

**DESEMPENHO REPRODUTIVO E  
RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE ESPÉCIES  
DE PEIXES NATIVAS MANTIDAS EM  
CATIVEIRO**

**GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA**

**2010**

**GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA**

**DESEMPENHO REPRODUTIVO E RESFRIAMENTO DE  
EMBRIÕES DE ESPÉCIES DE PEIXES NATIVAS  
MANTIDAS EM CATIVEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador  
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Gilmar Junqueira Machado.

Desempenho reprodutivo e resfriamento de embriões de espécies  
de peixes nativas mantidas em cativeiro / Gilmar Junqueira  
Machado Pereira. – Lavras : UFLA, 2010.

147 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luis David Solis Murgas..

Bibliografia.

1. Curimba. 2. Pacu. 3. Piracanjuba. 4. Embrião. 5. Crioprotetor.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.311

**GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA**

**DESEMPENHO REPRODUTIVO E RESFRIAMENTO DE  
EMBRIÕES DE ESPÉCIES DE PEIXES NATIVAS  
MANTIDAS EM CATIVEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 25 de fevereiro de 2010

Profa. Dra. Elissandra Ulbricht Winkaler - UFRB

Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA

Prof. Dra. Cristinha Delarete Drummond – UFLA

Prof. Dr. Jerry Carvalho Borges - UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## **DEDICO**

Àqueles que ao longo desse tempo  
estiveram comigo e tornaram meus  
dias mais felizes...

## AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao professor Luis David Solis Murgas, pela orientação, apoio, amizade, carinho, compreensão e confiança durante o nosso convívio.

Aos professores Paulo Pompeu, Elissandra Winkaler (Elis), Márcio Zangerônimo, Cristina Delarete, Luciano Pereira e Jerry Borges, pelas sugestões importantes que melhoraram o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-Cemig), na pessoa do Sr. Oscar Moura, que forneceu todo o apoio para a realização deste trabalho e aos funcionários Gilson e Jailson, pelo auxílio e colaboração.

Aos funcionários Willian César Cortez e Marcos Antônio Machado, do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pelo apoio na realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade e carinho.

A todos os amigos, pelo auxílio durante a realização do trabalho, em especial, Mariana Martins Drumond, Galileu Crovatto Veras, Ivan Bezerra Alaman, Raquel Melo, Michelle Sampaio, Daniela Aparecida, Marinez Moraes, Raquel Tatiane Pereira e mais uma vez à Elis que, antes de tudo, é uma grande amiga.

À minha família, aos meus pais, pelas orações, às minhas irmãs, Glenia e Gisele, pelo carinho e pela convivência fraterna.

À minha amiga Glycia Ferreira de Rezende, pela amizade, carinho e, principalmente, pela cumplicidade.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMARIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO GERAL .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVOS .....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
3.1 Bacia do rio Grande e Estação Ambiental de Itutinga .....	15
3.2 Reprodução das espécies de peixes nativas .....	17
3.3 Parâmetros reprodutivos .....	21
3.4 Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	24
3.5 Piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> .....	25
3.6 Curimba <i>Prochilodus lineatus</i> .....	26
3.7 Desenvolvimento embrionário de curmiba.....	28
3.8 Resfriamento e soluções crioprotetoras .....	30
3.9 Sensibilidade dos embriões a temperaturas baixas .....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1 Desempenho reprodutivo das espécies de peixes nativas mantidas em cativeiro .....	35
4.2 Resfriamento de embriões de curimba.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Desempenho reprodutivo das espécies de peixes nativas mantidas em cativeiro .....	46
5.1.1 Curimba .....	46
5.1.2 Pacu.....	59
5.1.3 Piracanjuba .....	73
5.2 Resfriamento de embriões de curimba.....	87
6 CONCLUSÕES .....	95
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	96
ANEXOS .....	109

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Quantidade de fêmeas (Qt.), valores de média e desvio padrão do peso das fêmeas em gramas (Grs.) e da temperatura da água (T °C) dos aquários da piscicultura da EAI – Cemig, nos períodos reprodutivos estudados.....	36
TABELA 2	Quantidade de fêmeas (Qt.), valores de média e desvio padrão do peso das fêmeas em gramas (Grs.) e da temperatura da água (T °C) dos aquários da piscicultura da EAI – Cemig, nos meses estudados.....	36
TABELA 3	Concentração, em miligramas por quilograma de fêmea ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), e intervalos entre as doses, em horas (h), de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) utilizada na indução hormonal de curimba, pacu e piracanjuba.....	37



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Piscicultura da Estação Ambiental de Itutinga da Cemig (EIA-CEMIG). Laboratório de reprodução (A e B) e tanques de terra onde são mantidos os reprodutores (C e D).....16
FIGURA 2	Tanque de reprodutores (A); captura dos reprodutores dos tanques (B); seleção dos animais aptos para reprodução (C); avaliação das características sexuais (D); aquários onde os reprodutores são mantidos até a reprodução (E) e aplicação hormonal (F).....20
FIGURA 3	Desova por extrusão (A e B), fertilização a seco (C) e incubação dos ovos utilizando incubadoras do tipo funil (D), realizada na piscicultura da EAI – Cemig.....22
FIGURA 4	Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....24
FIGURA 5	Piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> .....25
FIGURA 6	Curimba <i>Prochilodus lineatus</i> .....26
FIGURA 7	Ovos de curimba com espaço perivitelino amplo e translúcido.....30
FIGURA 8	Incubadora do tipo funil com capacidade de 200 litros utilizada para o desenvolvimento embrionário.....42
FIGURA 9	Embrião de curimba em 90% de epibolia (A) e detalhe de ovos gorados e ovos bons (B).....42
FIGURA 10	Esquema dos tratamentos testados no processo de resfriamento de embriões de curimba, sendo cinco repetições para cada tratamento.....43
FIGURA 11	Copos plásticos contendo os embriões durante o resfriamento (A). Incubadoras experimentais de cano de PVC teladas no fundo (A e B), com capacidade de aproximadamente um litro (Maria, 2005; Miliorini, 2006).....44

FIGURA 12	Lavras de curimba viáveis e ovos gorados, respectivamente.....	45
FIGURA 13	Boxplot da eficiência reprodutiva de curimba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	47
FIGURA 14	Regressão entre o peso corporal das fêmeas e o peso da desova ( $p < 0,05$ ).....	49
FIGURA 15	Boxplot dos valores de peso da desova em gramas (grs.) de curimba durante sete períodos reprodutivos (A) e meses estudados (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).....	50
FIGURA 16	Boxplot da fertilidade inicial de curimba durante dos períodos reprodutivos (A) e meses (B) de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).....	52
FIGURA 17	Boxplot da fertilidade inicial relativa (FIR) de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).....	53
FIGURA 18	Regressão entre a pluviosidade e a taxa de fertilização de curimba.....	54
FIGURA 19	Boxplot da taxa de fertilização de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).....	55
FIGURA 20	Boxplot da fertilidade final (FF) de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).....	57
FIGURA 21	Boxplot da fertilidade final relativa (FFR) de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).....	58

FIGURA 22	Boxplot da eficiência reprodutiva de pacu nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,08$ ).....	60
FIGURA 23	Regressão significativa entre o tempo de desova e a pluviosidade para pacu.....	61
FIGURA 24	Regressão significativa entre o tempo de desova e a pluviosidade para pacu.....	62
FIGURA 25	Boxplot do peso da desova em gramas de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	64
FIGURA 26	Boxplot da fertilidade inicial de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	66
FIGURA 27	Boxplot de fertilidade inicial relativa de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	67
FIGURA 28	Boxplot da taxa de fertilização de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	69
FIGURA 29	Boxplot da fertilidade inicial de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,08$ ).....	71
FIGURA 30	Boxplot de fertilidade final relativa de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	72

FIGURA 31	Boxplot da eficiência reprodutiva de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	74
FIGURA 32	Regressão linear entre a pluviosidade e o peso da desova das fêmeas de piracanjuba.....	76
FIGURA 33	Regressão entre o peso corporal das fêmeas e o peso da desova de piracanjuba.....	77
FIGURA 34	Boxplot do peso da desova de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	78
FIGURA 35	Boxplot de fertilidade inicial de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	80
FIGURA 36	Boxplot de fertilidade inicial relativa de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	81
FIGURA 37	Boxplot de taxa de fertilização de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	83
FIGURA 38	Boxplot da fertilidade final de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	85
FIGURA 39	Boxplot da fertilidade final relativa de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	86

FIGURA 40	Taxa de eclosão dos embriões submetidos a diferentes soluções crioprotetoras em diferentes tempos de resfriamento a 4°C.....	88
FIGURA 41	Larvas viáveis após a eclosão dos embriões submetidos a diferentes soluções crioprotetoras em diferentes tempos de resfriamento a 4°C.....	91
FIGURA 42	Ovos que não se desenvolveram a larvas (ovos gorados) após a eclosão dos embriões submetidos a diferentes soluções crioprotetoras em diferentes tempos de resfriamento a 4°C.....	93

## RESUMO GERAL

PEREIRA, Gilmara Junqueira Machado. **Desempenho reprodutivo e resfriamento de embriões de espécies de peixes nativas mantidas em cativeiro**. 2010. 147 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

Realizou-se este trabalho com objetivo de avaliar o desempenho reprodutivo de curimba, pacu e piracanjuba mantidos na piscicultura da Estação Ambiental de Itutinga da Cemig (EAI –Cemig) e avaliar também a influência da utilização de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol em embriões de curimba, após serem submetidos ao resfriamento por duas, quatro, seis e oito horas a 4°C. A indução hormonal foi realizada pelo método de hipofiseação, utilizando extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e foram analisados os seguintes parâmetros: eficiência reprodutiva, tempo de desova, peso da desova, fertilidade inicial, taxa de fertilização, fertilidade final, fertilidade inicial relativa e fertilidade final relativa. Para curimba, a eficiência reprodutiva foi, em média, de 76 a 96%, e a desova ocorreu entre 7 a 8 horas após a última aplicação hormonal, alcançando taxa de fertilização de 66,9%, resultando, em média, 180.000 larvas de curimba. A desova de pacu ocorreu entre 9 a 12 horas após a última aplicação hormonal, resultando em uma produção de ovócitos superior a 500.000, e a taxa de fertilização foi de 78%. A piracanjuba apresentou eficiência reprodutiva de 50,5 a 87,5%, e o peso da desova das fêmeas foi, em média, de 206,6g de ovócitos, com a taxa de fertilização de até 76,9%, sendo produzidas 45.000 larvas. O resfriamento tem sido utilizado como uma estratégia de conservação de embriões de peixe por um tempo limitado. Foram testados dois crioprotetores intracelular: o DMSO e o metanol em concentração de 5; 7,5; 10 e 12,5%. A temperatura de resfriamento foi de 4°C por duas, quatro, seis e oito horas. Foram analisados a taxa de eclosão dos embriões, as larvas viáveis, aquelas que eclodiram e os ovos gorados, ou seja, os que não completaram o seu desenvolvimento após o resfriamento. O aumento na concentração do crioprotetor e o tempo de resfriamento promoveram a redução da taxa de eclosão dos embriões e na porcentagem de larvas viáveis de curimba. As soluções contendo apenas água e sacarose obtiveram taxas de eclosão menores que 25%. O tempo de resfriamento promoveu uma redução na taxa de eclosão dos embriões, independentemente da concentração da solução crioprotetoras. Nas soluções em

---

<sup>1</sup> Orientador: Luis David Solis Murgas - UFLA (Orientador).

que foi utilizado o metanol como crioprotetor intracelular, a porcentagem de larvas viáveis foi superior àquelas em que o crioprotetor intracelular foi o DMSO. As porcentagens de ovos gorados observados, durante o resfriamento de embriões de curimba, demonstram um aumento significativo em relação ao incremento das concentrações dos crioprotetores e os tempos de resfriamento. As espécies de estudo apresentaram elevado desempenho reprodutivo, o que significa que essas espécies são capazes de se reproduzirem em condições de cativeiro. É necessária a utilização de soluções crioproterias durante o resfriamento de embriões de curimba, permitindo um aumento significativo das taxas de eclosão dos embriões e das larvas viáveis de curimba.

## ABSTRACT

PEREIRA, Gilmara Junqueira Machado. **Reproductive performance and cooling of embryos of native fish species kept in captivity.** 2010. 147 p. Ph.D. Thesis (Animal Production) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

The objective of this study was to evaluate the reproductive performance of curimba, piracanjuba and pacu fish kept in Station Environmental Itutinga CEMIG and evaluate the influence of using different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) and methanol in embryos curimba, after being subjected to cooling at two, four, six and eight hours at 4 ° C. The hormonal induction was performed by hypophysation using crude extract of carp pituitary and were analyzed the following parameters: reproductive efficiency, time of spawning, weight of spawning, initial fertility, fertilization rate, final fertility, relative initial fertility and relative final fertility. For curimba reproductive efficiency averaged 76 to 96%, spawning occurred between 7 to 8 hours after the last hormonal application, reaching the fertilization rate of 66.9%, resulting in an average of 180 000 larva of curimba. Spawning pacu occurred between 9 at 12 hours after the last hormonal application, resulting in a production of over 500 000 oocytes, the fertilization rate was 78%. The piracanjuba presented reproductive efficiency from 50.5 to 87.5%, the weight of spawning females averaged 206.6 g of oocytes, fertilization rate with up to 76.9%, were produced 45 000 larva. The cooling has been used as a strategy for conservation of fish embryos for a limited time. We tested two intracellular cryoprotectants, DMSO and methanol in concentrations of 5.0, 7.5, 10.0 and 12.5%. The cooling temperature was 4 °C for two, four, six and eight hours. We analyzed the hatching rate of embryos, viable larva, those that hatched and the spoiled eggs, those who have not completed their development after cooling. The increase in the concentration of cryoprotectant and cooling time promoted the reduction of hatching rate of embryos and in the percentage of viable larva of curimba. The solutions containing only water and sucrose obtained hatching rates lower than 25%. Cooling time promoted a reduction in hatching rate of embryos, regardless of the concentration of the cryoprotectant solution. In solutions that used methanol as cryoprotectant intracelular, the percentage of viable larva was higher than those in which the intracellular cyoprotectant was DMSO. The percentages of spoiled eggs observed during the cooling of embryos curimba show a significant increase compared to the increase in concentrations of

---

<sup>1</sup> Guidance: Luis David Solis Murgas - UFLA (Orientador).



cryoprotectants and times of cooling. The species studied showed a high reproductive performance, show that these species are able to reproduce under conditions of captivity. It is necessary to use cryoprotectants solutions during cooling of embryos curimba, allowing a significant increase in hatching rates of embryos and percentages of viable larva of curimba.

## 1 INTRODUÇÃO

As estratégias utilizadas pelas diferentes espécies nos seus ciclos de vida resultam da seleção natural para produzir o número máximo de jovens capazes de sobreviver. A maioria dos peixes tropicais desova várias vezes na vida, sendo esse um processo que ocorre em intervalos que se repetem. As distintas espécies de peixes nativas apresentam particularidades no comportamento reprodutivo, associadas às estações de desova, produzindo numerosos ovócitos, e muitas delas realizam longas migrações.

A curimba *Prochilodus lineatus*, o pacu *Piaractus mesopotamicus* e a piracanjuba *Brycon orbignyanus* são espécies de peixes que possuem comportamento de desova total, estimulados por fatores externos como, por exemplo, o regime de chuvas. O início da estação de cheias é o principal período de desova, pois suas larvas alimentam-se nas planícies de inundação. A estratégia de realizar migrações entre os locais de alimentação e desova permite que as espécies maximizem o aproveitamento do ecossistema, buscando os melhores locais para cada uma das etapas do ciclo de vida.

A piscicultura nacional tem se interessado pelo cultivo das espécies nativas. No entanto, o ciclo reprodutivo dessas espécies mantidas em cativeiro torna-se alterado devido, principalmente, ao impedimento do estímulo de migração, afetando diretamente o desenvolvimento gonadal. A compreensão dos mecanismos ambientais e fisiológicos que regulam o ciclo reprodutivo dos peixes proporciona uma grande aplicabilidade no manejo do seu cultivo, possibilitando a obtenção de peixes maduros em épocas distintas do ano, e assim produzir alevinos em um período maior que aquele encontrado em ambiente natural.

A possibilidade de estimular a reprodução dos peixes migradores pela indução hormonal tem demonstrado resultados positivos, visto que esse manejo desencadeia todo processo fisiológico para que a reprodução ocorra em cativeiro. A capacidade de seleção de peixes maduros é vital para o sucesso do processo de indução da maturação final e desova, sendo considerada a etapa mais importante para o sucesso da desova.

A partir do domínio do processo de manejo reprodutivo em peixes cultivados, fica evidente a importância da análise dos parâmetros reprodutivos, a fim de prever a produção de larvas e alevinos, característica principal para produção de peixes. Conhecendo esses parâmetros, será possível dimensionar as necessidades do empreendimento em torno do plantel de reprodutores e da produção de larvas e alevinos.

A construção de reservatórios favorece o desenvolvimento tecnológico, urbano e industrial do país; em contrapartida, os represamentos provocam transformações profundas sobre o ambiente, principalmente na ictiofauna local, em geral com perda de biodiversidade. Muitas ações para mitigar os impactos causados pelos represamentos são realizadas, sendo uma a reprodução artificial de espécies de peixes nativas, pela produção de larvas e alevinos, que são, muitas vezes, utilizados no repovoamento de rios.

Dentro do manejo reprodutivo de peixes, a utilização de biotecnologias aplicadas à manipulação de gametas tem sido implantadas com sucesso, como estratégia de prolongar a vida útil deles. Essas biotecnologias poderiam abrir novas perspectivas no cultivo e no manejo de espécies ameaçadas de extinção. Adicionalmente, poderia fornecer embriões de algumas espécies em períodos durante os quais não ocorrem desovas naturais, permitindo um aumento na produção comercial e conservacionista.

A criopreservação ainda não é uma técnica viável para embriões de peixes, devido a inúmeros fatores, como: sensibilidade ao frio do embrião, diferente permeabilidade das membranas e quantidade de vitelo. Por outro lado, pesquisadores têm mostrado que o resfriamento de embriões de peixe está mais próximo de ter um protocolo estabelecido.

