

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – CECEN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA – DQB
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA**

**CARACTERIZAÇÃO E RESFRIAMENTO DO SÊMEN DO MATRINCHÃ *Brycon
amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)**

ANDERSON DA SILVEIRA PEREIRA

SÃO LUÍS – MA
2015

ANDERSON DA SILVEIRA PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO E RESFRIAMENTO DO SÊMEN DO MATRINCHÃ *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros.

Orientador: Thales Passos de Andrade
Co-orientadora: Erivânia Gomes Teixeira

SÃO LUÍS – MA
2015

ANDERSON DA SILVEIRA PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO E RESFRIAMENTO DO SÊMEN DO MATRINCHÃ *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros.

São Luís, 17 de dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Thales Passos de Andrade
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA
São Luís – MA

Banca: Prof. Dr. Carlos Riedel Porto Carreiro
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA
São Luís – MA

Banca: Prof.^a Dr.^a Esperança Maria de Jesus Barbosa
Instituto Federal do Maranhão – IFMA Maracaná
São Luís – MA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que é a base de todo o meu ser e represento-a aqui na figura de meus pais, meus sogros, minha esposa e meus filhos.

Meus pais, Claudio e Helena, pela orientação de vida, pelos valores ensinados e pelo apoio e incentivo que sempre me deram e ainda me dão sempre que preciso.

Meus sogros, Rodrigues e Lourdes, pelo prazer, que me foi concedido, de dividir o seu convívio e, principalmente, pelo apoio que me deram com meus filhos nos momentos que, em função deste trabalho, não pude me fazer presente.

Minha esposa, Lícia, que, por vezes e em virtude da minha dedicação a este trabalho, desempenhou, de maneira magnífica, os papéis de pai e mãe em nosso núcleo familiar, arcando com o pesado fardo de lidar, 24 horas por dia, com duas crianças, graças a Deus, altamente “energéticas”. E, não menos importante, por ela sempre apoiar meus projetos de vida.

Em fim, dedico este trabalho também aos meus dois filhos, Gabriel e Victor, que representam para mim o amor incondicional e, mesmo sem saber, influenciam meus projetos de vida.

AGRADECIMENTOS

Juntos somos mais, juntos somos fortes e sozinhos não vamos muito longe. Portanto, é em função dessa ideia, que aproveito o espaço para destacar o quão importante e necessária foi a participação e o apoio dos abaixo-mencionados:

Todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP) e em especial:

- Professor Thales Andrade pelo incentivo moral, apoio logístico e ensinamentos, bem como pela credibilidade em mim depositada;
- Professora Erivânia Teixeira pela paciência, empenho e incentivo, bem como pelas “puxadas de orelha” quando merecidas;
- Professora Raimunda Fortes pelo apoio logístico e financeiro (via REBAX);
- Professora Zafira Almeida pela confiança, carinho, ensinamentos e apoio moral.

As colegas Sarah Raquel e Jeisa, as quais me auxiliaram na coleta do sêmen de peixes.

E, principalmente, agradeço à Deus por sempre estar presente em todos os momentos de minha vida, abrindo importantes portas e janelas para clarear o caminho pelo qual devo percorrer.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

RESUMO

Caracterização e resfriamento do sêmen do Matrinchã *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

Com a finalidade de contribuir para a conservação de peixes dulcícolas e marinhos, bem como facilitar seu manejo e evitar desperdícios, técnicas de conservação seminal estão sendo desenvolvidas e aprimoradas constantemente. E, neste intuito, o presente estudo objetivou desenvolver um protocolo de refrigeração para o sêmen do Matrinchã, *Brycon amazonicus*, através de sua caracterização e testes de diluidores para a refrigeração. Foram utilizados 20 reprodutores, procedentes de uma fazenda de piscicultura da Baixada Maranhense. Para sua caracterização, os parâmetros analisados foram: volume, concentração, pH, tempo de motilidade e taxa de motilidade. Nos testes de refrigeração, os diluentes utilizados foram o Ringer modificado para peixes, a Glicose, a Sacarose e a solução salina de NaCl 1,2%. Os tratamentos foram acondicionados em caixas térmicas de isopor sob temperatura controlada a 4°C e observados nas seguintes horas após a diluição: 0h, 6h, 18h, 30h, 40h, 52h, 70h e 96h. Quanto aos resultados dos parâmetros analisados, os valores médios obtidos foram: volume (426,6 µL), concentração ($5,7 \times 10^6$ spz mL⁻¹), pH (7,5), tempo de motilidade (56,6 s) e taxa de motilidade (98%). Para o sêmen *in natura*, o tempo de motilidade considerado bom manteve-se até 96 horas após a diluição, porém sua taxa de motilidade, considerada viável pela literatura, limitava seu rendimento a apenas 52 horas após a diluição. Enquanto que dentre os tratamentos diluídos, o Ringer foi o que apresentou melhor viabilidade, porém inferior ao tratamento com sêmen puro. Portanto, conclui-se deste estudo que o conhecimento das características do sêmen do Matrinchã é fundamental para a definição de um bom diluidor e que quanto à refrigeração do sêmen a curto tempo de duração, a melhor técnica é fazê-la *in natura*, sem a necessidade de diluição.

Palavras-chave: *Brycon amazonicus*. Caracterização seminal. Refrigeração.

ABSTRACT

Characterization and cooling of the sperm Matrinchã *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

In order to contribute to the conservation of freshwater and marine fish, well as facilitate their handling and avoid waste, seminal conservation techniques are being developed and improved constantly. And in this view, the present study aimed to develop a cooling protocol for semen Matrinchã, *Brycon amazonicus*, through its characterization and testing extenders for cooling. Were used 20 reproducers, coming from a farm Fish of the Baixada Maranhense. For characterization, the parameters analyzed were: volume, concentration, pH, motility time and motility rate. In cooling tests, the extenders used were Ringer modified for fish, glucose, sucrose and the saline NaCl 1.2%. The treatments were placed in thermal styrofoam boxes under controlled temperature at 4°C and observed in the hours following after dilution: 0h, 6h, 18h, 30h, 40h, 52h, 70h and 96h. As for the results of the analyzed parameters, the values obtained were: volume (426.6 µL), concentration (5.7×10^6 spz mL⁻¹), pH (7.5), motility time (56.6 s) and motility rate (98%). For semen in natura, the time motility considered good remained until 96 hours after dilution, but their motility rate, considered viable for literature, was limited their yield at only 52 hours after dilution. While from the diluted treatments, Ringer showed the best viability, but less than the treatment with pure semen. Therefore, it is concluded in this study that knowledge of Matrinchã semen characteristics is essential to the definition of a good extender and as regards the cooling semen short duration, the best technique is to make it in nature, without the further dilution.

