *et al.* Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. **Theriogenology**, v. 65, p. 1302-1310, 2006.

MARCO-JIMÉNEZ, F. *et al.* Morphometric characterization of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, p. 382-385, 2008.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARIA, A. N. *et al.* Characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779-783, 2010.

MARIA, A. N. *et al.* Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.

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

MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARKIN, L. L.; MAYER, P. P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5, 1985.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 799-804, 2004.

MARTINEZ, J. G.; TARAZONA-MORALES, A. M.; PARDO-CARRASCO, S. C. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 19-26, 2012.

MARTINO, A.; POLLARD, J. A.; LEIBO, S. P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction Development**, v. 45, p. 503-512, 1996.

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

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, p. 251-272, 1977.

MAZZA, D. Produção de tilápia tem expansão de 50% no CE. **Diário do Nordeste**. Fortaleza, 12 março 2012. Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=1115698>> Acesso em: 12 outubro 2012.

MELO, M. A. P. **Água de coco em pó (ACP-104) adicionado de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozóides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento**. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2010a.

MELO, M. A. P. *et al.* Água de coco em pó (ACP-104®) na criopreservação de sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). In: SEMINÁRIO NORDESTINO de PECUÁRIA (Pecnordeste), 14., 2010, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: FAEC, 2010b.

MENEZES, J. T. B. *et al.* Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazônica**, v. 38, n. 2, p. 365-368, 2008.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual de São Paulo. Jaboticabal, 2004.

MONSERRAT, J. J. *et al.* The Sperm-Class Analyzer: a new automated system for human sperm morphometry and classification. **Contracept Fertil Sex**, 1995.

- MOREIRA A. A. *et al.* Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.
- MORISAWA, M. Acrossome reaction in spermatozoa of the hagfish *Eptatretus burger* (Agnatha). **Development Growth and Differentiation**, v. 41, p. 109-112, 1999.
- MORISAWA, M. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 107, p. 95-53, 1983.
- MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, v. 210, p. 1145-1147, 1980.
- MORITZ, C.; LABBE, C. Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. **Cryobiology**, v. 56, p. 181-188, 2008.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 246-248, 1999.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriado do sêmen a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2002.
- MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1810-1814, 2003.
- MYLONAS, C. C. *et al.* Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.
- NASCIMENTO, A. F. *et al.* Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). **Animal Reproduction**, v. 9, n. 2, p. 103-110, 2012.

NASCIMENTO, A. F. *et al.* Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 324-329, 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **Bioassay of dl-menthol for possible carcinogenicity**. Washington, 1979. Bethesda. 126p. (NCI. Technical Report Series, 98).

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 87f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 2008.

NG, W. K.; WANG, Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. **Aquaculture**, v. 314, p. 122-131, 2011.

NINHAUS-SILVEIRA, A. *et al.* Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, p. 135-139, 2002.

NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Measurement of concentration and viability of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) spermatozoa using Computer-aided Fluorescent Microscopy. **Aquaculture**, v. 292, p. 256-258, 2009.

OKAMOTO, M. H. *et al.* Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 866-870, 2008.

OLIVEIRA, A. V. *et al.* Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

OLIVEIRA, F. C. E. **Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada a crioprotetores – Estudo de toxicidade**. 2012. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2012.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 49-59, 2002.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer**. Brasília: Secretaria especial da Pesca e Aquicultura/FAO. 2008. 276 p.

PÁDUA, S. B. *et al.* Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 2, p. 143-148, 2010.

PAN, J. L. *et al.* Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. **Aquaculture**, v. 279, p. 173-176, 2008.

PARK, I. O. *et al.* Anesthetic effects of lidocaine-hydrochloride on water parameters in simulated transport experiment of juvenile winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture**, v. 294, p. 76-79, 2009.