Para o desenvolvimento de um protocolo de resfriamento ou criopreservação, soluções crioprotetoras são indispensáveis para submeter os embriões a baixas temperaturas. A ação do crioprotetor está relacionada aos processos de entrada de crioprotetor e saída da água do embrião. Estratégias diferentes são utilizadas para minimizar os danos osmóticos aos embriões, pelo uso de crioprotetores menos tóxicos, bem como pela combinação de dois ou três crioprotetores.

O metanol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol, o etilenoglicol e a sacarose são as combinações crioprotetoras mais comumente utilizadas. Todos eles são moderadamente tóxicos e isso limita a concentração em que eles podem ser utilizados e a sua eficiência na crioproteção.

## **2 OBJETIVOS**

Neste estudo, objetivou-se avaliar o desempenho reprodutivo e o resfriamento de embriões de espécies de peixes nativas mantidas em cativeiro.

### **2.1 - Objetivos específicos**

- Avaliar o desempenho reprodutivo de curimba, pacu e piracanjuba mantidos na piscicultura da Estação Ambiental de Itutinga da Cemig (EAI – Cemig), por sete períodos reprodutivos consecutivos.

- Avaliar a influência da utilização de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol em embriões de curimba, após serem submetidos ao resfriamento por duas, quatro, seis e oito horas a 4°C.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Bacia do rio Grande e Estação Ambiental de Itutinga

A bacia do rio da Prata é constituída pelas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, drenando áreas do Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai. O rio Paraná possui cerca de 4.900 km de extensão, sendo o segundo em comprimento na América do Sul. Ele percorre, desde sua nascente, cerca de 1.900 km em território brasileiro, cruzando diversos estados, e apresentando desnível total de quase 1.000 m. Recebe esse nome após a conjugação dos rios Grande e Paranaíba, e possui como principais tributários os rios Paraguai, Tietê, Paranapanema e Iguaçú.

Essa bacia comporta as áreas de maior densidade populacional do país, além de ser a mais industrializada e com grande atividade agrícola. É a mais intensamente explorada pelos aproveitamentos energéticos, fornecendo cerca de 70% da energia produzida no país, além de deter a maior capacidade instalada nacional (Agostinho et al., 2007).

O rio Grande pertence à bacia do rio Paraná, e nasce na Serra da Mantiqueira, faz a divisa do estado de São Paulo com o Triângulo Mineiro, em um trecho importante de planícies alagáveis. Ocupa uma área de aproximadamente 143.000 Km<sup>2</sup>, sendo 60% pertencente ao Estado de Minas Gerais, o que equivale a 17,8% da área do estado. No rio Grande, estão instaladas treze usinas hidrelétricas (UHE), as quais são responsáveis por gerar cerca de 67% de toda energia elétrica do estado de Minas Gerais.

No Alto rio Grande encontra-se a UHE de Itutinga (Lat 21° 17' 30" Long 44° 37' 26"), construída entre 1952-1955, de propriedade da Cemig. Essa usina possui uma Estação Ambiental destinada ao estudo da piscicultura, da

limnologia e da biologia pesqueira. A Unidade Ambiental Itutinga é um centro de pesquisas que investiga os impactos da implantação de uma usina hidrelétrica na estrutura das comunidades aquáticas (FIGURA 1).



FIGURA 1 Piscicultura da Estação Ambiental de Itutinga da Cemig (EIA-Cemig). Laboratório de reprodução (A e B) e tanques de terra onde são mantidos os reprodutores (C e D).

Com objetivo de conservação da biodiversidade e da manutenção da pesca na região, a Estação Ambiental de Itutinga possui uma piscicultura que faz a reprodução induzida de alguns peixes, como pacu *Piaractus mesopotamicus*, dourado *Salminus brasiliensis*, piapara *Leporinus elongatus*, piracanjuba *Brycon*

*orbignyanus* e curimba *Prochilodus lineatus*. Desde a piracema de 1995/96, já foram produzidos mais de 1 milhão de alevinos de peixes nativos do Alto rio Grande. A Estação Ambiental de Itutinga possui parceria com o produtor rural, visando ao fomento a piscicultura no Sul de Minas, através do cultivo de espécies nativas para a manutenção dos estoques da natureza, com a participação efetiva das comunidades, além de um intensivo apoio às pesquisas científicas, em parceria com universidades da região.

### **3.2 Reprodução das espécies nativas de peixes**

Muitas vezes, as condições de cultivo não são as mais adequadas para provocar a desova das espécies nativas, de modo que se faz necessária a utilização de substâncias para que o peixe complete o seu ciclo reprodutivo (Baldisserotto, 2002), portanto, é interessante na piscicultura tanto comercial quanto conservacionista induzir a desova, para que ela ocorra no momento desejado e em condições controladas, permitindo um melhor acompanhamento das fases iniciais do desenvolvimento, de modo a aumentar a produção de alevinos (Zaniboni Filho & Weingarther, 2007).

A reprodução da maioria das espécies de peixes nativas é sazonal, estando, geralmente, sincronizada com fatores ambientais que se adaptam às necessidades metabólicas dos reprodutores, de tal forma que incremente a viabilidade dos gametas e favoreça o desenvolvimento inicial da prole (Vazzoler, 1996).

A reprodução artificial em peixes iniciou-se em 1934, pelo pesquisador brasileiro Rodolpho von Ihering, que conseguiu êxito na indução da desova e fertilização da curimatá *Prochilodus scrofa*, uma espécie de caráter reofílico, por meio da aplicação de extratos hipofisários, técnica conhecida como hipofisação. No princípio da década de 1980, a Companhia de Desenvolvimento do Vale do



São Francisco, a Codevasf, importou da Hungria um pacote tecnológico sobre reprodução artificial de peixes por meio da hipofisacção. A partir daí, essa tecnologia foi difundida com êxito, sendo utilizada nas espécies brasileiras por diversos órgãos governamentais, centros de pesquisas e, principalmente, por piscicultores.

As técnicas de reprodução artificial de peixes são múltiplas, todas com o objetivo de produzir quantidade abundante de ovos, larvas e alevinos para a utilização em cultura ou para o repovoamento de lagos e cursos de água. Dependendo da eficiência do sistema de reprodução artificial, o aproveitamento dos ovos até alevinos pode atingir de 10% a 70% no rendimento; em contrapartida, a taxa de sobrevivência sob condições naturais, geralmente, é inferior a 1% dos ovos produzidos (Woynarovich & Horbáth, 1989).

Entre as principais técnicas de indução da desova, a hipofisacção, ou a utilização do extrato bruto de hipófise de carpa-comum *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (EBHC), é a técnica mais utilizada com as espécies nativas brasileiras (Cyrino et al., 2004). Esse procedimento é o mais antigo utilizado para a indução hormonal da desova de peixes (Streit Junior et al., 2002). Segundo Andrade & Yasui (2003), essa técnica pode ser considerada padrão na indução reprodutiva, pelas facilidades em se obter informações pertinentes na literatura e pela facilidade de execução, tornando-se uma prática bastante difundida.

Segundo Woynarovich & Horbáth (1989), o processo de indução artificial praticado nas estações de piscicultura ou entre os piscicultores inicia-se com a seleção minuciosa dos reprodutores aptos (FIGURA 2), sendo observados, nas fêmeas, o volume e a flacidez ventral, bem como o tamanho e a coloração avermelhada da papila urogenital. Nos machos, a seleção é feita

exercendo-se leve pressão abdominal no sentido crânio-caudal, observando-se a existência da espermiacão.

Comumente, utilizam-se duas injeções intramusculares na fêmea, com intervalo de 4 a 12 horas, dependendo da espécie (FIGURA 2). A primeira dose, chamada preparatória, é para a maturação total, e a segunda, dez vezes maior que a primeira, é para a maturação final e liberação dos ovócitos. Os machos recebem apenas uma dose de hormônio, no momento em que as fêmeas recebem a segunda dose (Woynarovich & Horvath, 1989; Murgas et al., 2003), mas, em alguns casos, são necessárias duas doses. Em pacu *Piaractus mesopotamicus*, dourado *Salminus brasilienses*, piracanjuba *Brycon orbignyanus*, piapara *Leporinus elongatus* e *Leporinus obtusindes* e curimba *Prochilodus lineatus*, doses de 0,5 e 5,0 mg/kg de EBHC foram suficientes para induzir a desova e a espermiacão (Murgas et al., 2003).

Romagosa et al. (1990) obtiveram 57,9% e 84,0% de resposta positiva na indução da desova de pacu utilizando gonadotrofina coriônica humana (hCG) e extrato de hipófise de salmão (EHS), respectivamente. Sato et al. (1996a) observaram uma eficiência reprodutiva para *Prochilodus marggravii* de 70% a 92%. Andrade-Talmelli et al. (2002) obtiveram 81,8% e 27,8% de eficiência na reprodução induzida de *Brycon insignis* utilizando EBHC e gonadotrofina coriônica humana (hCG), respectivamente. Navarro et al. (2007) obtiveram 75% e 25% de eficiência reprodutiva na reprodução induzida de curimatã *Prochilodus affinis* utilizando diferentes dosagens de extrato bruto de hipófise de rã-touro (0,5 e 0,7 mg/kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Esses resultados demonstram uma maior eficiência dos extratos hipofisários para a indução a desova das espécies nativas.



FIGURA 2 Tanque de reprodutores (A); captura dos reprodutores dos tanques (B); seleção dos animais aptos para reprodução (C); avaliação das características sexuais (D); aquários onde os reprodutores são mantidos até a reprodução (E) e aplicação hormonal (F).

Zaniboni Filho & Barbosa (1996) realizaram trabalhos com inúmeras espécies nativas, como dourado *Salminus brasiliensis*, jaú *Zungaro jahu*, matrinxã *Brycon cephalus*, pacu *Piaractus mesopotamicus*, piapara *Leporinus elongatus*, piau *Leporinus friderici* e tambaqui *Colossoma macropomum*, utilizando uma dose prévia de 0,25 mg de EBHC e observaram uma alta qualidade e quantidade dos gametas, quanto comparados ao tratamento sem dose prévia. Esse procedimento de dosagem prévia também foi adotado por Dumont-Neto et al. (1997), utilizando EBHC para machos e fêmeas de piracanjuba *Brycon orbignyanus*, sendo assim, recomendado para a indução da desova dessa espécie.

### **3.3 Parâmetros reprodutivos**

Segundo Zaniboni Filho & Weingarther (2007), o sucesso da reprodução depende de um ajuste temporal que garanta que a desova ocorra no momento exato, quando as condições ambientais se apresentem as mais favoráveis para a sobrevivência dos descendentes. Dessa forma, a sincronia entre os processos fisiológicos de maturação gonadal com as condições ambientais faz-se extremamente necessária.

Algumas espécies nativas brasileiras, quando em condições de cativeiro, não liberam os gametas espontaneamente, sendo necessária a indução hormonal (Woyrnarovich & Horváth, 1989). A desova por extrusão e a fertilização a seco possibilitam ampliar o tempo de manejo dos gametas (FIGURA 3), permitindo a separação e quantificação da desova nas porções a serem estocadas em incubadoras distintas, além de aumentar a taxa de fertilização (Cyrino et al., 2004).



FIGURA 3 Desova por extrusão (A eB), fertilização a seco (C) e incubação dos ovos utilizando incubadoras do tipo funil (D), realizada na piscicultura da EAI – Cemig.

Os peixes de piracema são altamente fecundos, até algumas centenas de milhares de ovócitos/kg de fêmea (Godinho et al., 1997). É importante reconhecer a fecundidade por lote de desova e por período reprodutivo (Vazzoler, 1996). Por várias razões, o número de ovócitos esperado numa desova é geralmente menor do que aquele obtido (Sato et al., 1996b, 1997, 2000). Assim, outra variável, a fertilidade, adquire importância prática nas estações de piscicultura. Fertilidade indica o número de ovócitos realmente desovados por lote ou por período reprodutivo (Sato et al., 2003).

Godinho (2007) relata que para estabelecer um protocolo realístico de produção de alevinos, uma série de parâmetros reprodutivos deve ser avaliada quanto ao número de alevinos que se propõe a produzir. O conhecimento desses parâmetros torna possível dimensionar as necessidades do empreendimento em termos de plantel de reprodutores e da produção de alevinos.

Os parâmetros mais comuns às fêmeas de uma determinada espécie são:

- Peso da desova;
- fertilidade inicial (FI), que mede a relação entre o número de ovócitos extruídos por fêmea e fertilidade inicial relativa (FIR) que mede a relação entre o número de ovócitos extruídos por grama de fêmea. Esses parâmetros são mais úteis ao manejo em aquicultura do que os de fecundidade; para sua determinação, são utilizados dados obtidos na prática da hipofisação; eles são utilizados na avaliação da eficiência do manejo da reprodução (manejo de reprodutores, eficiência da hipofisação e do processo de extrusão);
- Taxa de fertilização (TF), que determina, em porcentagem, a relação entre o número de ovos viáveis por número total de ovos: esse parâmetro, obtido com ovos viáveis (ovos embrionados no estágio de fechamento do blastóporo), é um indicador seguro da qualidade dos ovócitos, do sêmen, do processo de fertilização e da embriogênese;
- Fertilidade final (FF) que determina o número de ovos viáveis por fêmea e a fertilidade final relativa (FFR) que mede a relação entre o número de ovos viáveis por grama de fêmea: esses parâmetros servem para avaliar o rendimento da embriogênese; em geral, a fertilidade final é menor do que a fertilidade inicial.

Segundo Sato et al. (1996c), dentro de uma mesma espécie, o número de ovócitos aumenta com o peso corporal da fêmea. A taxa de fertilização está diretamente relacionada aos fatores abióticos (Koger et al., 1999).

### 3.4 Pacu - *Piaractus mesopotamicus*



FIGURA 4 Pacu *Piaractus mesopotamicus*.

O *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecido como pacu e pacu-caranha (FIGURA 4), pertence à família Characidae, subfamília Myleinae (Britski et al., 1999; Nakatani et al., 2001). Geograficamente, está distribuído pela bacia do rio da Prata, formada pelos rios Paraguai, Paraná e Uruguai e seus tributários (Romagosa et al., 1988; Reis et al., 2003).

Essa família é a mais numerosa e complexa da Ordem Characiformes, tanto que possui um grande número de subfamílias, que incluem peixes de diversos tamanhos com diferentes hábitos alimentares (Oyakama et al., 2006). O pacu é uma espécie de peixe de grande porte, podendo atingir 1,0 m de comprimento e até 20 kg de peso. Tem o corpo robusto e arredondado, e os dentes truncados e tricúspides (Companhia Energética de Minas Gerais-Cemig, 2000). Possui alimentação onívora composta por itens de origem animal e

vegetal, sendo sementes e restos vegetais, os recursos mais consumidos (Ferreira et al., 2004; Medeiros et al., 2009).

Essa espécie vive em ambientes lóticos e realiza migrações reprodutivas rio acima (Lima & Chabalin, 1981), caracterizando-se por apresentar desova total e fecundação externa (Romagosa et al., 1988). Por ser uma espécie de piracema, em ambiente confinado, depende da indução hormonal para obter sucesso na sua reprodução (Castagnolli & Donaldson, 1981).

Devido ao elevado valor comercial, adaptação à alimentação artificial e também pela facilidade de obtenção de larvas por meio de reprodução induzida (Furuya, 2001), o *P. mesopotamicus* tem sido muito utilizado nas pisciculturas, tanto para cultivo quanto para o repovoamento dos rios.

### 3.5 Piracanjuba - *Brycon orbignyanus*



FIGURA 5 Piracanjuba *Brycon orbignyanus*.

A espécie *Brycon orbignyanus*, popularmente conhecida como piracanjuba (FIGURA 5), pertence à Família Characidae e possui uma distribuição geográfica que se estende pela bacia do rio Paraná (Agostinho et al., 1997). As fêmeas atingem comprimento total de 80 cm e peso corporal de



aproximadamente 8 kg e os machos, 70 cm e 4 kg, respectivamente (CEMIG, 2000). A espécie possui hábito alimentar onívoro (Castagnolli, 1992).

Na época de reprodução, realiza migrações subindo os rios, apresentando um período reprodutivo que se estende de dezembro a janeiro, sendo a desova sazonal com pico. O diâmetro médio dos ovócitos maduros é de 1,55 mm (Vazzoler, 1996). As larvas eclodem 16 horas após a fecundação, à temperatura de 27,9°C (Nakatani et al., 2001).

A piracanjuba consta no Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais, no qual relata-se a possibilidade de estar extinta em algumas localidades, principalmente no Alto rio Grande (Machado et al., 1998). A redução da população da espécie em ambiente natural pode estar relacionada com a construção de um grande número de barragens hidrelétricas, que impedem a sua migração reprodutiva, e também com o desmatamento ciliar, que reduz a disponibilidade da sua alimentação natural, o que se agrava ainda mais com a deterioração da qualidade da água, devido à poluição (Paiva, 1982).

### 3.6 Curimba - *Prochilodus lineatus*



FIGURA 6 Curimba *Prochilodus lineatus*.

A curimba, também conhecida como curimatã, curimbatá ou papa-terra, é uma das espécies do gênero *Prochilodus* que possuem ampla distribuição pela América do Sul (FIGURA 6). No Brasil, está presente em todas as principais bacias hidrográficas, sendo mais comum na bacia do Paraná (Reis et al., 2003). Essa espécie era identificada, na bacia do Alto rio Paraná, como *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. Castro & Vari (2003) consideraram essa espécie sinônimo de *Prochilodus lineatus*.

É uma espécie de peixe de médio porte, atingindo até 70 cm, sendo considerada importante para a pesca comercial, artesanal ou de subsistência (Reis et al., 2003). Iliófaga, a curimba consome quase exclusivamente finas partículas do lodo onde estão contidos sedimentos inorgânicos, que é a parcela mais considerável da dieta, além de detritos orgânicos e diatomáceas (Fugi et al., 1996).

Essa espécie realiza migração em massa, rio acima, na época de reprodução, de novembro a janeiro, podendo migrar várias centenas de quilômetros até as áreas de desova. O macho reproduz-se aos dois anos de idade, com 24 cm, e a fêmea, aos três anos, com 31 cm de comprimento. Por se tratar de uma espécie reofílica, não se reproduz em ambientes lênticos e em cativeiro, devendo-se, para tanto, recorrer à indução hormonal (CEMIG, 2000).