Key-words: *Brycon amazonicus*. Seminal characterization. Refrigeration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Exemplar do <i>Brycon amazonicus</i> .	14
Figura 2 –	Tubos de microcentrífuga (a). Caixa tipo <i>criobox</i> com os tubos (b).	20
Figura 3 –	Amostras de sêmen em tubos de microcentrífuga dispostos em caixa de isopor provida de termômetro para controle da temperatura.	21
Figura 4 –	Gabarito de uma Câmara de Neubauer (a). Esquema de contagem de espermatozoides nos cantos e no centro da Câmara de Neubauer (b).	22
Figura 5 –	Tempo de motilidade do sêmen do Matrinchã, <i>Brycon amazonicus</i> diluído em diferentes soluções e armazenado a 4 °C por até 96 horas.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estatística descritiva das características físico-químicas seminais (n=20) do Matrinchã, <i>Brycon amazonicus</i> .	25
Tabela 2 –	Tempo de motilidade (s) (média ± erro padrão) do sêmen de Matrinchã, <i>Brycon amazonicus</i> diluído em diferentes soluções e armazenado a 4 °C por até 96 horas.	27
Tabela 3 –	Taxa de motilidade (% média ± erro padrão) do sêmen de Matrinchã, <i>Brycon amazonicus</i> diluído em diferentes soluções e armazenado a 4 °C por até 96 horas	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 A espécie	14
3.2 Caracterização seminal	15
3.3 Conservação	16
3.4 Diluentes	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Procedência dos espécimes e a coleta do sêmen	20
4.2 Caracterização do sêmen	21
4.3 Diluentes	22
4.4 Elaboração dos <i>pools</i>	23
4.5 Refrigeração	23
4.6 Análise estatística	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Caracterização do sêmen de Matrinchã	25
5.2 Conservação seminal sob refrigeração	25
6 DISCUSSÃO	29
6.1 Método de coleta e armazenamento	29
6.2 Caracterização do sêmen de Matrinchã	30
6.3 Conservação seminal sob refrigeração	32
7 CONCLUSÕES	35

REFERÊNCIAS	36
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Em meio a diversos acontecimentos drásticos da atualidade que são diariamente divulgados e debatidos e que degradam o meio ambiente, existe um tema de grande importância para a preservação da diversidade biológica, tal tema, conservação de material genético através do resfriamento ou congelamento de sêmen, refere-se a mais uma das possibilidades de reparação dos danos ecológicos que a humanidade tem causado ao planeta e, por isso, merece especial atenção do meio acadêmico, dos empresários do setor e da sociedade em geral.

Quando relacionada à piscicultura, esta técnica de conservação de gametas, apresenta-se ainda imatura, visto que é relativamente nova no mundo (meados do século XX) (RESENDE; MARQUES, 2009; TEIXEIRA, 2013) e mais nova ainda no Brasil (início do século XXI) com a conservação de sêmen de peixes de água doce (MARIA; CARNEIRO, 2012).

Na década de 90, a tradicional técnica de inseminação artificial já era caracterizada como ineficiente, necessitando, portanto, de inovações, pois segundo Billard (1990a) tal técnica, que consiste em juntar ovos e espermatozoides em um meio externo, apresenta eficiência limitada particularmente no que se refere à economia de gametas, pois o esperma de um único macho pode fertilizar de uma a cinco fêmeas.

Portanto, o desenvolvimento de novos e mais eficientes estudos e técnicas neste ramo são sempre bem-vindos e têm apresentado bons resultados tanto para a lucratividade dos empresários que investem na aquicultura como para a biodiversidade mundial, bem como para a satisfação das necessidades da crescente demanda mundial por alimentos de origem aquática, os quais, sabe-se hoje, são limitados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Desenvolver um protocolo de refrigeração para o sêmen do Matrinchã.

2.2 Específicos:

- Caracterizar o sêmen do Matrinchã *in natura*;
- Testar o Ringer modificado para peixes, a Glicose, a Sacarose e o NaCl como diluidores na refrigeração do sêmen do Matrinchã.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A espécie

A espécie em estudo pertence ao gênero *Brycon*, grupo constituído por 43 espécies com uma ampla distribuição na América do Sul e na América Central (HOWES, 1982; SATO et al., 1988).

Dentro das categorias de classificação dos seres vivos, o *Brycon amazonicus* (Figura 1) pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Brycon* (GOMES; URBINATI, 2005). Conhecida popularmente como Matrinchá (ou matrinxã, como também pode ser escrito) é uma espécie nativa da Bacia Hidrográfica Amazônica, de grande interesse comercial e que apresenta crescimento relativamente rápido frente ao fornecimento de rações artificiais e completas, com índices desejáveis de conversão alimentar (HONCZARYK; INOUE, 2009).

Figura 1 – Exemplar do *Brycon amazonicus*.



Foto: Anderson da Silveira Pereira (2015).

Em condições de cativeiro, pode atingir o peso comercial (1,5 kg) da sua região de origem em aproximadamente 12 meses (IZEL; MELO, 2004), entretanto, segundo Lopera-Barrero et al. (2011), podem alcançar de 700 g a 1,0 kg em seu primeiro ano e até 1,6 kg no segundo.

Em termos de aceitação dos consumidores, Gomiero et al. (2003) observaram que ainda existem restrições devido à presença de uma considerável quantidade de ossículos forquilhados (espinhas) ao longo de toda sua musculatura.

Conforme Brandão et al. (2005) e Ibama (2007), o *Brycon amazonicus* é a segunda espécie mais criada na região amazônica por apresentar rápido crescimento em cativeiro e alcançar bons preços de mercado. Situação semelhante foi observada em visitas à região da Baixada Maranhense, tendo em vista a quantidade produzida em estações de piscicultura e vendida nas feiras da região.

Quanto ao seu hábito alimentar, Val e Honczaryk (1995) comprovaram, através da análise dos resíduos do trato intestinal – frutos e insetos, que é onívoro com tendência a herbívoro, já Lopera-Barrero et al. (2011) afirmaram apresentar hábito alimentar herbívoro/frutívoro na natureza, com a capacidade de se tornar onívoro no cativeiro, onde aceita bem alimentos artificiais peletizados e extrusados.

Quanto à maturação sexual, Lopera-Barrero et al. (2011) afirmaram ocorrer, na natureza, com aproximadamente 3 anos de idade, o que se observa também em condições de cativeiro.

E como se trata de uma espécie migratória, Gomes e Urbinati (2005) recordam que para a ovogênese e a desova se completarem em cativeiro faz-se necessário o estímulo artificial por aplicação de hormônios, caso contrário, a reprodução não ocorre.

3.2 Caracterização seminal

A qualidade do sêmen está intrinsecamente envolvida com o processo de sua coleta, pois no momento da extrusão, o sêmen pode entrar em contato com urina ou fezes (SAAD; BILLARD, 1995; LEGENDRE et al., 1996), sangue e/ou água, identificados pelas variações de coloração (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1990).

O sêmen preservado, composto de plasma seminal e espermatozoides imóveis, passa por etapas de diluições com soluções ativadoras para ser avaliado. A taxa de motilidade espermática, a duração da motilidade, a concentração espermática, a composição do plasma seminal e a capacidade de fertilização são algumas das principais variáveis biológicas utilizadas por diferentes autores na avaliação da qualidade do sêmen (RANA, 1995).

Quanto a concentração espermática, Fogli da Silveira et al. (1987) citam ser ela uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa e rotina para a avaliação do sêmen de animais de fecundação interna e externa, para maximizar o aproveitamento do material fecundante e para ter melhores resultados na fertilização.

Com o fim de desenvolver protocolos de conservação seminal, estudos minuciosos sobre as propriedades e/ou qualidades do sêmen são necessários, pois os espermatozoides dependem principalmente do meio extracelular como fonte energética (VASCONCELOS et al., 2009).

Visto isso, uma descrição das características físico-químicas apresentadas pelo líquido seminal, bem como das características morfológicas e funcionais dos espermatozoides, é um pré-requisito necessário para a elaboração de diluentes e crioprotetores que mantenham as mesmas características em baixas temperaturas (SUQUET et al., 1993).

3.3 Conservação

Nas últimas décadas, as populações naturais de peixes têm diminuído devido à degradação ambiental e pesca excessiva, práticas que promovem a descaracterização e o desaparecimento do habitat natural e dos organismos que nele vivem. Isso tem suscitado um grande interesse na criação de bancos de genes para organismos aquáticos selvagens. Visando suprir esse desequilíbrio ecológico e aumentar os benefícios econômicos, a piscicultura tem gerado inúmeros trabalhos no âmbito de técnicas de cultivo, controle de doenças, avaliação dos gametas produzidos em cativeiro e técnicas para congelamento seminal e de embriões (PESSOA et al., 2012).