- PARK, M. O. *et al.* Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.
- PARK, M. O. *et al.* Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, v. 287, p. 427-430, 2009.
- PATEL, T.; ISHIUJI, Y.; YOSIPOVITCH, G. Menthol: a refreshing look this ancient compound. **American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 873-878, 2007.
- PEÑARANDA, D. S. *et al.* Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 659-664, 2010.
- PEREIRA-DA-SILVA, E. M. *et al.* Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1851-1856, 2009.
- PÉREZ, L. *et al.* Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 6, p. 1488-1504, 2000.
- PESSOA, N. O. **Avaliação cinética do sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-104®) ou Ringer em três meios de ativação**. 2009. 58f. Dissertação – (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2009.
- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 224, p. 1-8, 2002.
- POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling productions techniques. In: SIMPÓSIO SUL AMERICANO DE AQUACULTURE, 1., 1998, Recife. **Anais...** Florianópolis: SIMBRAQ, 1998. p. 127.
- REZA, L. *et al.* Sperm cryopreservation of trans-andean shovelnose catfish *Sorubim cuspicaudus*. In: WORLD AQUACULTURE, 2011, Natal. **Anais...** Louisiana: World Aquaculture Society, 2004. p. 603.
- RIBAS, L. *et al.* Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v. 269, p. 250-258, 2007.
- RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 1-7, 2003.
- RILEY, K. L. *et al.* Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquaculture**, v. 238, p. 183-194, 2004.

- ROMANA-EGUIA, M. R. R. *et al.* Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. **Aquaculture**, v. 236, p. 131-150, 2004.
- ROSENGRAVE, P. *et al.* Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 152, p. 123-129, 2008.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. 236 p.
- ROUBACH, R. *et al.* Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1056-1061, 2005.
- ROUTRAY, P. *et al.* Cryopreservation of dead fish spermatozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful utilization in fish production. **Aquaculture**, v. 261, p. 1204-1211, 2006.
- ROUTRAY, P. *et al.* Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 413-427, 2007.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1994. 1056p.
- RURANGWA, E. *et al.* Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (CASA), viable staining standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v. 55, p. 751-769, 2001.
- RURANGWA, E. *et al.* The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 1-28, 2004.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low infertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALES, M. G. F. **Água de coco (*Cocos nucifera* L.) in natura e sob a forma de gel e estabilizada, como diluidor do sêmen caprino**. 1989. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1989.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 20-32, 2012.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 5, p. 175-182, 2002.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. *et al.* Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 255-268, 2012.

- SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 12, p. 1673-1680, 2011.
- SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do ariacó *Lutjanus sinagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 4, p. 293-305, 2010.
- SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S. Criopreservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Settanidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 389-399, 2009.
- SANSONE, G, *et al.* Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) spermatozoa after thawing. **Cryobiology**, v. 44, p. 229–239, 2002.
- SARVI, K. *et al.* Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). **Aquaculture**, v. 256, p. 564-569, 2006.
- SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen de piabanha, *Brycon insignis*. Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae)**. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF. Rio de Janeiro. 2004.
- SHIMODA, E. *et al.* Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista CERES**, v. 54, p. 430-433, 2007.
- SHIMODA, E. *et al.* Utilização do espermátócrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, suplemento, p. 19-24, 2007.
- SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 613-620, 2009.
- SLADKY, K. *et al.* Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anaesthetic in red pacu (*Piaractus brachipomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- SOUZA, R. A. R. *et al.* Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésico para juvenis de robalo peva. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 38, n. 3, p. 247-255, 2012.
- STREIT-JR, D. P. *et al.* Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongates Valenciennes, 1850*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008.
- SUQUET, M. *et al.* Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus muximus*). **Journal Fish Bioogy**, v. 42, p. 509-516, 1993.
- SUQUET, M. *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Resesarch**, v. 31, p. 231-243, 2000.