Nakatani et al. (2001) descrevem que a primeira maturação sexual do *Prochilodus lineatus* ocorreu com cerca de 197 mm de comprimento total, apresentando período reprodutivo entre novembro e fevereiro, com desova total, sazonal com pico. O diâmetro médio dos ovócitos maduros foi de 1,45 mm (Vazzoler, 1996). As larvas eclodiram 16 horas após a fecundação, à temperatura de 25,9°C.

Os ovos, larvas, alevinos e os adultos são importantes alimentos de muitas espécies de peixes predadores. Numerosas espécies de aves aquáticas

também se alimentam dessa espécie. Por esse motivo, são utilizados nas pisciculturas em sistemas de consorciação com outras espécies (Murgas et al., 2003).

### **3.7 Desenvolvimento embrionário de curimba**

O período embrionário em peixes teleósteos inicia-se após a união dos gametas, via micrópila, quando ocorre o início da divisão celular. Após a fertilização o ovo absorve água e ocorre a formação do espaço perivitelino, com a separação do córion da membrana vitelina (Nakatani et al., 2001).

Vários autores têm estudado o desenvolvimento embrionário de espécies nativas brasileiras como *Prochilodus lineatus* (Castellani et al., 1994), *Colossoma macropomum* (Albuquerque & Silva, 1994), *Piaractus mesopotamicus*, *Pimelodus maculatus* (Luz et al., 2001), *Brycon cephalus* (Lopes et al., 1995; Romagosa et al., 2001), *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli et al., 2001) e *Brycon orbignyanus* (Ganeco, 2003; Landinez et al., 2004).

Para a avaliação do desenvolvimento embrionário de peixes, vários autores utilizam diferentes critérios para estabelecer estágios ou fases (Matkovic et al., 1985; Carter & Wourms, 1991; Castellani et al., 1994; Kimmel, 1995; Ribeiro et al., 1995; Nakatani et al., 2001). Ribeiro et al. (1995) analisaram a morfologia externa do ovo e suas características microscópicas e dividiram a embriogênese em quatro fases: pós-fecundação, com uma única célula; segmentação, incluindo as fases de mórula e blástula; morfogênese e organogênese inicial, incluindo as fases de gástrula inicial, intermediária e avançada; organogênese média, tardia e eclosão, do aparecimento dos primeiros pares de somitos, até a eclosão das larvas.

O processo de estagiamento é uma ferramenta fundamental nos estudos de desenvolvimento, pois diferentes embriões, mesmo sendo de uma mesma prole, podem apresentar taxas e tempos de desenvolvimento ligeiramente diferentes. A diferença de tempo no desenvolvimento pode estar relacionada diretamente com a temperatura de incubação (Landinez et al., 2004). Essa assincronia foi observada para embriões de *Danio rerio* fertilizados simultaneamente com a mesma temperatura de incubação de 28°C (Westerfield, 1983), o que também concorda com as observações feitas por Kimmel et al. (1995) para outros teleósteos.

A espécie *Prochilodus lineatus*, conhecida como curimba, realiza migrações reprodutivas, reproduzindo-se nos leitos dos rios durante a estação das chuvas. O período reprodutivo dessa espécie estende-se de novembro a janeiro, apresentando desova total ou única e não proteção à prole. Os ovócitos liberados são livres, de coloração acinzentada e a sua fecundação é externa (Romagosa, 1988).

Os ovos produzidos pela curimba são translúcidos e quando recém-fecundados apresentam diâmetro médio de 3,62 mm, o espaço perivitelino é amplo (31,32%), com tamanho médio de 1,13 mm (FIGURA 7). Logo após a fecundação e hidratação, o espaço perivitelino duplica o seu diâmetro. A embriogênese dessa espécie pode variar de acordo com a temperatura da água, permanecendo próximo de 25h20min a 24,8°C (Nakatani et al., 2001).

Pereira et al. (2008) estudaram o desenvolvimento embrionário de curimba e observaram que a clivagem ocorreu, em média, com 1,33 hora. Esse período abrange as seis primeiras divisões, gerando embriões com 64 células. O período de blástula abrangeu 3 horas, desde o estágio de 128 células até a formação do anel germinativo no embrião. Os autores observaram às 2,5 horas o anel produzido pela involução das células do epiblasto. Durante a diferenciação

do embrião, foi observada a aparição dos primeiros somitos, da vesícula óptica e o desenvolvimento do mesencéfalo. A eclosão ocorreu, em média, 18 horas após a fertilização; entretanto Nakatani et al. (2001) obtiveram a eclosão dos embriões, da mesma espécie, após 25 horas, aproximadamente.

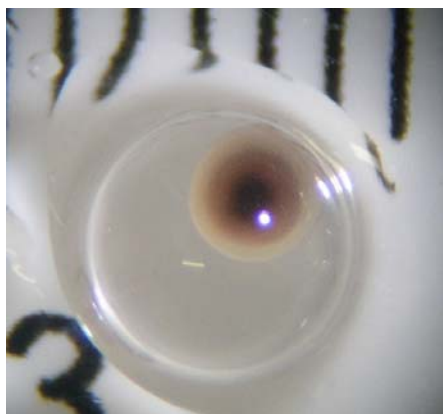


FIGURA 7 Ovos de curimba, com espaço perivitelino amplo e translúcido.

### **3.8 Resfriamento e soluções crioprotetoras**

O resfriamento consiste na manutenção dos ovos em temperaturas baixas, acima do ponto de congelamento, o que reduz a atividade metabólica, prolongando a sua viabilidade no meio externo. Esse processo tem sido utilizado como uma estratégia de conservação de tempo limitado. Os embriões são submetidos a baixas temperaturas por um período de tempo, como forma de conservá-los durante o transporte em locais remotos, como, por exemplo, cabeceiras de rios para a incubação em laboratório (Ahammad et al., 2003). Desse modo, verifica-se que o resfriamento é uma alternativa viável para a

conservação de curto prazo. Entretanto, o sucesso do procedimento é variável e depende da espécie e da utilização de crioprotetores específicos.

Os crioprotetores são divididos em duas categorias: (1) intracelulares, que são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o aquecimento, sendo comumente utilizados o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol, o metanol e o etanol; (2) extracelulares, que são as macromoléculas e açúcares, cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular, como, por exemplo, a glicose e a sacarose (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

As características fundamentais para um agente crioprotetor eficiente é o baixo peso molecular, a sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade (Kasai, 1996). Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais eficientes, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do resfriamento é mais curto, prevenindo as injúrias osmóticas (Kasai, 1996).

Os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade. O metanol, o DMSO, o glicerol, o etilenoglicol, a sacarose e a glicose são as combinações crioprotetoras mais comumente utilizadas. Contudo, todos são considerados moderadamente tóxicos (Harvey, 1983; Robertson et al., 1988).

O desempenho de um crioprotetor intracelular pode ser otimizado quando se associam crioprotetores de ação extracelular (Denniston et al., 2000). Segundo Woelders (1997), a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor extracelular causa desidratação nos embriões, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelulares. Esse fato é evidenciado por Farkas et al. (2001), que deixam

clara a necessidade da manutenção estrutural e funcional da camada fosfolipídica, quando a estrutura está sendo exposta a uma nova temperatura.

A sacarose, na concentração de 0,1 M, associada com metanol a 2,0 M, foi sugerida por Ahammad et al. (2002) como um meio de proteção eficiente para embriões de carpa comum *Cyprino carpio*, em estágio de vesícula optica, a temperaturas entre 4 e  $-2^{\circ}\text{C}$ , por 14 dias. Em outro trabalho com embriões da mesma espécie, Ahammad et al. (2003) detectaram que a concentração ideal do crioprotetor extracelular, no caso a sacarose, deve ser de 0,5 M, quando associado ao metanol, pois em concentrações mais elevadas ocorre ruptura do vitelo, resultando em mortalidade.

O efeito tóxico dos crioprotetores pode ser verificado em uma série de estudos realizados com embriões de diferentes espécies de peixes, muito embora alguns crioprotetores sejam mais tóxicos do que outros. Para embriões de *Sciaenops ocellatus*, Robertson et al. (1988) testaram glicerol, DMSO, etilenoglicol, metanol, sacarose e sal marinho e observaram que o metanol e o DMSO apresentaram menor efeito tóxico para a espécie do que os outros crioprotetores. Por outro lado, para embriões de *Scophthalmus maximus*, o DMSO apresentou menor toxicidade que o metanol e o etilenoglicol no estudo realizado por Cabrita et al. (2003).

Em embriões de *Brachydanio rerio*, Zhang & Rawson (1995) observaram que a  $0^{\circ}\text{C}$ , o metanol a 1,0 M foi mais eficiente em mantê-los viáveis por 18 horas (78% de sobrevivência) do que a concentração de 2,0 M. Entretanto, em uma temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ , para o mesmo tempo de manutenção, as concentrações de 2,0 M e 1,0 M mantiveram 95% e 33,3% de embriões viáveis, respectivamente. Embriões de *Cyprino carpio* expostos a soluções crioprotetoras de 1,0 M durante uma hora, à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , foram mais susceptíveis a toxicidade (Dinnyés et al., 1998).

A associação do etilenoglicol, na concentração de 7%, com a sacarose mostrou ser a melhor combinação de crioprotetores para preservação do vitelo e camadas germinativas de *Piaractus mesopotamicus* (Neves, 2008). Os crioprotetores intracelulares DMSO e etilenoglicol utilizados individualmente ou associados não mostraram a mesma capacidade de proteger o embrião do resfriamento do que quando utilizados junatamente com metanol. A combinação de 17,1% de sacarose e 9,0% de metanol foi mais eficiente para resfriar embriões de *Rhinelepis aspera* a -8°C durante seis horas (Fornari et al., 2008).

### **3.9 Sensibilidade dos embriões a temperaturas baixas**

A alta sensibilidade ao frio é um dos principais fatores que dificultam o congelamento de embriões de peixes (Stoss & Donaldson, 1983). Diante desse fato, diferentes autores vêm estudando os danos causados aos embriões de espécies de peixes submetidos a baixas temperaturas (Zhang & Rawson, 1995; Calvi & Maisse, 1998; Dinnyés et al., 1998; Liu et al., 2001).

A redução da temperatura da água de incubação pode ser suficiente para prolongar o tempo de incubação dos embriões de peixes, melhorando a sua aplicabilidade prática. Stonecypher Junior et al. (1994) observaram em diferentes espécies de trutas (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus clarki*) que a redução da temperatura de 7°C para 4°C possibilitou dobrar o tempo de incubação dos embriões.

A utilização de soluções que permitam proteger as células embrionárias de peixes a baixas temperaturas passa a ser importante para a sua preservação. Dinnyés et al. (1998) mostraram que os embriões de *C. carpio*, expostos durante uma hora à temperatura de 0°C e 4°C, apresentaram uma maior taxa de sobrevivência, quando submetidos aos crioprotetores glicerol e, em seguida, metanol e DMSO. Para embriões de *B. rerio* submetidos à temperatura de 0°C,



Zhang & Rawson (1995) observaram uma maior resistência ao resfriamento utilizando metanol com sacarose.

Streit Junior et al. (2007) elaboraram um protocolo de resfriamento com embriões de *Piaractus mesopotamicus*, expostos por, no mínimo, seis horas a -8°C. Esses embriões apresentaram menor sensibilidade ao frio quando submetidos a 9% de metanol e 17,1% de sacarose na solução crioprotetora, apresentando taxas de eclosão de larvas de 69,2%.

As injúrias causadas nos embriões de peixes devido às baixas temperaturas são, de acordo com Morris & Watson (1984): (a) as decorrentes diretamente do resfriamento ou pelo choque frio, em consequência do rápido resfriamento; (b) e as injúrias causadas indiretamente e independentemente da taxa de resfriamento e que vão se manifestar após períodos extensos em baixas temperaturas. Em *D. rerio*, Liu et al. (2001) puderam constatar esses tipos de fenômenos e observaram que, em estádios de desenvolvimento de 64 células, as injúrias nos blastômeros ocorreram em decorrência do tempo de exposição à baixa temperatura. Já no estágio de 50% de blástula até o aparecimento de três somitos, essas injúrias ocorreram devido à combinação dos fatores do rápido resfriamento e ao tempo de exposição à baixa temperatura.

O estágio de desenvolvimento embrionário dependente da sensibilidade ao frio tem sido reportado para muitas espécies de embriões, incluindo *Oncorhynchus mykiss* (Maddock, 1974; Haga, 1982), *Pimephales promelas* (Begovac & Wallace, 1986), *Cyprino carpio* (Jaoul & Roubaud, 1982; Roubaud et al., 1985; Magnus & Lubzens, 1995), *Danio rerio* (Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997) e *Carassius auratus auratus* (Liu et al., 1993).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desempenho reprodutivo das espécies de peixes nativas mantidas em cativeiro

O trabalho foi realizado na piscicultura da Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-Cemig), no município de Itutinga, Minas Gerais. Os dados foram coletados em sete períodos reprodutivos consecutivos, entre 2001 a 2008, nos meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro.

Os reprodutores foram mantidos na EAI-Cemig em oito viveiros de terra, com aproximadamente, 320 m<sup>2</sup>. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, em três arraçoamentos diários, com ração comercial extrusada de 8,0 mm de diâmetro com 28% de proteína bruta, entre os meses de março a agosto e com ração de 32%, entre os meses de setembro a fevereiro. Nas TABELAS 1 e 2, estão apresentados os períodos reprodutivos, a quantidade e o peso (média±desvio-padrão) das fêmeas utilizadas e a temperatura da água dos aquários onde foram mantidas durante a realização do estudo.

A seleção dos reprodutores foi baseada nos sinais externos que acompanham a maturação gonadal, de acordo com as características reprodutivas citadas por Woynarovich & Horváth (1989). A partir de novembro de cada ano, semanalmente, com auxílio de redes de arrasto, foram selecionados os reprodutores nos tanques escavados. Os animais selecionados foram pesados e mantidos separados por sexo em aquários de alvenaria com capacidade de 2.000 litros, com temperatura controlada e renovação contínua de água, em uma densidade de seis animais por aquário.

TABELA 1 Quantidade de fêmeas (Qt.), valores de média e desvio-padrão do peso das fêmeas em gramas (Grs.) e da temperatura da água (T °C) dos aquários da piscicultura da EAI – Cemig, nos períodos reprodutivos estudados.

Período Reprodutivo	Curimba		Pacu		Piracanjuba		T °C
	Qt.	Grs.	Qt.	Grs.	Qt.	Grs.	
2001/2002	43	1753,5±552,6	30	3403,3±502,7	14	1814,3±311,0	27,8±0,7
2002/2003	35	1882,9±630,8	26	3053,8±1111,8	5	1860,0±456,1	27,5±0,4
2003/2004	35	1745,7±545,2	9	3066,7±380,8	4	1400,0±81,6	27,4±0,5
2004/2005	41	2036,6±619,2	16	2493,8±482,3	19	1500,0±129,1	27,8±0,4
2005/2006	65	1755,4±607,8	9	3066,7±380,8	14	1450,0±217,5	27,4±0,7
2006/2007	47	1829,8±838,7	13	3053,8±672,8	6	1683,3±204,1	27,7±0,6
2007/2008	73	1516,4±774,8	15	2893,3±882,7	12	1658,3±331,5	27,4±0,7

TABELA 2 Quantidade de fêmeas (Qt.), valores de média e desvio-padrão do peso das fêmeas em gramas (Grs.) e da temperatura da água (T °C) dos aquários da piscicultura da EAI – Cemig, nos meses estudados.

Período Reprodutivo	Curimba		Pacu		Piracanjuba		T °C
	Qt.	Grs.	Qt.	Grs.	Qt.	Grs.	
Novembro	59	2078±587,2	39	3156,0 ± 913,5	9	1656,0±444,7	27,0±0,6
Dezembro	116	1763,0±711,1	33	3300,0 ± 815,0	40	1653,0±304,6	28,0±0,7
Janeiro	147	1640,0±670,2	44	2752,0 ± 570,3	21	1543,0±166,0	28,0±0,5
Fevereiro	17	167,4±675,9	6	2567,0 ± 488,5	4	1425,0±170,7	27,5±0,3

A indução hormonal foi realizada pelo método de hipofiseção (Ihering, 1937), utilizando extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), em duas doses para as fêmeas, sendo uma dose preparatória, para a maturação total, e uma dose final, para liberação dos gametas., por meio de injeções intramusculares (0,5 e 5,0 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal), com intervalo entre as doses de 12 horas (TABELA 3). Os machos receberam dose única de EBHC, no momento da segunda aplicação nas fêmeas (0,5 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal). Para pacu e piracanjuba, uma dose prévia (0,25 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal) foi aplicada nos reprodutores, com objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva, 24 horas antes da dose preparatória. O EBHC foi preparado segundo metodologia da EAI-Cemig, descrita por Silva (2000).

TABELA 3 Concentração, em miligramas por quilograma de fêmea (mg.kg<sup>-1</sup>), e intervalos entre as doses, em horas (h), de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) utilizada na indução hormonal de curimba, pacu e piracanjuba.

	<b>Dose Prévia</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Dose Preparatória</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Dose Final</b>
<b>Fêmeas</b>	0,25 mg.kg <sup>-1</sup>	24h	0,5 mg.kg <sup>-1</sup>	12h	5,0 mg.kg <sup>-1</sup>
<b>Machos</b>	0,25 mg.kg <sup>-1</sup>	24h	-	12h	0,5 mg.kg <sup>-1</sup>

Para a extrusão dos ovócitos e a coleta de sêmen, os animais foram retirados do aquário, envolvidos em toalhas úmidas e apoiados sobre a mesa de manipulação. Em seguida, a papila urogenital e a nadadeira anal foram secas com toalhas de papel, evitando o contato dos gametas com a água.

Vários fatores podem influenciar na reprodução em cativeiro das espécies nativas, entre eles destacam-se os fatores ambientais, o manejo dos

reprodutores e principalmente o tipo de substância utilizada na indução da reprodução. Para avaliar a influência desses fatores na reprodução em cativeiro de curimba, foi determinada a eficiência reprodutiva pela relação entre o número de fêmeas selecionadas e o número de fêmeas que efetivamente desovaram.