A estratégia ideal para a conservação de espécies ameaçadas é pela proteção e restauração de seus habitats nativos. Infelizmente, isso requer muito dinheiro e tempo, além de ser um processo lento. No entanto, uma alternativa é estabelecer bancos de genes *ex situ* resfriados ou criopreservados, o que garantiria a manutenção das populações de peixe geneticamente puras, enquanto as condições de habitat para o repovoamento é realizado. Além disso, o rápido crescimento da indústria da aquicultura tem promovido a necessidade de produção

rápida e a entrega de espécimes, o que poderia ser feito de maneira mais eficiente com o uso destas técnicas (DONALDSON, 1997).

A preservação de material genético, seja ele congelado ou simplesmente resfriado, é uma técnica de grandes interesses ecológicos e econômicos, uma vez que, ao conservar certa variabilidade genética de diversas espécies, pode favorecer tanto a conservação da biodiversidade como os programas já existentes de melhoramento genético, trazendo, dentre outros benefícios, uma maior lucratividade para os empresários produtores.

Em termos de criopresevação de peixes, há relatos de que os primeiros experimentos foram realizados na década de 1950, quando Barret em 1951 (TEIXEIRA, 2013) verificou a viabilidade de células germinativas de salmonídeo depois da estocagem e Blaxter em 1953 (RESENDE; MARQUES, 2009) congelou o sêmen de peixes para realizar o cruzamento de duas “populações” de arenques que se reproduziam em períodos diferentes do ano.

No Brasil, mais de 17 espécies de peixes já têm seu protocolo de criopresevação de sêmen determinado (CAROLSFELD et al., 2003; MARIA et al., 2009; VIVEIROS; GODINHO, 2009; VIVEIROS, 2011; ARAÚJO, 2011), no entanto, conforme afirmam Maria e Carneiro (2012), os estudos sobre a criopresevação de sêmen de peixes de água doce só tiveram início na década de 1980, e a maior parte destas pesquisas ocorreram apenas nos últimos treze anos.

Conforme Resende e Marques (2009) e Teixeira (2013), esta técnica denominada criopresevação de sêmen consiste na preservação de gametas masculinos em nitrogênio líquido, à temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, por tempo indeterminado e sem prejuízos à sua estrutura e função, uma vez que os processos biológicos e químicos não ocorrem à temperatura tão baixa como esta. Entretanto, como a criopresevação existe apenas desde 1949, não há como saber efetivamente a duração, mas o sêmen bovino criopreservado no Reino Unido em 1952 foi, na década de 1990, descongelado e usado para produzir bezerros saudáveis (HARVEY, 1993), o que nos mostra, na prática, que por pelo menos 40 anos esse material se manteve inativo e viável.

No que se refere ao simples resfriamento com o objetivo de preservação, Simone Marques (2001) o define como sendo uma técnica que consiste na manutenção de sua viabilidade por período de horas ou dias em temperaturas de

refrigeração sem atingir o congelamento, e que, por isto, dispensa o uso de substâncias crioprotetoras.

Sobre as finalidades atuais destas técnicas, elencamos, além da conservação da variabilidade genética e uso desta em programas de melhoramento genético, a prevenção da assincronia reprodutiva entre fêmeas e machos (CAROLSFELD et al., 2003; RIBEIRO; GODINHO, 2003; SUQUET et al., 2000) e a manutenção do tamanho populacional sem os gastos com muitos reprodutores (CARNEIRO, 2007).

Ainda sobre as vantagens, Stoss (1983) e Cóser (1988) corroboram afirmando que a preservação a curto prazo do sêmen de peixes é indicada para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da reprodução artificial em estações de piscicultura, sendo útil, a variação de horas a semanas, quando ocorre assincronia na maturação, no transporte dos gametas ou no uso seletivo de reprodutores.

E, por ser tão importante quanto às demais vantagens já citadas, merece destaque também a possibilidade de estudo das características do sêmen segundo Ciereszko e Dabrowski (1994).

No entanto, conforme Resende e Marques (2009) lembram, os bancos de sêmen conservados devem ser implantados antes que uma dada espécie esteja realmente em extinção, pois muitas vezes, nessas condições, não haverá variabilidade genética suficiente para a recomposição.

3.4 Diluentes

A refrigeração estende a viabilidade temporal do sêmen não diluído por algumas horas. Esse efeito pode ser explicado pela redução da atividade metabólica dos espermatozoides a temperaturas abaixo da fisiológica. A combinação do sêmen com soluções diluentes imobilizadoras da motilidade, as quais mantêm uma composição iônica e a osmolaridade do plasma seminal, tem sido efetivo em potencializar a longevidade, sem promover mudanças significativas da qualidade do sêmen (PEÑARANDA et al., 2010).

A motilidade espermática, reprimida pela osmolaridade isotônica do plasma seminal, é iniciada pela diminuição ou aumento da osmolaridade do meio externo. Em teleósteos, tanto marinho quanto dulcícolas, os espermatozoides, que são imóveis no plasma seminal, têm a osmolaridade em torno de 300 a 350 mOsm/kg (MORISAWA; SUSUKI, 1980).

Portanto, a motilidade resulta da redução drástica da pressão osmótica ao entrar em contato com a água, mas também pela redução, por diluição, das altas concentrações de potássio no testículo (HARVEY, 1993).

O processo que leva à movimentação é denominado de ativação. Normalmente a ativação é irreversível e dura por um período de tempo muito curto. Após esse tempo, a energia do espermatozoide se esgota e ele se torna incapaz de qualquer fecundação, de forma que, nesse período ativado, o espermatozoide tem que entrar rapidamente em contato com o ovócito e para fins de conservação, logicamente, deve ser congelado e/ou refrigerado antes de ser ativado (RESENDE; MARQUES, 2009).

No intuito de garantir a natural inatividade dos espermatozoides no plasma seminal de peixes, procura-se manter a composição iônica, o pH e a pressão osmótica mesmo com a utilização de diluentes. Por esta razão, os diluentes têm sido desenvolvidos para manter estáveis as condições físico-químicas do plasma seminal, durante o período de estocagem, e possibilitar uma alta taxa de motilidade espermática (TAN-FERMIN et al., 1999).

Wayman et al. (1997), com o armazenamento de sêmen de *Pogonias cromis*, observaram que a motilidade espermática do sêmen não diluído foi significativamente mais baixa do que em amostras pré-diluídas em diferentes concentrações de água salgada artificial ou HBSS (solução salina balanceada de Hanks). Por outro lado, Harvey e Carolsfeld (1993) afirmaram que a melhor estratégia é armazená-lo a fresco sem diluição.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência dos espécimes e a coleta do sêmen:

Foram utilizados Matrinchãs (n=20) pertencentes ao plantel de reprodutores de uma piscicultura situada em Arari – MA. Os peixes, previamente selecionados, foram capturados individualmente, envoltos em uma toalha umedecida e dispostos sob um colchão de espuma para secagem da região urogenital com papel toalha. A coleta do sêmen foi efetuada por meio de leves pressões na região abdominal no sentido crânio-caudal.