- SUQUET, M. *et al.* Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. **Aquatic Living Resources**, v. 7, p. 283-294, 1994.
- TAATI, M. *et al.* Correlation between chemical composition of seminal plasma and sperm motility characteristics of Prussian carp (*Carassius gibelio*). **AAFL Bioflux**, v. 3, n. 3, p. 233-237, 2010.
- TABARES, J.; TARAZONA, A.; OLIVEIRA, M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias**, v. 18, p. 149-160, 2005.
- TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, p. 146-158, 2008.
- TAITSON, P. F.; GODINHO, H. P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 238-239, 2003.
- TAN-FERMIN, J. D. *et al.* Seminal fluid plasma composition, sperm density, sperm motility, and milk dilution in the Asian catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther). **Aquaculture**, v. 171, p. 323-338, 1999.
- THIRUMALA, S. *et al.* Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 964-73, 2006.
- THURSTON, L. M. *et al.* Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 382-394, 2001.
- TIAN, Y. S. *et al.* Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. **Aquaculture**, v. 284, p. 268-271, 2008.
- TIBA, R. M. *et al.* Diluentes e proporções sêmen-diluyente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 99-110, 2009.
- TONIOLLI, R. Biotecnologia da reprodução na espécie suína. **Revista Ciência Animal**, v. 4, p. 35-43, 1994.
- TONIOLLI, R.; MEDEIROS, A. L. N.; FIGUEIREDO, E. L. Morfologia dos espermatozoides de suíno, diluídos no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do ácido 3-indol acético. **Ciência Animal**, v. 9, p. 61-65, 1999.
- TSAKMAKIDIS, I. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; KHALIFA, T. A. A. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, p. 151-154, 2010.

TSANTILAS, H. *et al.* Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. **Aquaculture**, v. 253, p. 64-70, 2006.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to avoid cryo injuries of mammalian ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VALE-FILHO, V. R. **Patologia do sêmen**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 1980. 54p.

VALENTIN, F. N. **Efeito da idade das matrizes de tilapia do Nilo *Oreochromis niloticus* no desenvolvimento embrionário e larval**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – UNESP, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2007.

VASCONCELOS, R. *et al.* Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados por eosinánigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 862-869, 2009.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S.; **Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaratus brachyomus* (Pisces, Characidae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2008.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIDAL, L. V. O. *et al.* Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 29, p. 357-362, 2007.

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

VIDAL, L. V. O. *et al.* Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) e criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

VIEIRA, M. J. A. F. *et al.* Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 232, p. 1263-1270, 2011.

VINATEA, L. A. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis: UFSC, 1997.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 293-300, 2009a.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v. 74, p. 551-556, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. **Cybium - International Journal of Ichthyology**, v. 32, p. 215, 2008.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009b.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 1-10, 2011.

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, v. 73, n. 3, p. 1-9, 2005.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 35, p.137-150, 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology**, v. 54, p. 1395-1408, 2000.

VUTHIPHANDCHAI, V.; CHOMPHUTHAWACH, S.; NIMRAT, S. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. **Theriogenology**, v.72, p. 129-138, 2009.

WAGNER, P. M. *et al.* Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, p. 187-196, 2004.

WALSH, C. T.; PEASE, B. C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii*. **Aquaculture Research**, v. 33, n. 8, p. 627-635, 2002.

WATSON, P. F.; HOLT, W. V. **Cryobanking the genetic resource: wildlife conservation for the future?** London: Taylor and Francis, 2001. 480 p.

WEBER, R. A. *et al.* The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 288, p. 147-150, 2009.

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

YANG, B. H. *et al.* Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v. 82, p. 781-785, 2003.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C v. 149, p. 224-232, 2009.

YANG, B. H. *et al.* Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, *Xiphophorus couchianus*: Male-to-male variation in post-thaw motility and production of F1 hybrid offspring. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 233-239, 2009.

YASUI, G. S. **Variação temporal da motilidade espermática da tilápia do Nilo em amostras refrigeradas e ativadas.** 2007. 63f. Dissertação (Mestrado Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Rio de Janeiro, 2007.

ZAHL, I. H. *et al.* 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.