A fertilização foi feita pelo método a “seco”. O tempo da extrusão foi estimado pelo cálculo da diferença entre a hora da segunda aplicação do EBHC e a hora exata da desova de cada fêmea. Todas as desovas foram pesadas, obtendo, assim, o peso dos ovócitos extruídos em gramas.

A incubação dos ovos foi feita em incubadoras de 200 litros, em forma de funil, com circulação constante de água e temperatura controlada. A taxa de fertilização foi mensurada, aproximadamente, oito horas após a fertilização dos gametas, logo após o estágio de fechamento do blastóporo, por meio da relação entre o número de ovos bons de uma amostra e o total de ovos contados, multiplicado por cem.

$$TX = OB / TO * 100 \text{ onde:}$$

*TX: Taxa de Fertilização;*

*OB: Ovos bons;*

*TO: Total de ovos contados na amostra.*

A fertilidade inicial corresponde ao número total de ovos extruídos, levando em consideração que a curimba, o pacu e a piracanjuba possuem aproximadamente 1.300, 1.400 e 1.300 ovos por grama de desova, respectivamente (Murgas et al., 2003).

$$FI = PD \times (1.300 \text{ ou } 1.400) \text{ onde:}$$

*FI: Fertilidade Inicial;*

*PD: Peso da desova.*

A fertilidade inicial relativa foi determinada pela relação entre o número de ovócitos extruídos por grama de fêmea. A fórmula que expressa essa relação é:

$$FIR = FI / PC \text{ onde:}$$

*FIR: Fertilidade Inicial Relativa;*

*FI: Fertilidade Inicial;*

*PC: Peso corporal da fêmea em gramas.*

A fertilidade final corresponde à estimativa de larvas produzidas, e foi determinada pelo número de ovócitos extruídos a taxa de fertilização, o que corresponde ao número de ovócitos fertilizados.

$$FF = FI * TX \text{ onde:}$$

*FF: Fertilidade Final ou larvas produzidas;*

*FI: Fertilidade Inicial;*

*TX: Taxa de Fertilização.*

A fertilidade final relativa foi determinada pela relação entre número de ovócitos fertilizados por grama de fêmeas, pela fórmula:

$$FFR = FF / PC \text{ onde:}$$

*FFR: Fertilidade Final Relativa;*

*FF: Fertilidade Final;*

*PC: Peso corporal da fêmea em gramas.*

Os dados de pluviosidade foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), através do endereço [www.inmet.com.br](http://www.inmet.com.br).

As variáveis foram submetidas a uma análise de variância utilizando o procedimento ANOVA para Modelos Lineares Generalizados, aplicando-se Tukey ( $p < 0,05$ ) para os períodos reprodutivos e meses de estudo. Para comparação entre as variáveis e a pluviosidade, foi utilizada a análise de regressão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Minitab™ (Campos, 2003).

#### **4.2 Resfriamento de embriões de curimba**

Os experimentos foram conduzidos na Piscicultura da Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-Cemig), no município de Itutinga, Minas Gerais, nas piracemas de 2008/2009 e 2009/2010, durante os meses de novembro, dezembro e janeiro.

Foram selecionados cinco casais de curimba *Prochilodus lineatus* do plantel de reprodutores da estação ambiental. Os reprodutores foram selecionados para o experimento de acordo com as características reprodutivas citadas por Woynarovich & Horváth (1989). Os machos, aptos à reprodução, liberavam algumas gotas de sêmen sob leve massagem abdominal. As fêmeas, aptas para a indução hormonal da desova, apresentavam o abdômen desenvolvido e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e o orifício genital ligeiramente aberto.

Após a seleção, os reprodutores foram marcados com fios de linha de cores diferentes, suturado na altura do primeiro raio da nadadeira dorsal. Durante a marcação, os reprodutores foram pesados individualmente para se calcular a dose de hormônio aplicada. Ministrou-se  $1,0 \text{ mL.kg}^{-1}$  de acetato de buserelina, dividido em duas doses (25 e 75%), através de aplicação intramuscular, na base da nadadeira dorsal. Em seguida, os reprodutores foram

aconicionados em aquários de alvenaria com capacidade para 2000L, com temperatura controlada (28°C) e renovação contínua de água.

A desova ocorreu entre 8 e 9 horas após a segunda aplicação hormonal; os reprodutores foram retirados dos aquários, envolvidos em toalhas úmidas e apoiados sobre uma mesa de manipulação. Em seguida, a papila urogenital e a nadadeira anal foram enxugadas com toalhas de papel, evitando o contato dos gametas com a água. Os gametas foram extruídos por meio de massagens manuais na parede celomática, no sentido crânio-caudal.

A desova de cada fêmea foi realizada em recipiente plástico previamente limpo e seco. O sêmen de cada macho de curimba foi utilizado para a fertilização de cada fêmea, formando, assim, diferentes casais. A seguir, adicionou-se água e foi realizada a mistura dos gametas através de leve agitação, promovendo trocas de água consecutivas para a melhor ativação dos gametas e posterior fertilização. Posteriormente à fertilização, os ovos foram colocados em incubadoras do tipo cônicas, de 200 litros (FIGURA 8), com fluxo de água contínuo e temperatura controlada (27°C).





FIGURA 8 Incubadora do tipo funil, com capacidade de 200 litros, utilizada para o desenvolvimento embrionário.

Quando 80% dos ovos apresentavam-se em estágio de fechamento do blastóporo, com 90% de epibolia (aproximadamente 9 horas de incubação), observados em estereomicroscópico, colheu-se uma amostra de ovos viáveis das incubadoras, sendo descartados os ovos gorados (FIGURA 9). Após a drenagem do excesso de água com uma peneira, os ovos foram mergulhados nos diferentes tratamentos.

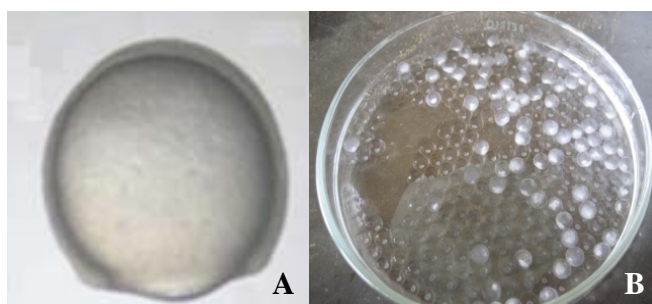


FIGURA 9 Embrião de curimba em 90% de epibolia (A) e detalhe de ovos gorados e ovos bons (B).

Nesse mesmo momento, verificou-se a taxa de fertilização inicial, em que foram contadas amostras dos ovos das incubadoras e foi considerada segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de fertilização} = \left[ \frac{n^{\circ} \text{ de ovos viáveis}}{(n^{\circ} \text{ de ovos viáveis} + n^{\circ} \text{ de ovos inviáveis})} \right] \times 100.$$

As soluções testadas formam o metanol e o DMSO, nas concentrações de 5; 7,5; 10 e 12,5% e a adição de um crioprotetor extracelular, a sacarose 0,5M. As soluções foram previamente preparadas para que houvesse a estabilização da solução. Também foram testadas e consideradas, como tratamentos-controle, solução contendo sacarose 0,5M e outra apenas com água. Foram testados quatro tempos de resfriamento, sendo 2, 4, 6 e 8 horas de permanência no refrigerador, considerando uma temperatura de 4°C, em um total de 40 tratamentos (FIGURA 10).

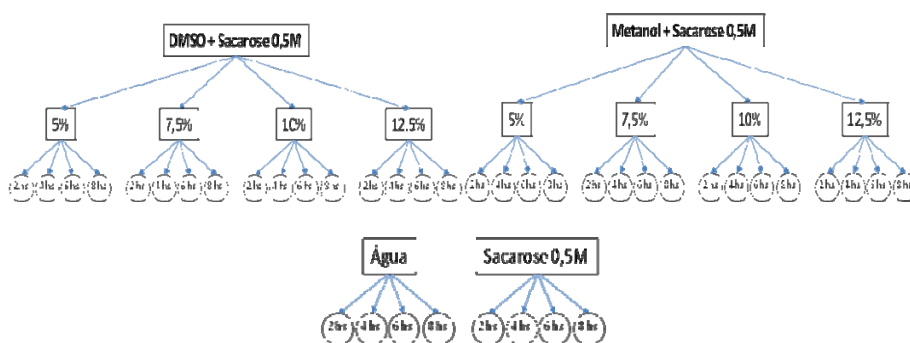


FIGURA 10 Esquema dos tratamentos testados no processo de resfriamento de embriões de curimba, sendo cinco repetições para cada tratamento.

Com uma pequena peneira plástica, colheram-se em média 100 embriões, que foram colocados em copos plásticos com 20 ml das soluções crioprotetoras testadas. Os copos plásticos contendo os embriões foram levados ao refrigerador. Após os tempos determinados de resfriamento, os embriões de cada tratamento foram retirados, drenando a solução crioprotetora e imediatamente, levados às incubadoras experimentais para completar o seu desenvolvimento, até ocorrer a eclosão (FIGURA 11).

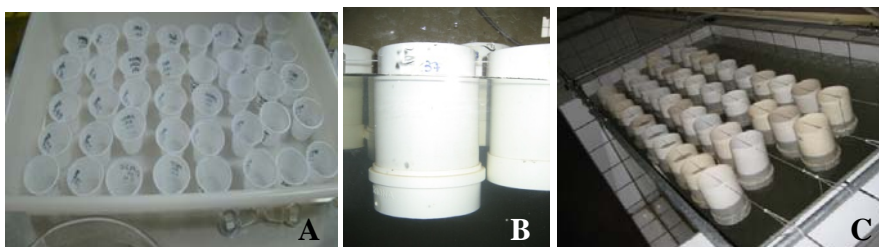


FIGURA 11 Copos plásticos contendo os embriões durante o resfriamento (A). Incubadoras experimentais de cano de PVC teladas no fundo (A e B), com capacidade de aproximadamente um litro (Maria, 2005; Miliorini, 2006).

A partir da eclosão dos ovos, estabeleceu-se um período de duas horas para avaliação dos embriões e das larvas. A avaliação consistiu em definir o número de ovos gorados e a qualidade das larvas que eclodiram viáveis. Consideraram-se larvas viáveis aquelas que apresentavam movimentação regular após a eclosão e os ovos gorados foram aqueles em que os embriões não evoluíram a larvas (FIGURA 12).

A taxa de eclosão também foi mesurada, contando-se o número de ovos gorados e o total de larvas que eclodiram, sendo considerada segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de eclosão} = [n^{\circ} \text{de larvas} / (n^{\circ} \text{de larvas} + n^{\circ} \text{de ovos gorados})] \times 100$$



FIGURA 12 Larvas de curimba viáveis e ovos gorados, respectivamente.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em um fatorial de 2x4x4, sendo dois crioprotetores intracelulares: metanol e DMSO em quatro concentrações (5; 7,5; 10 e 12,5%), com inclusão de sacarose 0,5M como crioprotetor extracelular, expostos em quatro tempos de resfriamento (2, 4, 6 e 8 horas). Dois tratamentos-controle 2x4 foram avaliados, um contendo sacarose 0,5M e outro utilizando apenas água. Ao todo foram testados 40 tratamentos, em 5 repetições e cada tratamento foi conduzido, independentemente um do outro, considerando o casal como unidade experimental.

As variáveis foram submetidas a uma análise de variância pelo procedimento ANOVA para Modelos Lineares Generalizados, aplicando-se Tukey ( $p < 0,05$ ) para as soluções crioprotetoras, concentrações e temperaturas de exposição. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Minitab 13.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desempenho reprodutivo de espécies de peixes nativas

#### 5.1.1 Curimba

A eficiência reprodutiva é expressa pela diferença entre as fêmeas selecionadas e as que desovaram. Neste estudo, a eficiência da indução hormonal de curimba nos sete períodos reprodutivos estudados variou entre 76 a 97% (FIGURA 1). Esse resultado foi semelhante ao encontrado para *Prochilodus marggravii* 70 a 92% (Sato et al., 1996c), *Prochilodus costatus* 76% e *Prochilodus argenteus* 77,9% (Sato et al., 2003), utilizando o mesmo indutor hormonal. O fato de apresentar uma alta eficiência reprodutiva indica que a reprodução de curimba em cativeiro pode ser realizada com sucesso, juntamente com o método utilizado para a seleção dos reprodutores (Sato et al., 2000, 2003; Sampaio & Sato, 2009).

Nos períodos reprodutivos de 2005/2006 e 2006/2007, foram observadas porcentagens abaixo da média para eficiência reprodutiva de curimba, além das maiores variações nos dados estudados (FIGURA 13). As espécies de peixes que se reproduzem durante o período de piracema, quando não encontram condições adequadas para completar o ciclo reprodutivo, entram em um processo de regressão dos gametas. Esse fato é verificado neste estudo, em que o mês de fevereiro apresentou a menor eficiência reprodutiva ( $p < 0,05$ ), em comparação com os demais meses de estudo (FIGURA 13).

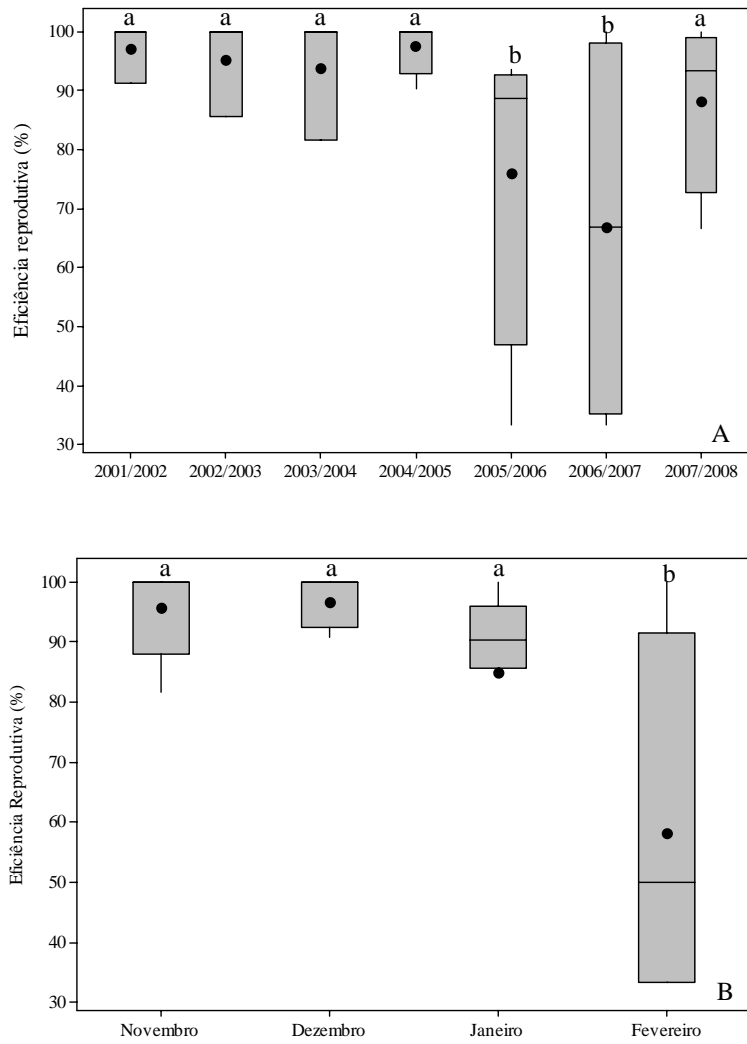


FIGURA 13 Boxplot da eficiência reprodutiva de curimba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O ciclo reprodutivo dos peixes teleósteos apresenta uma estreita relação com as variações de temperatura e com o regime de chuvas (Barbieri et al., 2000; Godinho, 2007). Porém, essa relação não foi observada neste trabalho, a comparação entre a média de pluviosidade (INMET), durante o estudo, e a eficiência reprodutiva não foi significativa. Provavelmente, a menor eficiência reprodutiva pode estar relacionada à qualidade dos reprodutores selecionados, uma vez que não há um controle da utilização dos reprodutores na piscicultura de EAI- Cemig.

Assim como para a eficiência reprodutiva, o tempo da desova não apresentou relação significativa com a média de pluviosidade (INMET). Observou-se que nos períodos reprodutivos avaliados, o tempo de extrusão das fêmeas variou de  $7:36 \pm 1:17$  a  $8:59 \pm 2:16$  horas, e segundo Sato et al. (2003), esse intervalo encontra-se dentro da faixa de tempo de desova para *Prochilodus* sp. Pereira et al. (2009) obtiveram um tempo de extrusão semelhante para a mesma espécie.

A temperatura da água em que os reprodutores se encontram pode influenciar o tempo de extrusão dos gametas. Sato et al. (2003) salientam que, estando a água com temperatura abaixo de  $23^{\circ}\text{C}$ , os peixes não respondem positivamente à indução hormonal, mesmo com a aplicação de doses extras de hormônio. Melhores resultados foram obtidos a temperaturas mais elevadas (Sato et al., 1996a,b,c). Esse fato não foi observado neste estudo, uma vez que a temperatura encontrava-se, em média, entre  $27^{\circ}$  e  $28^{\circ}\text{C}$ .

Há uma relação entre o peso corporal das fêmeas e o peso da desova, pois os dois ovários maduros podem representar em torno de 27% do peso corporal (Godoy, 1975). Sato et al. (1996c) também encontram essa relação para *Prochilodus affinis*, sendo essa linear e positiva. Na FIGURA 14 verifica-se a relação significativa entre o peso da desova e o peso corporal das fêmeas

estudadas, confirmando a influência dos reprodutores no sucesso da reprodução artificial.