Na sequência, foi realizada uma avaliação subjetiva da viabilidade espermática através da ativação e observação ao microscópio óptico (CM 505, Solaris Scientific, China) de uma determinada alíquota (2 μ L) do material coletado. Quando considerado viável (motilidade < 5%), o sêmen foi armazenado em tubos de microcentrifuga com volume até 2 mL com tampa rosqueável (IMEC), os quais foram dispostos em caixa tipo *criobox* (Figura 2) e os mesmos acondicionados em caixa térmica de isopor com gelo à temperatura entre 4 °C e 6 °C. A temperatura foi controlada com um termômetro digital (Incoterm, Hong Kong) dotado de um sensor (Figura 3). Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Pesca e Ecologia Aquática - LabPEA da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA.

Figura 2 – Tubos de microcentrifuga (a). Caixa tipo *criobox* com os tubos (b).

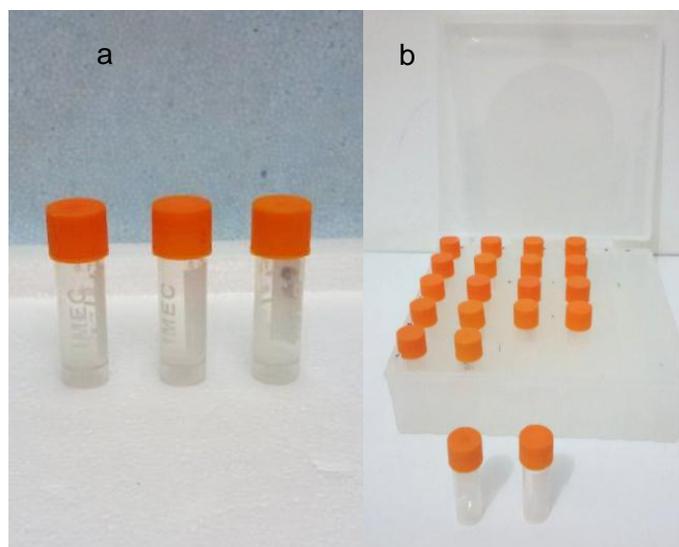


Foto: Anderson da Silveira Pereira (2015).

Figura 3 – Amostras de sêmen em tubos de microcentrífuga dispostos em caixa de isopor provida de termômetro para controle da temperatura.



Foto: Anderson da Silveira Pereira (2015).

4.2 Caracterização do sêmen:

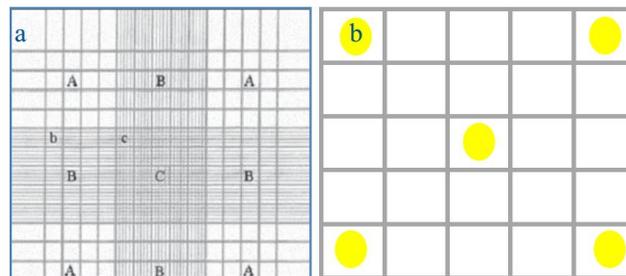
Uma alíquota (5 μL) do material coletado foi depositada em lâmina e levada para observação em microscópio óptico previamente ajustado na objetiva de 10x. A ativação dos espermatozoides foi realizada mediante adição de 10 μL de água destilada e cronometrado imediatamente após esta adição até a total parada de movimento dos mesmos.

Outras medidas importantes também foram verificadas, quais foram:

- a) Volume (μL): verificado com auxílio de micropipeta de volume variável, a qual foi usada na transferência para tubos de microcentrífuga;
- b) pH do sêmen: verificado com o uso de fita indicativa de pH (pH indicator strips – Merck KGaA, Germany);
- c) Concentração espermática (número de espermatozoides por mL de sêmen): Amostras de sêmen ($n = 20$) foram diluídas em 1 mL de solução formol salina 1% na proporção de 1:500 (sêmen:solução formol salina) uma alíquota de 10 μL foi transferida para a Câmara hematimétrica de Neubauer (0,100 mm de profundidade, Precicolor HBG, Alemanha) e focalizada ao microscópio na objetiva de 40x,

permanecendo em repouso por um período de até cinco minutos. Para a realização da contagem foram utilizadas as quadrículas com pontos destacados em amarelo (Figura 4 – b), os quais se encontram inseridos no campo C (Figura 4 – a). A contagem dos mesmos apresentou um mínimo de três repetições, refazendo-as quando a diferença entre elas era maior que 10%.

Figura 4 – Gabarito de uma Câmara de Neubauer (a). Esquema de contagem de espermatozoides nos cantos e no centro da Câmara de Neubauer (b).



Fonte: (a) VIEIRA (2000); (b) TEIXEIRA (2013).

Na intenção de se evitar a contagem de um mesmo espermatozoide mais de uma vez, convencionou-se que as células que se encontravam sobre as bordas da direita e inferior de cada quadrícula não fossem contadas.

O número de espermatozoides foi determinado segundo a fórmula seguinte (TIBA et al., 2009), e os resultados expressos em espermatozoides/mL.

$$CE = N \times F_c$$

Onde:

CE = Concentração de espermatozoides;

N = Número de células contadas na Câmara de Neubauer:

F_c = Fator de correção, que foi calculado como:

$$F_c = q \times fd / d$$

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).

4.3 Diluentes:

Foram testados quatro diluentes elaborados um dia antes da coleta, conforme segue:

a) Glicose (350 mOsm/kg): 6,3 g Glicose + 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,9 (TEIXEIRA, 2013).

b) Ringer modificado para peixes (300 mOsm/kg): NaCl 6,5 g/L; KCl 3,0 g/L; NaHCO₃ 0,2 g/L; CaCl₂ 0,3 g/L; pH 7,8 (PELETEIRO et al., 1996).

c) Sacarose (300 mOsm/kg): 10,26 g Sacarose + 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,5 (TEIXEIRA, 2013).

d) Solução salina de NaCl 1,2% (343 mOsm/kg): 1,2 g de Cloreto de Sódio (NaCl) para cada 100 mL da solução aquosa com água destilada e pH ajustado para 7,4.

A osmolaridade das soluções foi conferida por meio de osmômetro digital (Osmette A, Precision Systems).

4.4 Elaboração dos *pools*:

As amostras de sêmen coletadas e não ativadas foram utilizadas para a formação de seis *pools* compostos pela doação de volumes variados de sêmen *in natura* de 10 peixes, totalizando 530 µL de sêmen por *pool*. Após estes procedimentos, os *pools* foram mantidos em tubos de microcentrífuga em *criobox* e os mesmos dentro de caixa térmica de isopor com gelo em temperatura de aproximadamente 4 °C.

4.5 Refrigeração:

No LabPEA-UEMA, foram delineados cinco tratamentos com seis repetições: o primeiro tratamento (TI) com 330 µL de sêmen *in natura* em cada. Para os demais tratamentos e suas respectivas repetições, foi acrescentado os seguintes diluidores: Glicose (TII), Sacarose (TIII), Ringer (TIV) e Solução salina de NaCl 1,2% (TV). A proporção sêmen/diluyente foi de 1:8, constituído por 50 µL de sêmen para 400 µL do diluyente. Portanto, cada tubo contendo os tratamentos *in natura* apresentou um

volume total de 330 μ L, enquanto que o volume dos tubos com sêmen diluído foi de 450 μ L.

Os tubos de microcentrífuga contendo os tratamentos foram estocados em *criobox* e acondicionados em caixa térmica de isopor com gelo sob refrigeração a 4°C. A temperatura interna da caixa térmica foi monitorada por meio de um termômetro digital dotado de um sensor procedendo-se com a reposição do gelo para se evitar oscilação na temperatura.