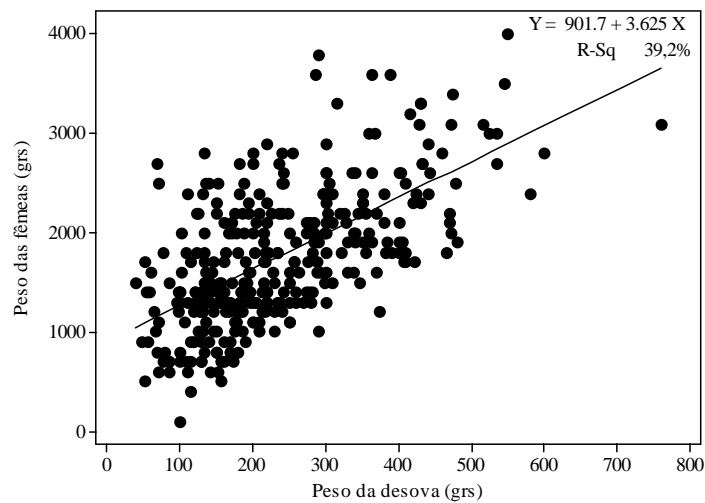


FIGURA 14 Regressão entre o peso corporal das fêmeas e o peso da desova ( $p < 0,05$ ).

O maior peso da desova foi observado no período reprodutivo 2004/2005, seguido pelo período reprodutivo 2003/2004 (FIGURA 15). Observou-se que a curimba não apresentou padrão reprodutivo durante o período de estudo. O peso da desova foi significativamente menor no mês de fevereiro ( $p < 0,05$ ), assim como para a eficiência reprodutiva, demonstrando que esse não o mês mais favorável para o manejo reprodutivo da espécie.



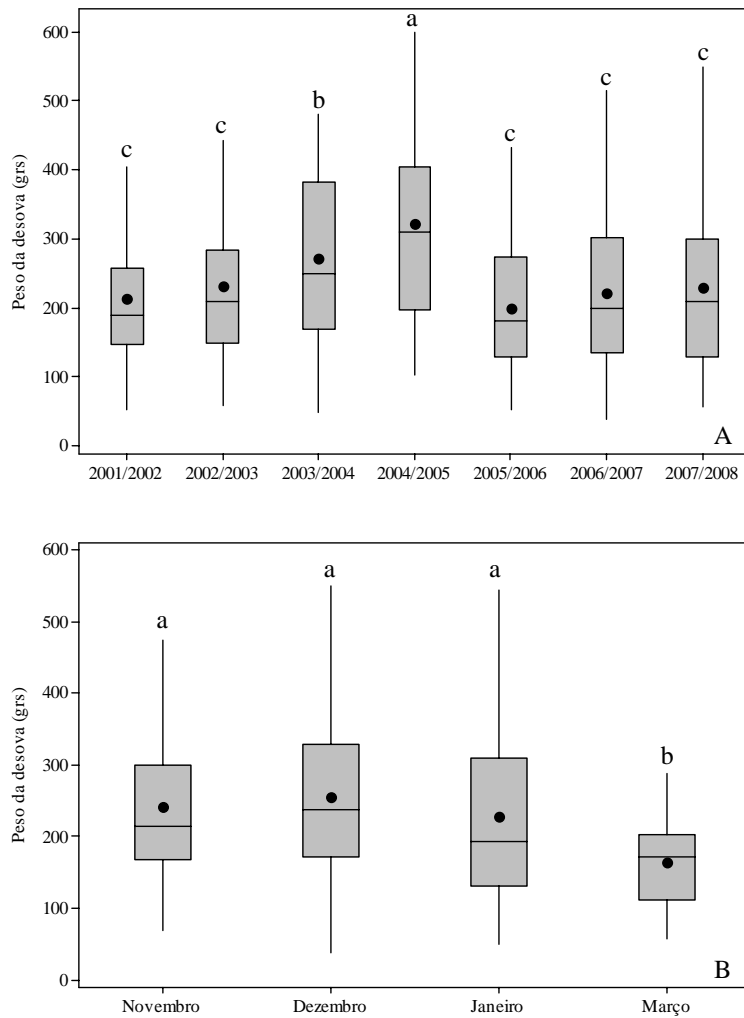


FIGURA 15 Boxplot dos valores de peso da desova em gramas (grs.) de curimba durante sete períodos reprodutivos (A) e meses estudados (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).

A fertilidade inicial corresponde ao número de ovócitos liberados pela fêmea à extrusão. Na FIGURA 16 estão apresentados os resultados de fertilidade inicial. No período reprodutivo 2004/2005, verifica-se os maiores valores para esse parâmetro avaliado, seguido do período de 2003/2004. Com relação aos meses de estudo, no mês de fevereiro foram observados os menores valores de fertilidade inicial, acompanhando os resultados de peso da desova.

Neste estudo, a fertilidade inicial para *Prochilodus lineatus* foi de  $260.020 \pm 112.031$  a  $418.822 \pm 191.928$ . No passo que Sato et al. (2003) obtiveram valores de fertilidade inicial de  $2.364.000 \pm 1.637.000$  e de  $3.295.000 \pm 1.414.000$ . As espécies consideradas migradoras, ovos livres e que não apresentam cuidado parental apresentam valores maiores de fertilidade inicial, sendo característica das espécies do gênero *Prochilodus*.

A fecundidade relativa, calculada em relação ao peso corporal, é um valor indicativo da capacidade reprodutiva individual de peixes (Shatunovskiy, 1988). A fertilidade inicial relativa mede a relação entre a produção de ovócitos e o peso das fêmeas. Os resultados encontrados neste estudo mostram-se significativos para a avaliação da reprodução das espécies nativas mantidas em cativeiro.

Observou-se que a fertilidade inicial relativa apresentou um padrão de dois períodos, com valores menores (2001/2002 e 2002/2003), seguidos de dois períodos com valores maiores (2003/2004 e 2004/2005), repetindo esse padrão nos próximos três anos de estudo (FIGURA 17). Os meses de novembro e fevereiro apresentaram os menores valores para esse parâmetro. Os resultados de fertilidade inicial relativa deste estudo foram de  $154,9 \pm 661,0$  a  $298,0 \pm 95,3$  para *Prochilodus lineatus*, ao passo que para *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus* foi de  $264 \pm 39$  e  $200 \pm 30$ , respectivamente (Sato et al., 2003).

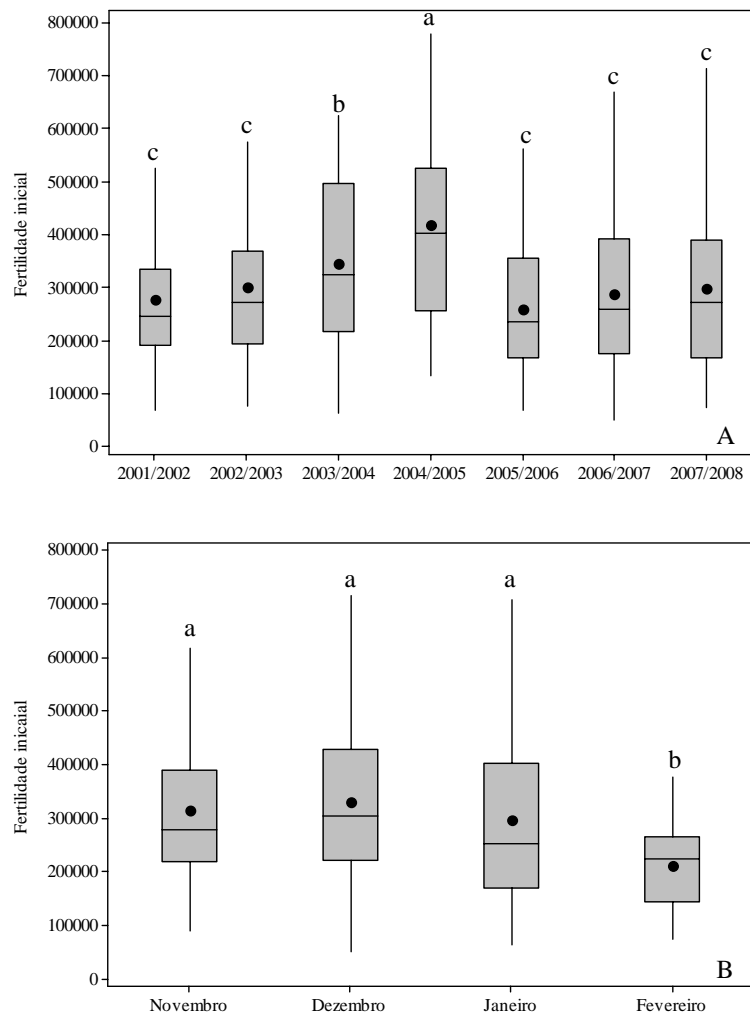


FIGURA 16 Boxplot da fertilidade inicial de curimba durante dos períodos reprodutivos (A) e meses (B) de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).

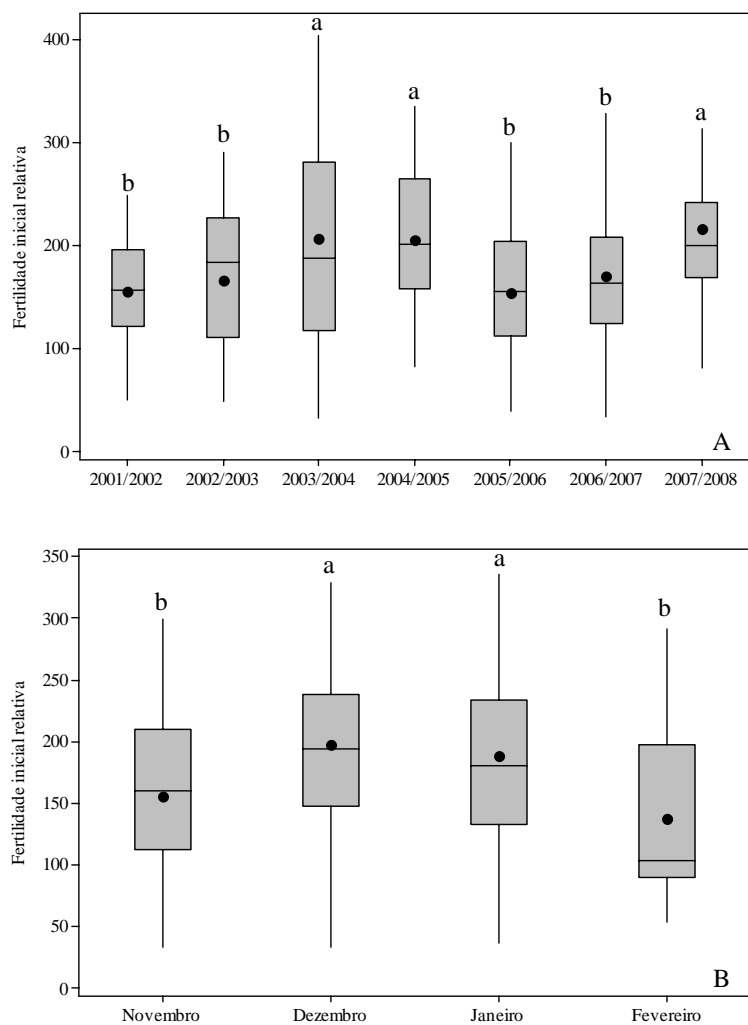


FIGURA 17 Boxplot da fertilidade inicial relativa (FIR) de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).

A taxa de fertilização é um indicador seguro da qualidade dos ovócitos, do sêmen, do processo de fertilização e da embriogênese, além de estar diretamente relacionada aos fatores abióticos (Koger et al., 1999). Na FIGURA 18 está representada a relação entre a pluviosidade (INMET) e a taxa de fertilização, sendo esta linear e positiva ( $p < 0,05$ ).

Neste estudo observa-se as maiores taxas de fertilização de curimba no período reprodutivo de 2007/2008, ou seja,  $66,9 \pm 32,2\%$ . Sato et al. (2003) obtiveram 71,0 e 68,8% de taxa de fertilização para *Prochilodus costatus* e *Prochilos argenteus*, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os meses de estudo. Esses resultados demonstram que, durante o período de estudo, a espécie encontrou condições favoráveis para sua reprodução, indicando uma boa adaptação às condições de cultivo em cativeiro.

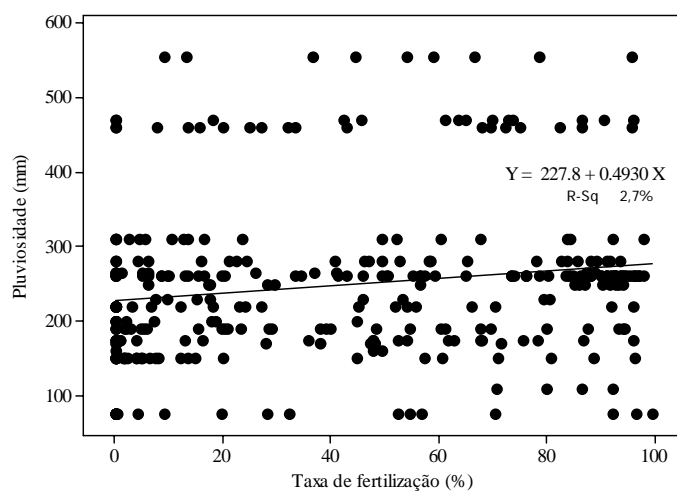


FIGURA 18 Regressão entre a pluviosidade e a taxa de fertilização de curimba.

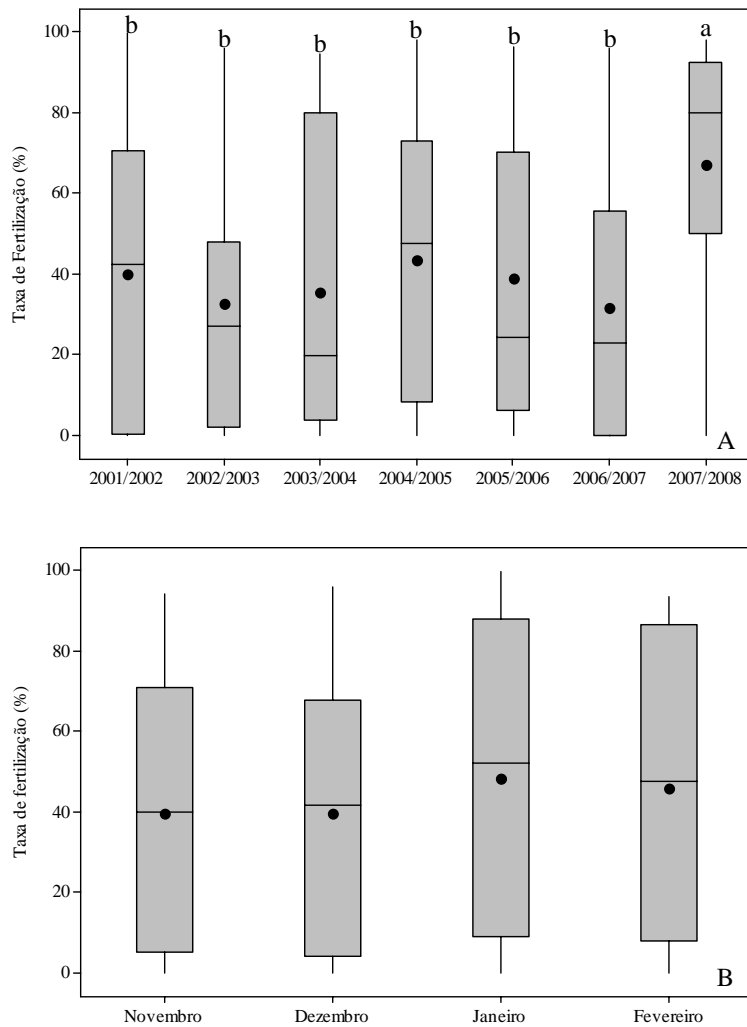


FIGURA 19 Boxplot da taxa de fertilização de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).

A fertilidade final corresponde ao número de ovos fertilizados e, conseqüentemente, ao número de larvas produzidas no processo de reprodução artificial de peixes. Esse parâmetro está diretamente relacionado à taxa de fertilização dos ovos. Neste estudo, os períodos de 2004/2005 e 2007/2008 apresentaram os maiores valores para fertilidade final. Não foi observada diferença significativa entre os meses de estudo (FIGURA 20).

Sato et al. (2003) obtiveram  $1.717.000 \pm 1.292.000$  e  $2.401.000 \pm 1.031.000$  de fertilidade final para *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus*, respectivamente. Para *Prochilodus lineatus*, os resultados de fertilidade final, neste estudo, foram de  $78.084,7 \pm 96.625,4$  a  $180.195,4 \pm 122.432,1$ .

Quando se avaliou a fertilidade final relativa, observou-se que o período reprodutivo de 2007/2008 apresentou os maiores valores desse parâmetro, ou seja,  $146,8 \pm 142,1$ . A fertilidade final relativa avalia a relação entre o número de larvas produzidas em relação ao peso corporal das fêmeas. Assim como para fertilidade final, não houve diferença significativa para a fertilidade final relativa (FIGURA 21). Para *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus*, foram obtidos valores de  $191 \pm 32$  e  $146 \pm 28$ , respectivamente (Sato et al., 2003).

Esse resultado demonstra um possível aprimoramento no manejo reprodutivo da espécie em cativeiro, promovendo, assim, o aumento da produção de larvas de curimba. O estudo dos padrões reprodutivos dos peixes conduz a uma melhor compreensão acerca da utilização dos recursos e das necessidades ambientais das espécies, fundamentais para a sua manutenção e sobrevivência.

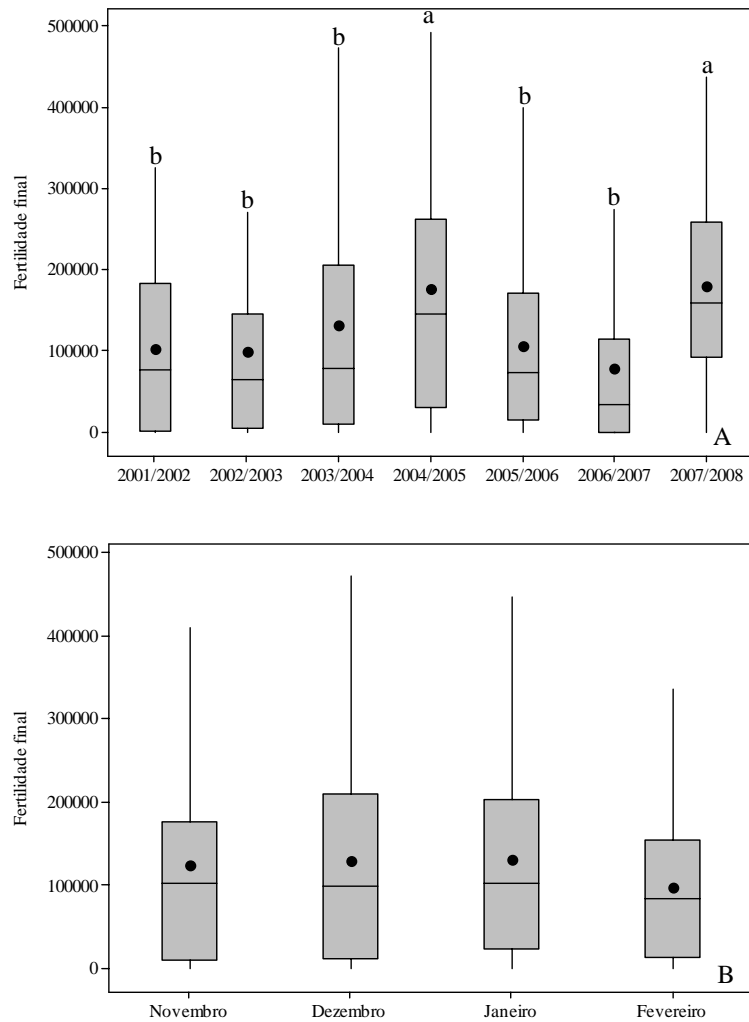


FIGURA 20 Boxplot da fertilidade final (FF) de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).



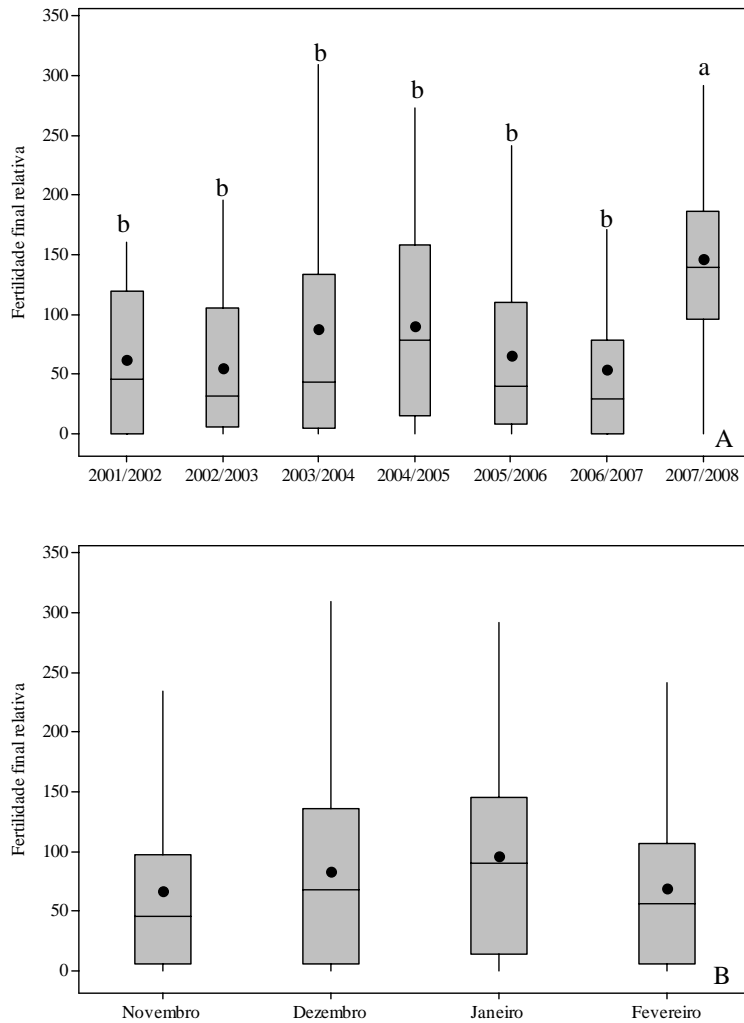


FIGURA 21 Boxplot da fertilidade final relativa (FFR) de curimba durante os períodos reprodutivos (A) e meses de estudo. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).

### 5.1.2 Pacu

Nos períodos reprodutivos de 2003/2004, 2006/2007 e 2007/2008, foram observadas porcentagens abaixo da média para eficiência reprodutiva de pacu (FIGURA 22), assim como observado para curimba, o mês de fevereiro apresentou a menor eficiência reprodutiva, em comparação com os demais meses de estudo (FIGURA 22). A eficiência reprodutiva de pacu observada foi, em média, de 84,6%. Romagosa et al. (1990) obtiveram resultado semelhante: 84,0% de resposta positiva na indução da desova da mesma espécie.

A aplicação hormonal de uma dose prévia de hormônio antes de iniciar o tratamento convencional de indução hormonal possibilita maior produção qualitativa e quantitativa de gametas (Zaniboni Filho & Barbosa, 1996). Essa capacidade de estimular o desenvolvimento gonadal pode auxiliar a reduzir as diferenças individuais do estágio de maturação gonadal no momento da seleção, possibilitando uma maior homogeneidade nos reprodutores. Uma avaliação do efeito da dose prévia sobre o tratamento convencional em tanbaqui *Colossoma macropomum* revelou que a essa prática possibilitou um incremento superior a 80% sobre o número de larvas produzidas. Essa metodologia foi utilizada neste estudo, resultando em uma alta eficiência reprodutiva de pacu mantidos em cativeiro.

Em cativeiro, supressões fisiológicas no processo reprodutivo podem ocorrer devido às restrições de fatores ambientais, suprimindo, de alguma forma, a ação dos hormônios indutores da desova, pois, embora haja o desenvolvimento gonadal, o processo de maturação final não ocorre, por causa dessas restrições (Zoar & Mylonas, 2001). Para pacu, não foi observada relação significativa entre a eficiência reprodutiva e a pluviosidade (INMET). Provavelmente, eficiência reprodutiva pode estar relacionada à qualidade dos reprodutores selecionados,

uma vez que não há um controle da utilização dos reprodutores na piscicultura de EAI- Cemig.

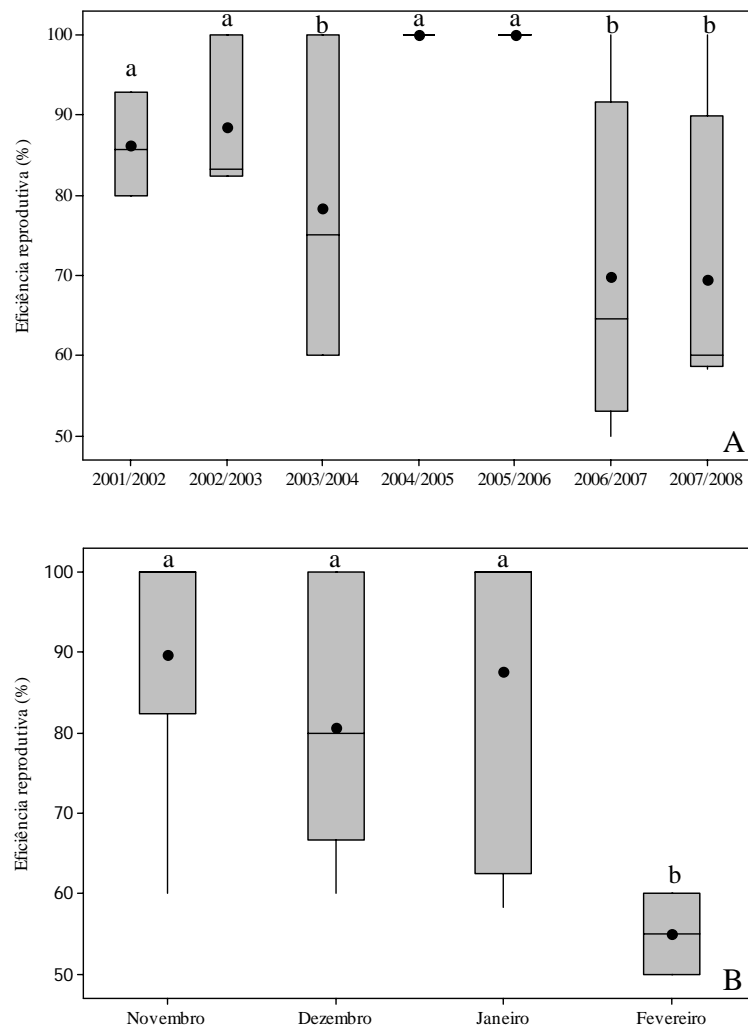


FIGURA 22 Boxplot da eficiência reprodutiva de pacu nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,08$ ).

É interessante conhecer o momento certo da desova dos peixes em condições de cativeiro, o que permitir um melhor acompanhamento das fases iniciais de desenvolvimento, de modo a aumentar a produção de alevinos (Baldisserotto, 2002). A desova em peixes ocorre, em média, 10 a 14 horas (dependendo da temperatura) depois de completado o processo de indução hormonal (Andrade & Yasyi, 2003).

Segundo Murgas et al. (2003) ,o tempo de desova para pacu é, em média, de 9 a 12 horas, a 25°C; e para Romagosa (1991) e Bernardino & Lima (1999), é de 10 horas, após a última aplicação hormonal. Resultados semelhantes foram observados neste estudo, que também variou em média de 9 a 12 horas. A FIGURA 23 apresenta a relação positiva entre o tempo de desova e a pluviosidade ( $p < 0,05$ ); isso demonstra a influência dos fatores ambientais sobre esse parâmetro, mesmo em condições de cativeiro.

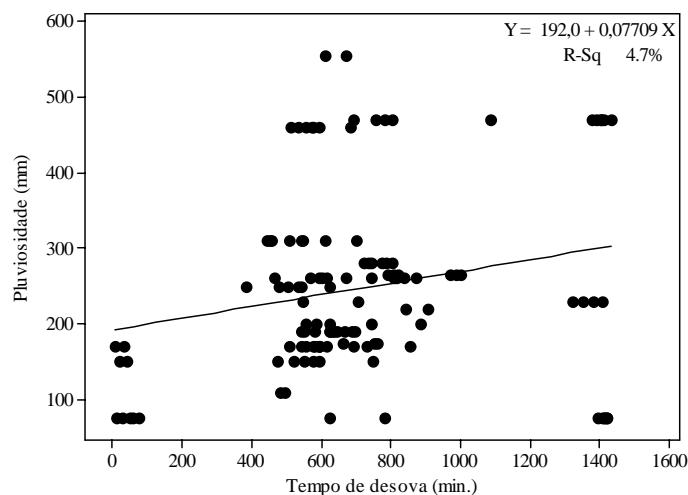


FIGURA 23 Regressão significativa entre o tempo de desova e a pluviosidade para pacu.

O peso da desova e o peso corporal das fêmeas de pacu utilizadas neste estudo apresentam uma relação positiva, demonstrando que quanto maior o peso da fêmea selecionada, maior será o peso da desova, após a indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (FIGURA 24). Godoy (1975) confirma que há uma relação entre o peso corporal das fêmeas e o peso da desova, pois os ovários, quando maduros, podem ocupar 1/3 da cavidade celomática, influenciando no peso corporal das fêmeas durante o período reprodutivo.

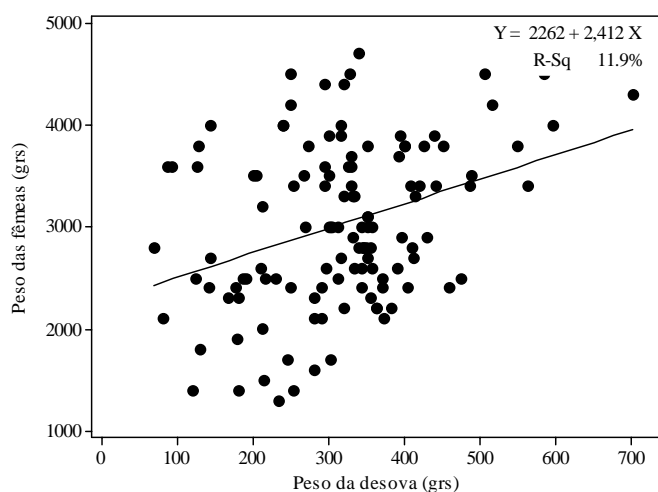


FIGURA 24 Regressão significativa entre o tempo de desova e a pluviosidade para pacu.

A média do peso da desova de pacu variou de  $374,4 \pm 35,1$  a  $240,1 \pm 103,1$ g para os períodos reprodutivos de estudo. Os resultados apresentados na FIGURA 25 demonstram um padrão, em que se tem um período (2001/2002) com valores do peso da desova abaixo de 300g, seguido de dois anos, consecutivos (2002/2003 e 2003/2004), com valores acima de 300g. Esse padrão foi observado duas vezes durante o período de estudo.

O padrão reprodutivo apresentado pelo pacu verificado neste estudo não está relacionado aos parâmetros ambientais, como a pluviosidade, provavelmente pode estar associado à biologia reprodutiva da própria espécie e à qualidade do plantel de reprodutores. Quando se comparam os meses de estudo, observa-se que o mês de fevereiro apresentou a menor média ( $196,0 \pm 86,7$ ) para o peso da desova (FIGURA 25).

A fertilidade inicial corresponde ao número total de ovos extruídos, levando em consideração que o pacu possui aproximadamente 1.400 ovos por grama de desova (Murgas et al., 2003). Assim como para o peso da desova, a fertilidade inicial apresentou o mesmo padrão, em que se observou o primeiro ano (2001/2002) com valores abaixo de 420.000 ovos, seguido de dois anos, consecutivos (2002/2003 e 2003/2004), com valores acima de 470.000 ovos. Este padrão foi observado duas vezes durante o período de estudo. O mês de fevereiro apresentou a menor média de produção de ovos ( $273.700 \pm 121.514,0$ ), comparando com os meses de novembro, dezembro e janeiro (FIGURA 26).

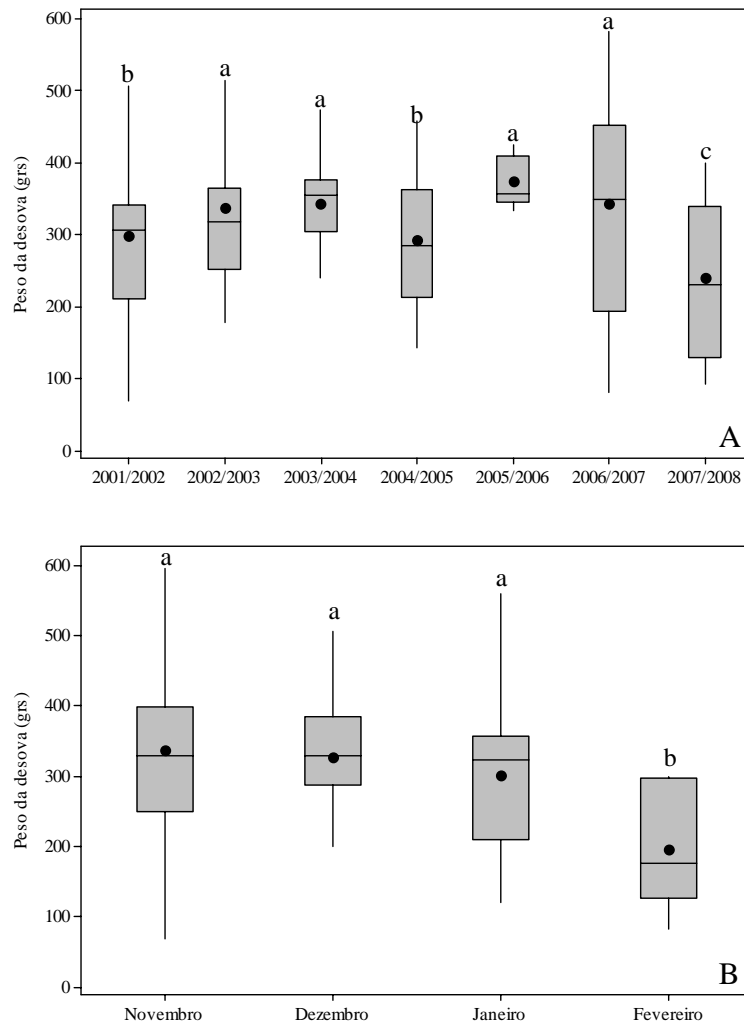


FIGURA 25 Boxplot do peso da desova em gramas de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Neste estudo, a fertilidade inicial de pacu, mantido em cativeiro, variou entre  $336.186,7 \pm 144.324,1$  a  $515.755,6 \pm 49.606,0$  ovos. Costa & Mateus (2009) obtiveram médias de  $258.099 \pm 178.523$  a  $887.674 \pm 601.040$ , para a mesma espécie, em ambiente natural. Esses resultados demonstram uma maior variação desse parâmetro para a espécie em ambiente natural. A época mais favorável do ano para a reprodução de peixes é aquela em que o ambiente oferece as condições mínimas necessárias para o desenvolvimento das fases iniciais e juvenis, maior disponibilidade de alimentos e proteção contra uma variedade de predadores.

Segundo Costa & Mateus (2009) observaram uma relação linear positiva entre a fecundidade e as variáveis, comprimento, massa corporal e massa gonadal de pacu. Vários estudos têm identificado uma relação positiva entre o número de oócitos e tamanho do peixe (Magalhães et al., 2003; Brickle et al., 2005; Adite et al., 2006; Mazzoni & Silva, 2006; Moffett et al., 2006; Sato et al., 2006b; Tarkan, 2006; Martins-Queiroz et al., 2008). A fertilidade inicial está diretamente relacionada ao peso da desova; uma vez que o peso da desova apresenta uma relação positiva com o peso corporal da fêmea, pode-se afirmar que a fertilidade inicial também possui essa relação. Isso demonstra que os resultados observados neste estudo são semelhantes aos encontrados na literatura consultada.

A fertilidade inicial relativa mede a relação entre a produção de ovócitos e o peso corporal das fêmeas. Os valores observados para este estudo estão apresentados na FIGURA 27, em que a média variou entre  $117,4 \pm 39,1$  a  $185,4 \pm 63,8$ . Os períodos reprodutivos de 2001/2002 e 2007/2008 apresentaram médias inferiores às observadas para os demais períodos. A fertilidade inicial relativa, calculada em relação ao peso corporal, é um valor indicativo da



capacidade reprodutiva individual de peixes (Shatunovskiy, 1988). Não houve diferença significativa quanto se comparam os meses de estudo.