As avaliações de porcentagem e tempo de motilidade de cada unidade experimental foram realizadas imediatamente após a diluição (0h), 6, 18, 30, 40, 52, 70 e 96 horas após a refrigeração a 4 °C. Para tanto, 5 μ L de cada tubo foi ativado (com 10 μ L de água destilada para os tratamentos TI e 20 μ L de água destilada para os demais) sob uma lâmina de microscopia e observado em um aumento de 100x nos intervalos de hora acima mencionados.

4.6 Análise estatística:

A análise dos dados obtidos foi realizada com auxílio do *software* gratuito BIOESTAT versão 5.3 (disponível em www.mamiraua.org.br) em nível de significância de 5%.

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 variação múltipla de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do sêmen de Matrinchã

Os resultados referentes às características físico-químicas do sêmen do Matrinchã encontram-se expressos na tabela 1.

O volume de sêmen coletado foi o parâmetro que apresentou a maior variação (36,5%) entre os espécimes, variando de 220 a 800 μL .

Tabela 1 – Estatística descritiva das características físico-químicas seminais (n=20) do Matrinchã, *Brycon amazonicus*.

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Volume (μL)	220,0	800,0	426,6	155,5	36,5
Concentração ($\times 10^6$ spz mL^{-1})	3,0	7,0	5,7	1,6	28,1
pH	6,5	8,0	7,5	0,6	8,0
Tempo de motilidade (s)	38,0	90,0	56,6	16,1	28,4
Taxa de motilidade (%)	90,0	100,0	98,0	4,2	4,2

Fonte: Anderson da Silveira Pereira (2015).

No que se refere à concentração, o valor médio registrado no presente estudo foi de $5,7 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} de sêmen, com uma variação de $3,0 \times 10^6$ spz mL^{-1} a $7,0 \times 10^6$ spz mL^{-1} .

O valor médio do parâmetro pH encontrado nesta pesquisa através da aferição por fita indicativa de pH foi de 7,5, variando de 6,5 a 8.

Apresentando a segunda maior variação (28,4%) dentre os parâmetros avaliados, está o tempo de motilidade apresentado no momento da coleta, o qual variou de 38 a 90 segundos.

No tocante à taxa de motilidade média, que é a porcentagem de espermatozoides móveis, determinada neste trabalho de forma subjetiva, encontrou-se o valor de 98% com pequena variação de 96 a 100%.

5.2 Conservação seminal sob refrigeração

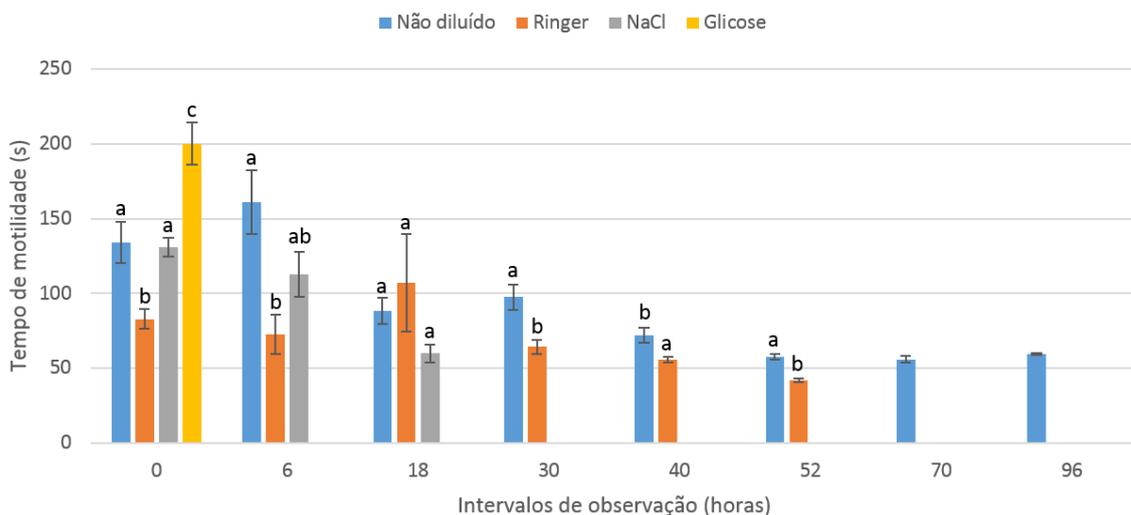
Nesse estudo, foram quatro as soluções diluidoras avaliadas (Glicose, Sacarose, Ringer e Solução salina NaCl 1,2%), porém, para efeitos de resultados, uma delas (Sacarose) não foi exposta em razão da baixa média na taxa de motilidade (10%) ainda na hora zero do experimento, ou seja, imediatamente após a diluição e, por tanto, logo foi desconsiderada.

A razão (1:8) de sêmen *in natura* para solução diluente, ou seja, 50 µL de sêmen para cada 400 µL de diluidor foi a proposta para a realização do presente trabalho.

Os resultados encontrados para tempo de motilidade estão dispostos em duas ilustrações (Figura 5; Tabela 2) expondo duas visualizações diferentes para os mesmos dados.

Quanto ao tempo de motilidade sob refrigeração, observa-se que o sêmen *in natura* foi o que apresentou resultado mais satisfatório, pois o mesmo conseguiu atingir até 96 horas (Figura 5; Tabela 2) após a diluição; momento em que foi descartado (apesar de ainda apresentar tempo médio de motilidade adequado: $59,6 \pm 0,7$ s).

Figura 5 – Tempo médio de motilidade do sêmen do Matrinchã, *Brycon amazonicus* diluído em diferentes soluções e armazenado a 4 °C por até 96 horas.



Colunas com letras diferentes em cada intervalo diferem entre si significativamente (p < 0,05).

Fonte: Anderson da Silveira Pereira (2015).

Entre as amostras de sêmen diluídas, nota-se claramente a superioridade do tratamento TIV (contendo Ringer) sob os efeitos da refrigeração, pois o mesmo

chegou a apresentar motilidade até a sexta observação, ou seja, 52 horas após a diluição (Figura 5; Tabela 2). Por outro lado, o tratamento TV (contendo NaCl) apresentou motilidade apenas até as 18 horas e o tratamento TII (contendo Glicose) somente no momento da diluição.

Tabela 2 – Tempo de motilidade (s) (média \pm erro padrão) do sêmen de Matrinchã, *Brycon amazonicus* diluído em diferentes soluções e armazenado a 4 °C por até 96 horas.

Intervalos de observação	Sêmen não diluído	Diluições		
		Ringer	NaCl	Glicose
0	134,4 \pm 13,9 ^a	83 \pm 6,43 ^b	131 \pm 6,21 ^a	200,0 \pm 49,9 ^c
6	161,4 \pm 21,3 ^a	72,8 \pm 13,1 ^b	112,8 \pm 15 ^{ab}	-
18	88,4 \pm 8,7 ^a	107,4 \pm 32,5 ^a	60,2 \pm 5,8 ^a	-
30	97,6 \pm 8,5 ^a	64,4 \pm 4,9 ^b	-	-
40	72,2 \pm 4,9 ^a	55,8 \pm 1,9 ^b	-	-
52	58,0 \pm 1,9 ^a	42,4 \pm 1,2 ^b	-	-
70	56,2 \pm 2,1	-	-	-
96	59,6 \pm 0,7	-	-	-

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

Fonte: Anderson da Silveira Pereira (2015).

Ainda em termos de desempenho na duração da motilidade (Figura 5; Tabela 2) pós-diluição, tem-se que o segundo tratamento (contendo Glicose) foi o que apresentou maior valor médio (200,0 segundos) na hora zero, porém não apresentou motilidade nas observações posteriores.