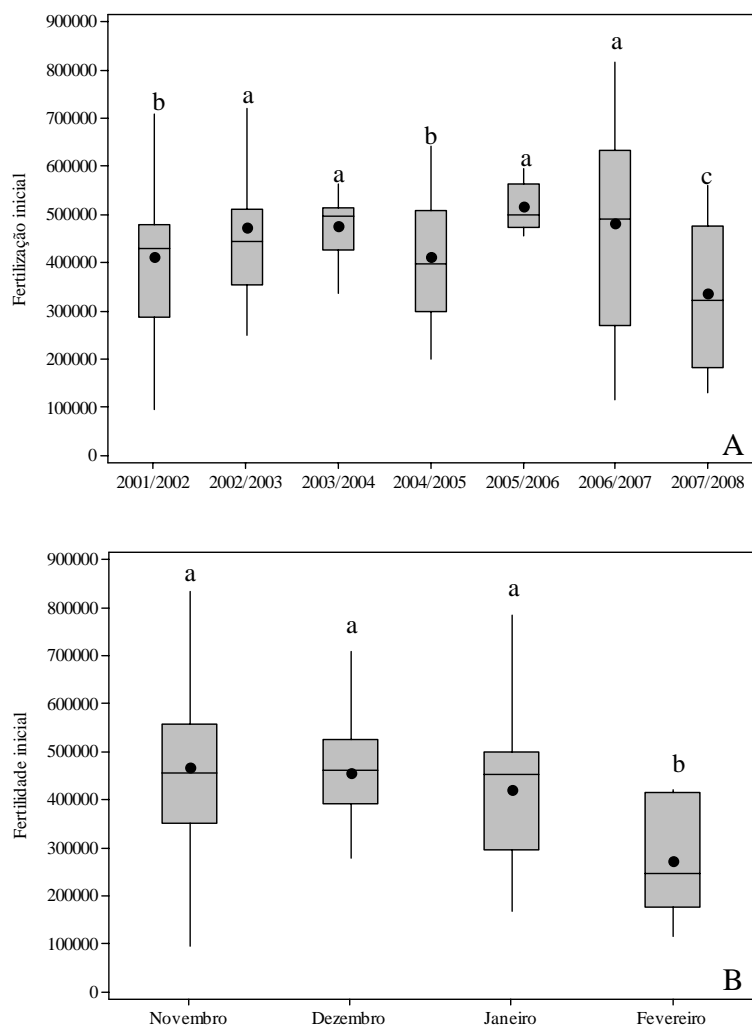


FIGURA 26 Boxplot da fertilidade inicial de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

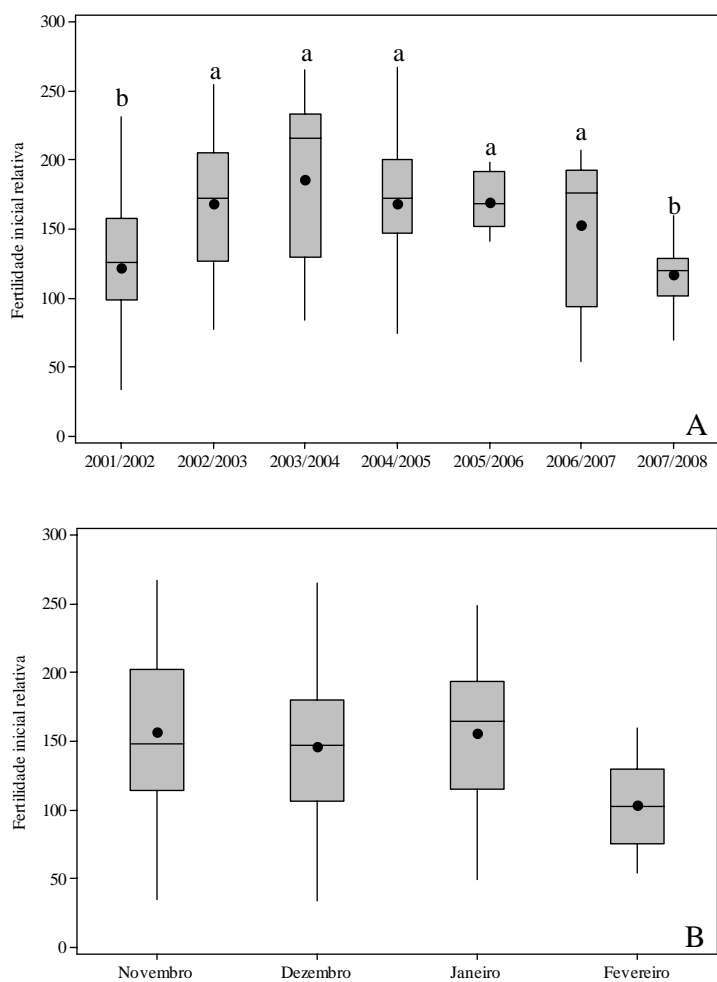


FIGURA 27 Boxplot de fertilidade inicial relativa de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na FIGURA 28 estão apresentadas as médias da taxa de fertilização de pacu mantidos em cativeiro, durante sete períodos reprodutivos consecutivos, nos meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro. Taxas de fertilização superiores a 70% foram observadas nos períodos reprodutivos de 2002/2003 e 2005/2006, resultado semelhante ao encontrado por Sanches et al. (2007) para a mesma espécie,  $70\pm 1\%$ . Segundo Koger et al. (1999), a taxa de fertilização é um indicador seguro da qualidade dos gametas, do processo de fertilização e da embriogênese.

Não foi observada relação entre a taxa de fertilização e a pluviosidade para todo o período de estudo. Isso demonstra que a processo de reprodução de pacu em cativeiro não foi influenciado pelos fatores ambientais, e que as condições em que os reprodutores foram mantidos permitiram que a reprodução ocorresse com sucesso. A taxa de fertilização observada neste estudo variou entre  $21,28\pm 29,8$  a  $78,07\pm 30,6\%$ . Esses resultados são satisfatórios, quanto se considerara que em ambiente natural a taxa de sobrevivência é inferior a 1% dos ovos produzidos (Murgas et al., 2003).

Nos períodos reprodutivos de 2001/2002 e 2007/2008, verificam-se as menores médias para a taxa de fertilização:  $30,9\pm 34,7$  e  $21,2\pm 29,8$ , respectivamente. Como não foi observada influência de fatores ambientais, observa-se que no período reprodutivo de 2001/2002 obteve-se o maior tempo de extrusão dos gametas. É necessário determinar o momento exato da ovulação (extrusão dos ovócitos) das fêmeas, para garantir a obtenção de gametas de boa qualidade (Bromage et al., 1994). A retirada dos óvulos antes ou depois de determinado tempo da ovulação pode comprometer a qualidade das larvas e proporcionar baixas taxas de fertilização (Hirose et al., 1977).

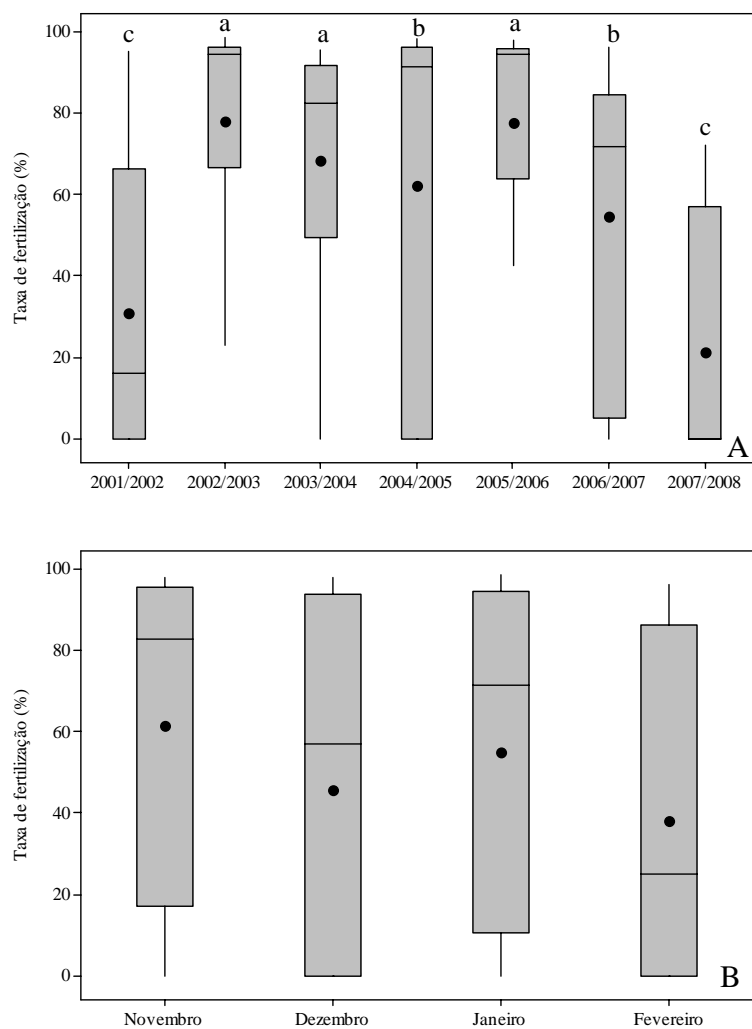


FIGURA 28 Boxplot da taxa de fertilização de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para *Piaractus mesopotamicus*, os resultados de fertilidade final, neste estudo, foram de  $70.867,4 \pm 114.604,4$  a  $405.984,7 \pm 186.997,0$  larvas. A fertilidade final corresponde ao número de ovos fertilizados e, conseqüentemente, ao número de larvas produzidas no processo de reprodução artificial de peixes. Esse parâmetro está diretamente relacionado à taxa de fertilização dos ovos. Esse fato é comprovado neste estudo quanto se verifica que a menor média observada foi para o período reprodutivo de 2007/2008 (FIGURA 29),  $70.867,4 \pm 114.604,4$  larvas, sendo esse o período no qual também foi observada menor média para a taxa de fertilização. Assim como para os períodos de 2002/2003 e 2005/2006, nos quais foram observadas as maiores médias para os dois parâmetros estudados (FIGURA 29). Não foi observada diferença significativa entre os meses de estudo.

A fertilidade final relativa avalia a relação entre o número de larvas produzidas em relação ao peso corporal das fêmeas. Assim como para fertilidade final, não houve diferença significativa para a fertilidade final relativa nos meses de estudo (FIGURA 30). Nos períodos de 2001/2002, 2006/2007 e 2007/2008, observaram-se as menores médias para esse parâmetro, ou seja,  $45,08 \pm 57,6$ ,  $56,58 \pm 48,1$  e  $28,9 \pm 43,6$ , respectivamente (FIGURA 30). Esses resultados também demonstram a relação entre esse parâmetro e a taxa de fertilização, que também foi significativamente menor nos períodos de 2001/2002 e 2007/2008. Quanto melhor a qualidade dos ovos produzidos maior será a taxa de fertilização e conseqüentemente, maior será produção de larvas, promovendo, assim, o sucesso reprodutivo para a espécie de peixe.

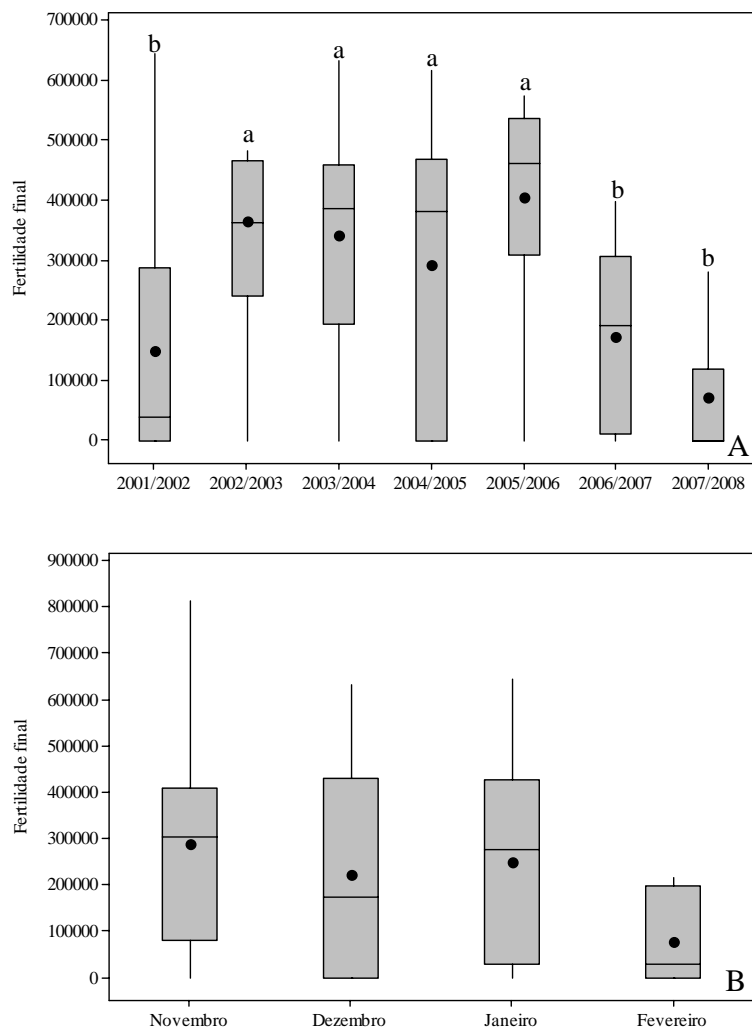


FIGURA 29 Boxplot da fertilidade inicial de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,08$ ).

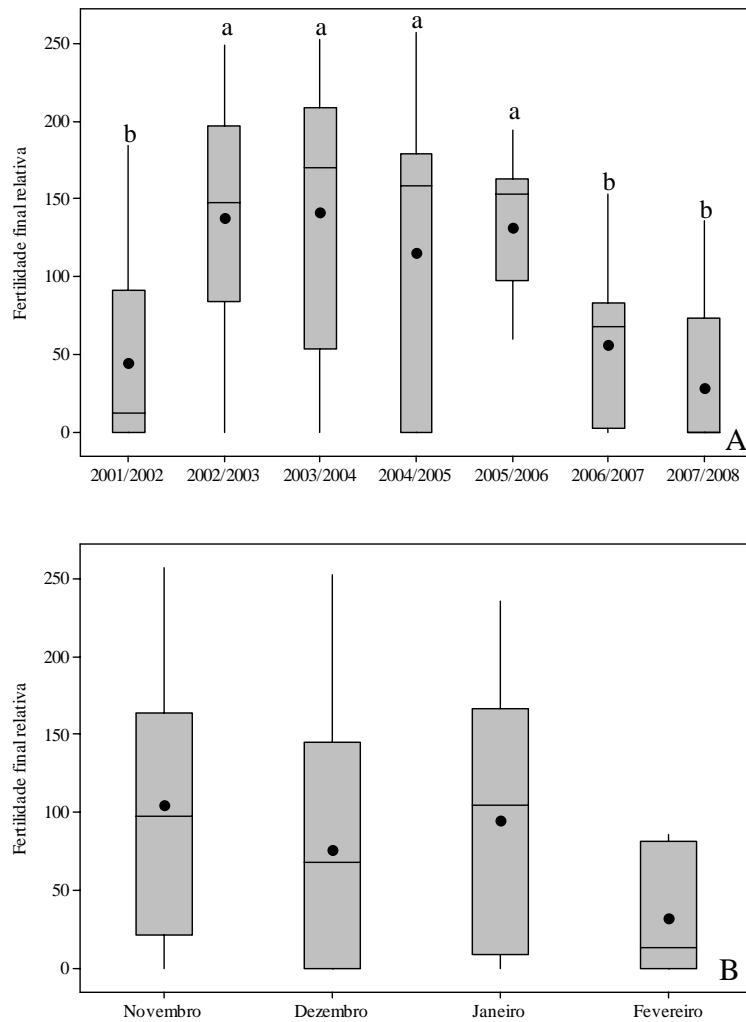


FIGURA 30 Boxplot de fertilidade final relativa de pacu nos períodos reprodutivos (A) e meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.3 Piracanjuba

Na FIGURA 31 estão apresentados os resultados para eficiência reprodutiva de piracanjuba nos períodos reprodutivos e meses de estudo. Não foi observada diferença significativa entre os períodos reprodutivos. A eficiência na indução da reprodução de piracanjuba variou de 50,5% a 87,5%, esses resultados vão de encontro ao descrito na literatura por diferentes autores, como Zaniboni Filho & Barbosa (1996) e Dumont-Neto et al. (1997), ao quais obtiveram resultados positivos na reprodução de espécies nativas, como dourado *Salminus brasiliensis*, jaú *Zungaro jahu*, matrinxã *Brycon cephalus*, pacu *Piaractus mesopotamicus*, piapara *Leporinus elongatus*, piau *Leporinus friderici*, tambaqui *Colossoma macropomum* e piracanjuba *Brycon orbignyanus*, utilizando uma dose prévia de 0,25 mg de extrato bruto de hipófise de carpa.

Andrade-Talmelli et al. (2002) obtiveram 81,8% de eficiência na reprodução induzida de *Brycon insignis*, e Sato et al. (2003) observaram 59% para *Brycon orthotaenia*. O fato de apresentar uma alta eficiência da indução hormonal indica que esse procedimento pode ser considerado satisfatório na prática de reprodução artificial para a espécie de estudo, juntamente com o método utilizado para a seleção dos reprodutores (Sato et al., 2000, 2003; Sampaio & Sato, 2007).

Quando se comparam os meses de estudo, foi verificada diferença entre os meses de novembro e dezembro, os quais apresentaram as maiores médias para a eficiência reprodutiva de piracanjuba (FIGURA 31). Esse resultado demonstra que a piracanjuba é uma espécie que apresenta algumas dificuldades quanto ao seu manjo reprodutivo em cativeiro. Esse fato pode ser comprovado, uma vez que não foi observada, neste estudo, relação entre a eficiência reprodutiva e a pluviosidade (INMET).