Conforme se observa na Figura 5 e na Tabela 2, os tratamentos TI e TIV (*in natura* e com Ringer, respectivamente) apresentam momentos em que aumenta o tempo de motilidade e depois volta a diminuir, fato este que ocorre 6 horas após a diluição para o sêmen *in natura* e na observação de hora 18 para o tratamento TIV.

Em relação às perdas de rendimento do tempo de motilidade (Tabela 2), nota-se, para o sêmen não diluído (TI), dois momentos marcantes, a saber: (a) na passagem da hora 6 para a hora 18 com uma diminuição do valor médio de aproximadamente 45%, (passando de 161,4 s para 88,4 s); (b) na passagem da hora 40 para a hora 52 com uma diminuição do valor médio de aproximadamente 19,6%, (passando de 72,2 s para 58,0 s). Quanto ao tratamento TIV (com Ringer), apenas uma diminuição foi observada, da ordem de 40% ao passar da hora de observação 18 (107,4 s) para a hora 30 (64,4s) e, por fim, também com apenas uma

diminuição, tem-se o tratamento TV (NaCl) na passagem da hora 6 para a hora 18 com 46,6% de perda (112,8 s para 60,2 s).

Entretanto, só a avaliação do tempo de motilidade não é suficiente para se determinar a viabilidade de uma conservação do sêmen de peixes, portanto, uma série de outros parâmetros merecem destaque e dentre eles a taxa de motilidade (%), que neste trabalho foi avaliada subjetivamente e seus resultados encontram-se expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Taxa de motilidade (% média \pm erro padrão) do sêmen de Matrinhã, *Brycon amazonicus* diluído em diferentes soluções e armazenado a 4 °C por até 96 horas.

Intervalos de observação	Sêmen não diluído	Diluições		
		Ringer	NaCl	Glicose
0	94,2 \pm 0,8 ^a	83,3 \pm 1,0 ^a	35,0 \pm 2,5 ^b	31,7 \pm 14,5 ^b
6	93,3 \pm 1,0 ^a	70,0 \pm 5,1 ^b	29,2 \pm 2,7 ^c	-
18	89,2 \pm 3,2 ^a	55,8 \pm 4,1 ^b	15,8 \pm 1,5 ^c	-
30	88,3 \pm 3,5 ^a	52,5 \pm 2,5 ^b	-	-
40	69,2 \pm 3,7 ^a	38,3 \pm 1,0 ^b	-	-
52	35,8 \pm 2,0 ^a	10,8 \pm 0,8 ^b	-	-
70	20,8 \pm 1,5	-	-	-
96	17,5 \pm 2,1	-	-	-

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

Fonte: Anderson da Silveira Pereira (2015).

Comparando-se os quatro tratamentos no momento da diluição, observa-se nitidamente a separação em dois grupos com diferenças significativas entre eles: um com média de taxa de motilidade alta, composto pelos tratamentos com sêmen não diluído (94,2 \pm 0,8) e com Ringer (83,3 \pm 1,0) e outro com média baixa, onde se encontram os tratamentos com NaCl (35,0 \pm 2,5) e com Glicose (31,7 \pm 14,5).

Durante todas as horas observadas desde a diluição, o sêmen não diluído foi o que apresentou as melhores taxas e com maior tempo de viabilidade.

No que se refere aos diluidores utilizados neste trabalho, o tratamento TIV (contendo Ringer) foi o que apresentou as melhores taxas e com maior tempo de viabilidade, porém, como já exposto acima, inferior ao tratamento não diluído.

6 DISCUSSÃO

6.1 Método de coleta e armazenamento

Durante a coleta de sêmen de peixes, a possibilidade de contaminação por urina, fezes, muco ou água é um risco bastante comum e, por isso, deve-se fazê-la com precaução, pois, conforme Maria e Carneiro (2012), estes contaminantes podem ativar a motilidade espermática tornando o material impróprio para utilização em processos de conservação (refrigeração ou congelamento).

Portanto, a coleta do sêmen de peixes pode ser realizada em recipientes como placas de Petri, tubos Falcon e seringas (YASUI, 2007), ou qualquer outra maneira que garanta a não-ativação deste sêmen.

Citando mais métodos tem-se: Godinho, Amorim e Peixoto (2003) e Mataveli et al. (2007) que utilizaram seringas de 1 mL para coletar sêmen de tilápia; 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). E mais recentemente, Teixeira (2013) inovou utilizando micropipeta para a coleta em tilápia-do-nilo.

Porém, apesar de os autores citados no parágrafo anterior terem mencionado que seus métodos foram mais eficazes reduzindo a possibilidade de contaminação, no presente trabalho, a coleta foi realizada apenas com o uso de placas de Petri, adotando-se as medidas de higienização da região urogenital com papel toalha e obtendo-se 100% de aproveitamento do material coletado, ou seja, todo o volume seminal obtido apresentou, quando observado ao microscópio óptico, motilidade nula ou menor que 5%.

Todavia, além do meio utilizado para a coleta do sêmen a técnica também é um fator importante para se garantir a eficácia deste processo; compondo esta técnica é imprescindível o “olhar treinado” do manipulador, pois em casos como o da espécie em estudo o sêmen apresenta-se inconsistente, com elevada transparência, chegando a confundir-se com a urina.

No momento da coleta, é comum proceder-se à ativação de uma determinada alíquota do sêmen para se verificar a viabilidade de uma conservação e para tanto se utiliza soluções ativadoras. Neste estudo, mediante avaliação subjetiva, a solução

adotada foi água destilada, a qual apresentou resultado satisfatório, sendo também utilizada, com avaliação subjetiva, por Miliorini (2006), Murgas et al. (2007) e Viveiros et al. (2009b) todos trabalhando com *Prochilodus lineatus* e por Ribeiro e Godinho (2003) ao trabalhar com *Leporinus macrocephalus* e Streit Jr et al. (2006) ao ativar o sêmen do *Prochilodus mesopotamicus*.

Para a conservação do sêmen, por refrigeração ou criopreservação, recomenda-se a utilização de amostras que apresentem motilidade acima de 90% (COSSON et al., 1999), atestada via microscópio óptico.

Em termos de armazenamento, Marques (2001), ao trabalhar com teleósteos neotropicais de água doce, concluiu que é possível manter o sêmen viável ao acondicioná-lo em caixas térmicas de isopor com gelo ou termogel congelado, em temperaturas entre 0 a 6 °C, com ou sem adição de ar ou oxigênio, por período variável segundo a espécie.

Portanto, observação semelhante se faz no presente trabalho, uma vez que se obteve eficácia com a utilização de caixa térmica de isopor e gelo para armazenamento e manutenção de temperatura.

6.2 Caracterização do sêmen de Matrinhã

Segundo Murgas et al. (2011), na busca por um padrão ótimo de fertilização artificial, é fundamental o conhecimento da grande variação entre as características seminais das diversas espécies de peixes.

Routray et al. (2007) afirmaram que a descrição do fluido espermático é realizada com base em propriedades físicas como volume, motilidade e concentração, além das características morfológicas. Estas informações são indicadoras da qualidade do sêmen no momento da fertilização (FELIZARDO et al., 2010).

Quanto ao parâmetro volume, podemos afirmar que se encontra dentro do padrão, visto que, Alavi et al. (2007), verificaram grande variação de volume entre espécimes de *Perca fluviatilis* e, para Godinho (2000), o volume de sêmen de peixes varia entre espécies e espécimes de acordo com idade, método e época de coleta.

O valor médio encontrado para a quantidade de espermatozoides por mL de sêmen ($5,7 \times 10^6$) foi considerado baixo ao ser comparado aos valores apresentados por Cruz-Casallas et al. (2006) $7,6 \pm 1,3 \times 10^9$ espermatozoides mL⁻¹ analisando

sêmen fresco de *B. amazonicus* e por outras espécies da mesma ordem (Characiformes): *Brycon orbignyanus* $7,1 \pm 5,6 \times 10^9$ espermatozoide mL⁻¹ e *Prochilodus lineatus* $18,6 \pm 2,2 \times 10^9$ espermatozoide mL⁻¹ (NASCIMENTO et al., 2012). A média de concentração espermática encontrada por Teixeira (2013) ao realizar a conservação do sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, foi de $2,4 \times 10^8$ spz mL⁻¹.

Apesar da baixa concentração aferida, esforços na conservação do sêmen da espécie em estudo pode não ser em vão, pois conforme Tiba et al. (2009) constataram, a concentração mínima necessária de espermatozoides em *Centropomus parallelus* para inseminar com sucesso lotes de ovócitos com sêmen crioconservado e fresco foi de $1,6 \times 10^5$ espermatozoides mL⁻¹.

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 resultado médio verificado para o parâmetro pH (7,5) encontra-se dentro da variação aceitável (6,5 a 8,5) proposta por Tabares et al. (2005) para o sêmen de peixes de águas continentais.

E por fim, temos a motilidade espermática que, segundo Alavi e Cosson (2006), 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.

Segundo Melo e Godinho (2006), normalmente os espermatozoides de teleósteos permanecem móveis por um curto período de tempo após a ativação, sendo inferior a um minuto.

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.

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.

Destaca-se ainda que não foram atestadas diferenças tão significativas quanto à média da taxa de motilidade (%) entre o momento da coleta e o pós-diluição: 98 no momento da coleta (Tabela 1) e $94,2 \pm 0,8$ no pós-diluição (Tabela 3). É importante salientar também que, quanto à técnica subjetiva de determinação da taxa de motilidade, apesar de imprecisa ainda se faz necessária perante sua importância na caracterização e, sobretudo, devido ao elevado valor para aquisição de um equipamento de determinação objetiva.

E confirmando tal posicionamento, tem-se que: apesar de Oliveira et al. (2007) terem afirmado que os métodos objetivos de avaliação da motilidade seminal são mais relevantes na pesquisa em reprodução, Melo-Maciel et al. (2012) atestaram que seu uso não é rotineiro devido aos altos custos de aquisição do equipamento.

6.3 Conservação seminal sob refrigeração

É importante observar que o valor médio (134,4 s) de tempo de motilidade expresso na Tabela 2 refere-se ao tempo zero para o sêmen *in natura* após as diluições, as quais ocorreram cerca de 3 horas e meia (tempo equivalente à distância Arari – São Luís) após a coleta, e, por ser um valor tão alto quando comparado ao exposto na Tabela 1 (56,6 s), acredita-se que, por estar sob efeito da refrigeração, o “frenesi” dos espermatozoides, mesmo após a ativação, tenha diminuído, apresentando menor consumo energético e, por tanto, permitindo um maior tempo de motilidade.

Os preceitos de Sanches e Cerqueira (2011) legitimam esta proposição, pois afirmam que a estocagem do sêmen puro em temperatura inferior à fisiológica reduz a atividade metabólica dos espermatozoides, estendendo, portanto, sua viabilidade temporal.

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). Em consonância com essa ideia está a metodologia do presente trabalho, pois, ao colocar o sêmen coletado dentro de tubos de microcentrífuga e os mesmos dentro de *criobox* e só então colocá-los no isopor com gelo, garantiu uma gradual refrigeração do sêmen evitando assim o choque térmico com a mudança brusca de sua temperatura.

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). E como diluentes com bons resultados para uma espécie podem ser inadequados para outras, testes com variados diluentes faz-se necessário para que se defina o mais satisfatório.

As proporções utilizadas no presente trabalho (1:8) estão entre as consideradas adequadas à metodologia, pois, conforme Peleteiro et al. (1996) e Suquet et al. (2000) elas podem variar de 1:1 a 1:20, porém, para a maioria das espécies, proporções de diluição de 1:3 a 1:6 são as mais comumente usadas (Mc ANDREW, 1993).

Já quanto ao descarte do sêmen *in natura* após 96 horas de observação, podemos afirmar que a mesma ocorreu por questões de viabilidade da conservação, visto sua baixa taxa média de motilidade expressa na Tabela 3 ($17,5 \pm 2,1$).

Quanto aos momentos em que se observa aumento e diminuição subsequentes do valor do tempo médio de motilidade apresentados pelos tratamentos TI (*in natura*) e TIV (Ringer), acredita-se que, assim como já foi comentado acima, a exposição destes tratamentos às baixas temperaturas da refrigeração reduz a atividade metabólica dos espermatozoides, diminuindo também o consumo energético e, portanto aumentando o tempo de motilidade, o qual, com o passar do tempo, naturalmente volta a diminuir.

Como bem define Marques (2001), em termos de aplicação prática, amostras de sêmen mantidas resfriadas com motilidade de pelo menos 30% poderiam ser utilizadas em procedimentos de desova induzida em laboratório. Portanto, ao se considerar os resultados dos tratamentos no presente trabalho, pode-se afirmar que o período máximo (pós-diluição) aproximado para se ter viabilidade de uso seria: (a) para o sêmen não diluído, até 52 horas; (b) Ringer, até 40 horas; (c) solução salina de NaCl, até a diluição; (d) Glicose, até a diluição.

Portanto, apesar de haver uma discordância na literatura consultada quanto à eficiência ou não do uso de diluentes na refrigeração, nota-se que, para esta espécie e conforme a metodologia adotada neste trabalho, a conservação *in natura* e sem diluição apresentou resultados mais satisfatórios no quesito motilidade sob refrigeração.

Todavia, ao se contrariar tudo o que foi exposto e considerar apenas o sêmen diluído, poder-se-á afirmar que diluições feitas à base de NaCl e Glicose com intuito de refrigeração para o *B. amazonicus* seriam desnecessárias perante a baixa taxa de motilidade apresentada neste trabalho ainda no momento da diluição.

No entanto, a solução de Glicose é um dos diluentes mais utilizados na crioconservação 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. 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% (TEIXEIRA, 2013), superior a motilidade de 73,33% obtida para o sêmen de *B. orbignyianus* diluído em Glicose (MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003).

Teixeira (2013), trabalhando com tilápia-do-nylo, registrou ainda que 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. Fato este que só tem a corroborar com a ideia de que, para a definição de protocolos de conservação de sêmen de peixes, cada particularidade de cada espécie deve ser levada em consideração e que, em tese, um protocolo definido para uma espécie, nem sempre servirá para outra.

7 CONCLUSÕES

Apesar de as características do sêmen do Matrinchã apresentarem-se semelhantes às da maioria das espécies de peixes de água doce, importante é o seu conhecimento para uma correta escolha de um eficiente diluidor.

Quanto à refrigeração, quando o objetivo for manter o sêmen por curta duração de tempo, os resultados sugerem ser melhor mantê-lo *in natura*.

Perante os quatro diluentes testados, desnecessário se faz utilizá-los neste processo, visto que o sêmen sem diluição apresentou durabilidade mais satisfatória. No entanto, mais teste com outros diluentes são fundamentais no intuito de se encontrar algum que apresente maior eficiência que a do sêmen *in natura* e, só assim, poder-se-á afirmar quanto à exigência, ou não, de diluição para uma melhor conservação refrigerada.

Quanto às questões financeiras relacionadas, conclui-se também que, conforme a presente metodologia, trata-se de um procedimento mais lucrativo para o piscicultor, uma vez que dispensa gastos com a obtenção de substâncias diluidoras e com a manutenção de matrizes reprodutoras.

Por fim, em termos ecológicos, é notável o aumento da variabilidade genética, uma vez que, por ser um procedimento simples, torna mais fácil e prático a miscigenação entre plantéis de pisciculturas diversas.

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. II. effects of ions and osmotic pressure:** a review. *Cell Biology International*, v. 30, n. 4, p. 1-14, 2006.
- ARAÚJO, R.V. **Motilidade, Velocidade e Fertilidade do sêmen de Surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores.** 91p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Lavras, MG, 2011.
- BEZERRA, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, p. 20- 25, 2010.
- BILLARD, R. **Artificial Insemination in Fish.** In: LAMMING, G. E (Org.). *Marshall' s Physiology of Reproduction.* 4 ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, p. 870-887. 1990a.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D.; SILVA, A. L. F. **Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 3, p. 209-303, mar. 2005.
- 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.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. **Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility:** the effect of short-term storage. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.12, n.5, p.357-367, 1994.
- CÓSER, A. M. L. **Preservação de gametas de peixe.** In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. Anais... Belo Horizonte, MG: Campinas, Fundação Cargill, 1988, p. 251-262.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. **Ionic factors regulating the motility of fish sperm.** In: GAGNON, C. (ed.). *The male gamete: from basic science to clinical applications.* Vienna: Cache River Press, p.162-186. 1999.
- CRUZ-CASALLAS, P. E.; MEDINA-ROBELS, V. M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. **Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*).** *Revista Colombiana de Ciências Pecuarias*, v.19, p.152-159, 2006.

DONALDSON E.M., **The role of biotechnology in sustainable aquaculture**, In: BARDACH, J. E. Sustainable Aquaculture, p. 101-126, NY, USA, 1997.

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.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. **Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida**. B. Inst. Pesca, v. 17, p. 1-13, 1990.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. **O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons**. B. Inst. Pesca, v. 14, p. 69-73, 1987.

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 tilápiamônica *Oreochromis niloticus*, var. chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.

GOMES, L. de C.; URBINATI, E. C. **Matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. de C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2005.

GOMIERO, J. S. G.; RIBEIRO, P. A. P.; FERREIRA, M. W. et al. **Rendimento de carcaça de peixe matrinxã (*Brycon cephalus*) nos diferentes cortes de cabeça**. Ciência e Agrotecnologia, n. 27, p. 211-216, 2003.

HARVEY, B. **Cryopreservation of Fish Spermatozoa**. In: CLOUD, G. H. Genetic conservation of salmonid fishes. New York: Plenum Press, 1993.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Preservation of sperm**. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, Ontario: International Development Research Centre, p. 119-130. 1993.

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

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. **Produção comercial de alevinos de matrinxã na amazônia ocidental**. 7 p. Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica, 33. Manaus, 2009.

HOWES M. **Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei)**. Bull Br. Mus. Nat. Hist. (Zool). v. 43, n. 1, p. 1-47, 1982.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2007**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. 2007. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira> Acessado: 07nov2014.

IZEL, A. C. U.; MELO, L. A. S. **Criar matrinxã: atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense**. 22 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 31) Manaus. 2004.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. **Spawing and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei**. Aquat. Living Resour., v. 9, p. 59-80, 1996.

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.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A. et al. **As principais espécies produzidas no Brasil**. In: LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A. et al. Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo. Guaíba, RS: Agrolivros, 320 p. 2011.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura**. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1 ed., v. 1, p. 47-63, Embrapa Amapá, Amapá, 2009.

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.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 98f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2001.

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.

McANDREW, B. J. **Sex Control in Tilapiines**. p. 87-98. In: ROBERTS, R. J.; MUIR, J. Recent Advances in Aquaculture IV. Blackwell Scientific Publishing, 1993.

MELO, F. C. S. A.; GODINHO H. P. **A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish, *Brycon orthotaenia***. Animal Reproduction, v. 33, p.380-385, 2006.

MELO-MACIEL, M. A. P. et al. **Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de characiformes brasileiros**. Ciência Animal, v. 22, n. 1, p. 269-283, 2012.

MILIORINI, A. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

MORISAWA, M.; SUSUKI, K. **Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts**. Science, v. 210, p. 1145-1147, 1980.

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.; 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.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. **Criopreservação de 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.

NASCIMENTO, A. F.; GONÇALVES, A. C. S.; REIS NETO, R. V.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. **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, apr/jun. 2012.

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.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; ISAÚ, Z. A. **Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen em pirapitinga (*Brycon nattereri*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, p.1509-1515, 2007.

PELETEIRO, J. B.; CHEREGUINI, O.; CAL, R. M. **Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758)**. Informe Tecnico del Instituto Espanol de Oceanografo, v. 162, p. 1-13, 1996.

PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; GALLEGO, V.; MAZZEO, I.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. **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.

PESSOA, N. O.; SOUSA, M. L. N. M.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; SOARES FILHO, A. A.; SAMPAIO, C. M. S. **Resfriamento e criopreservação de embriões de peixes**. Ciência Animal v.22, n.3, p.57-62, 2012.

RANA, K. **Preservation of Gametes**. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. B. (eds.) Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge: Institute of Aquaculture, p. 53-75. 1995.

RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. **Criopreservação de sêmen de peixe**. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT84>. Acessado: 14 ago 2014. Corumbá. 2009.

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.

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(1), p. 1-7, 2003.

ROUTRAY, P. et al. **Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation**. Fish Physiology and Biochemistry, v. 33, p. 413-427, 2007.

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

SAAD, A.; BILLARD, R. **Production et gestion des spermatozoïdes chez le poisson-chat européen *Silurus glanis***. Aquat. Living Resour., v. 8, p. 323-328, 1995.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. et al. **Meios de congelação 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, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1673-1680, dez. 2011.

SATO Y; CARDOSO E. L.; OSÓRIO F. M. F. **Reprodução induzida do matrinhã (*Brycon lundii*)**. In: Associação Mineira de Aquicultura. Coletânea de resumos dos encontros da Associação Mineira de Aquicultura, CODEVASF, p. 1982-1987, Brasília, 1988.

SHIMODA, E. et al. **Utilização do espermátocrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*)**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, suplemento, p. 19-24, 2007.

STOSS, J. **Fish gamete preservation and spermatozoa physiology**. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (eds.). Fish physiology. vol.9. London: B. Academic Press, p. 305-350. 1983.

STREIT JR., D.P.; BENITES, C.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S; CALDIERI, R.F. **Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado**

com diluentes para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, p.289-297, 2006.

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 Biogy*, v. 42, p. 509-516, 1993.

SUQUET, M. et al. **Cryopreservation of sperm in marine fish.** *Aquaculture Resesarch*, v. 31, p. 231-243, 2000.

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.

TAN-FERMIN, J.D.; MIURA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. **Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther).** *Aquaculture*, v.171, p.323-338, 1999.

TEIXEIRA, E. G. **Caracterização e criopreservação de sêmen de tilápia-do-Nilo cultivada no Estado do Ceará.** 2013. 92f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza. 2013.

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.

VAL, A. L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia.** Manaus: INPA, 1995.

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 eosinanigrosina e azul de bromofenol.** *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 862-869, 2009.

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.

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

VIVEIROS, A. T. M. **Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes.** In: TIERSCH T. R.; GREEN, C. C. (eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2 ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 387-397, 2011.

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.; ORFÃO, L.H.; MARIA, N.A.; ALAMMAN, I.B.A. **Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen.** Anim. Reproduction Science. 112, 293-300. 2009b.

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.