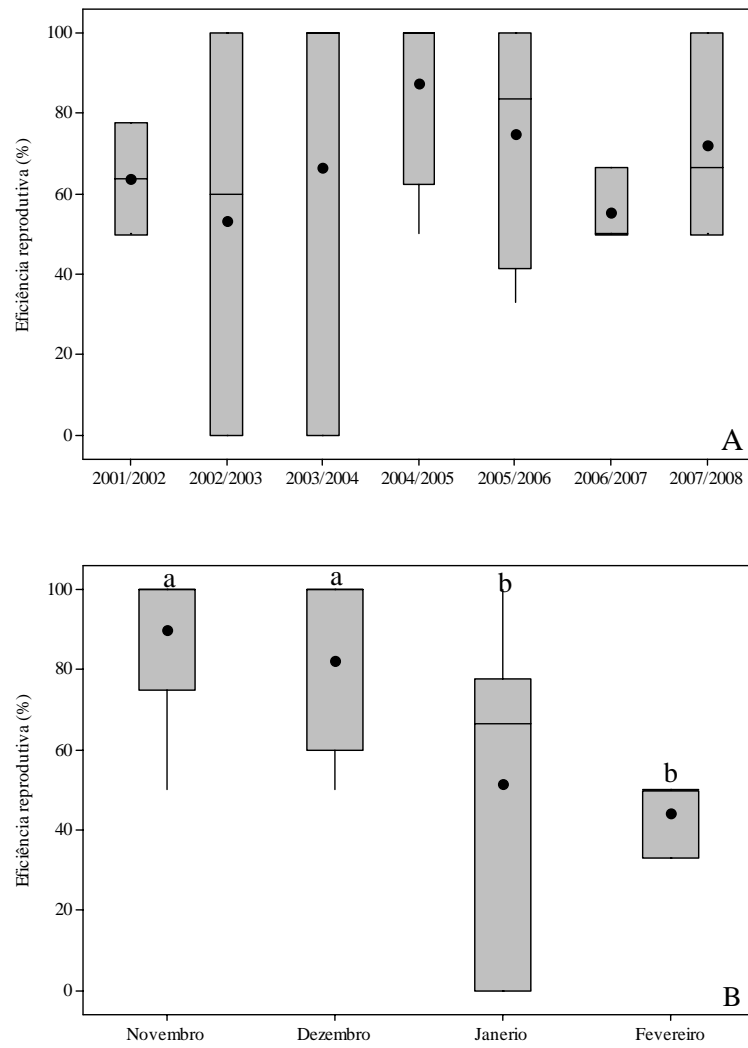


FIGURA 31 Boxplot da eficiência reprodutiva de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para piracanjuba, neste estudo, o tempo necessário para que ocorresse a desova foi, em média, de 5 a 11 horas. Segundo Murgas et al. (2003), o tempo necessário para a desova da mesma espécie foi de 8 horas, e para matrinxã *Brycon cephalus*, foi de 6 horas. Para *Brycon orthotaenia*, o tempo da desova foi de 6 horas (Sato et al., 2003). Não foi observada relação entre a pluviosidade (INMET) e o tempo da desova de piracanjuba.

De acordo com Saniboni Filho & Weingarther (2007), o sucesso da reprodução depende de um ajuste temporal que garanta que a desova ocorra no momento exato, quando as condições ambientais se apresentem as mais favoráveis para a sobrevivência dos descendentes. Dessa forma, a sincronia entre os processos fisiológicos de maturação gonadal com as condições ambientais faz-se extremamente necessárias.

Ao contrário do observado para pacu e curimba, neste estudo, para piracanjuba, foi verificada relação negativa linear entre o peso da desova e a pluviosidade (FIGURA 32), ou seja, quanto maior a pluviosidade, menor o peso da desova da piracanjuba. Esse resultado demonstra que o ciclo reprodutivo dos peixes apresentam uma estreita relação com as variações de temperatura e com o regime de chuvas (Barbieri et al., 2000; Godinho, 2007).

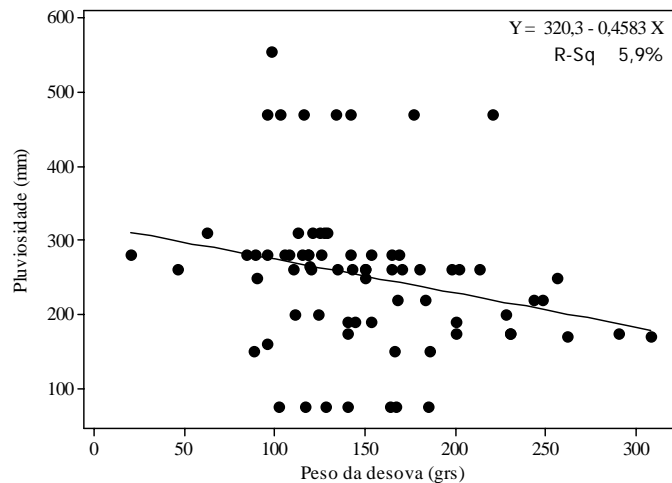


FIGURA 32 Regressão linear entre a pluviosidade e o peso da desova das fêmeas de piracanjuba.

Godoy (1975) relata que há um relação entre o peso corporal da fêmea e o peso da desova, pois os dois ovários maduros podem representar em torno de 27% do peso corporal. Neste estudo, assim como para curimba e pacu, para a piracanjuba também é observada relação significativa entre o peso da desova e o peso corporal das fêmeas estudadas, confirmando a influência à qualidade dos reprodutores para o sucesso da reprodução em cativeiro.

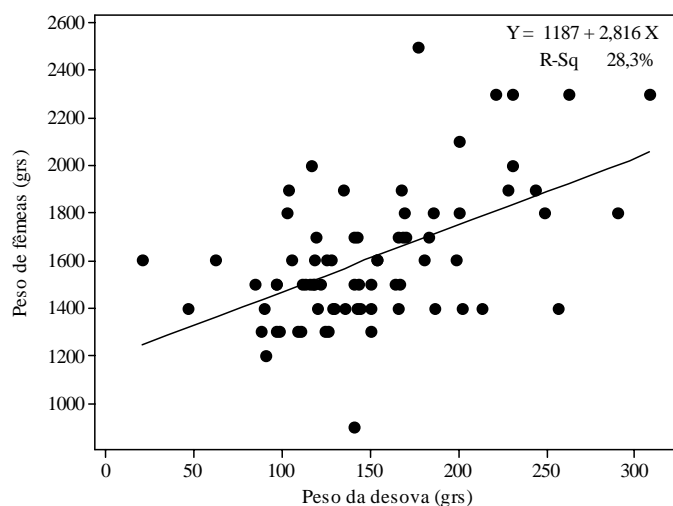


FIGURA 33 Regressão entre o peso corporal das fêmeas e o peso da desova de piracanjuba.

Os resultados do peso da desova apresentaram oscilações, com dois anos de valores médios superiores a 189g, nos períodos reprodutivos de 2002/2003 e 2003/2004, seguidos dos períodos de 2004/2005 e 2005/2006, com valores inferiores a 147g e acompanhados dos períodos de 2006/2007 e 2007/2008, novamente com valores superiores a 166g (FIGURA 34).

Comparando os meses de estudo, observa-se que os meses de novembro de dezembro apresentam as maiores médias para o peso da desova, ou seja,  $186,4 \pm 61,9$  e  $160,0 \pm 53,7$ , respectivamente, ao passo que os meses de janeiro e fevereiro apresentam as menores médias:  $127 \pm 71$  e  $87,0 \pm 50,3$ , respectivamente (FIGURA 34).

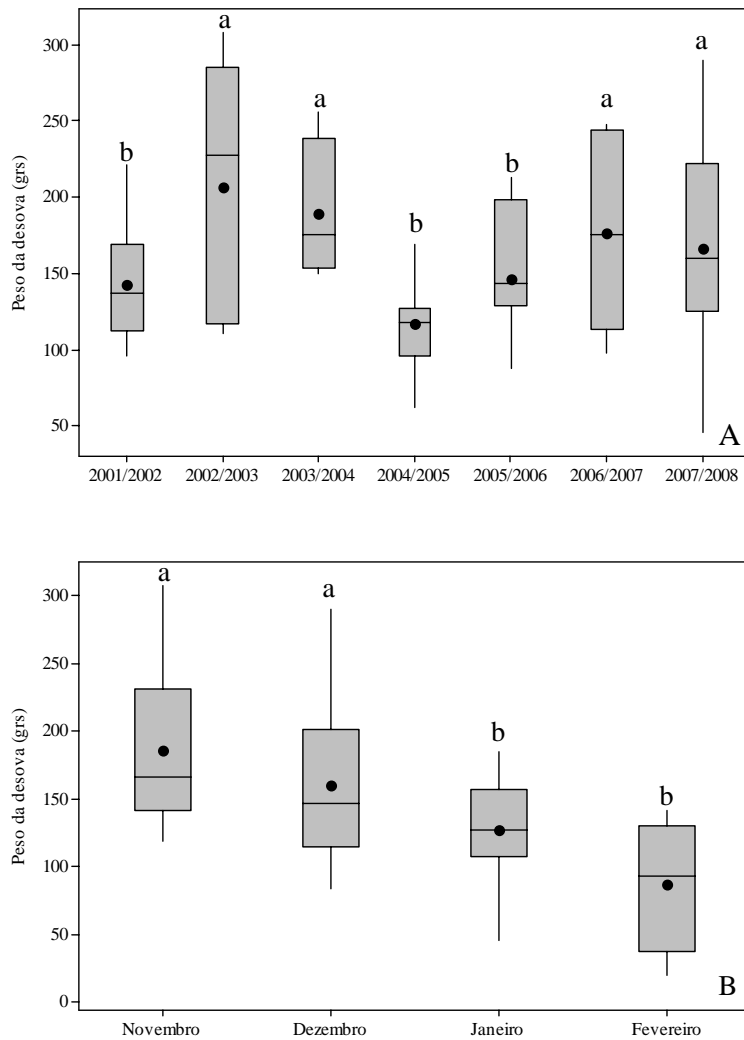


FIGURA 34 Boxplot do peso da desova de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Assim como para o peso da desova, a fertilidade inicial apresentou o mesmo padrão, em que se observaram dois períodos reprodutivos (2002/2003 e 2003/2004), com valores superiores a 247.000 ovos, seguidos de dois períodos reprodutivos consecutivos (2004/2005 e 2005/2006), com valores inferiores a 190.000 ovos (FIGURA 35). Esse fato é observado nos próximos dois períodos reprodutivos (2006/2007 e 2007/2008), onde foram observados valores superiores a 203.000 ovos. A fertilidade inicial corresponde ao número de ovócitos liberados pela fêmea no momento da desova. Os meses de novembro e dezembro apresentaram valores médios superiores aos meses de janeiro e fevereiro (FIGURA 35).

Sato et al. (2003) obtiveram valores de fertilidade inicial para a matrinxã *Brycon orthotaenia* de  $2.754.000 \pm 616.000$  ovos. Neste estudo, a fertilidade inicial para *Brycon orbignyanus* foi de  $151.826,3 \pm 34.578,7$  a  $268.580,0 \pm 112.153,2$  ovos. Os altos valores de fertilidade inicial são esperados, pois as espécies consideradas migradoras possuem ovos livres e não apresentam cuidado parental.

Um valor indicativo da capacidade reprodutiva individual de peixes pode ser calculado pela relação entre o peso corporal (Shatunovskiy, 1988). A fertilidade inicial relativa mede a relação entre a produção de ovócitos e o peso corporal de cada fêmea. Os valores observados para este estudo estão apresentados na FIGURA 36, com média entre  $176,1 \pm 42,9$  a  $101,5 \pm 22,4$ . O período reprodutivo de 2003/2004 apresentou a maior média para a fertilidade inicial relativa para piracanjuba. Para matrinxã, Sato et al. (2003) obtiveram fertilidade inicial relativa de  $105 \pm 22$ .

Entre os meses de estudo, foi observada diferença significativa apenas para fertilidade inicial relativa, em que nos meses de novembro e dezembro foram obtidas as maiores médias para esse parâmetro (FIGURA 36). Esse é um

dos parâmetros útil no manejo reprodutivo, pois são utilizados para avaliação da eficiência deste manejo (Godinho, 2007).

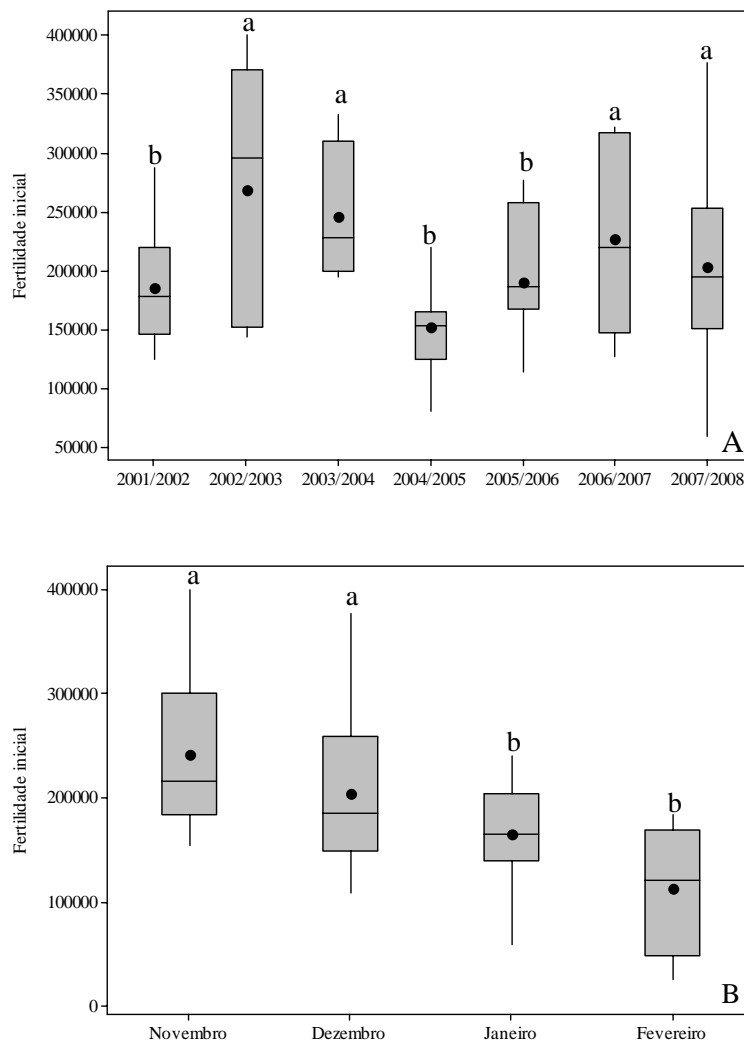


FIGURA 35 Boxplot de fertilidade inicial de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

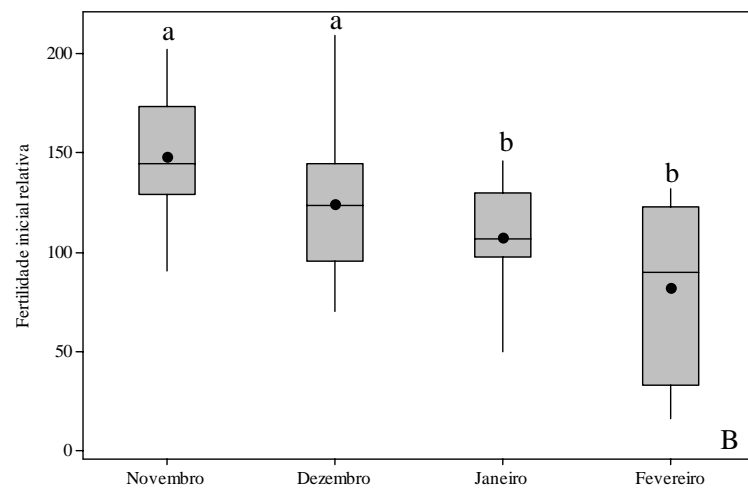
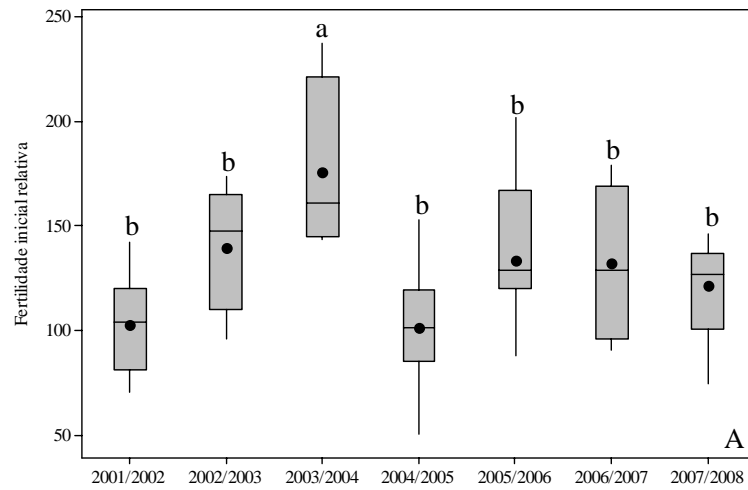


FIGURA 36 Boxplot de fertilidade inicial relativa de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



A taxa de fertilização é um indicador seguro da qualidade dos ovócitos, do sêmen, do processo de fertilização e da embriogênese (Koger et al., 1999). Neste estudo, observam-se as maiores médias para taxas de fertilização de piracanjuba nos períodos reprodutivos de 2002/2003, 2003/2004 e 2007/2008 (FIGURA 37). Belmont (1994) observou taxas de fertilização inferiores a 50% para essa mesma espécie, enquanto Zaniboni Filho & Barbosa (1996) verificaram taxas de fertilização de 12,8%. Sato et al. (2003) obtiveram 50% para matrinxã *Brycon orthotaenia*. Esses resultados divergem dos encontrados neste estudo, no qual foram observadas taxas de fertilização de até 76,9%.

Comparando os meses de estudo, não foi observada diferença significativa da taxa de fertilização (FIGURA 37), assim como não foi observada a relação entre a taxa de fertilização e a pluviosidade para os períodos reprodutivos estudados. Isso demonstra que o manejo reprodutivo de piracanjuba em cativeiro não foi influenciado pelos fatores ambientais, e que o manejo reprodutivo empregado foi suficiente na obtenção do sucesso reprodutivo para a espécie.

É necessário determinar o momento exato da ovulação (extrusão dos ovócitos) das fêmeas para garantir a obtenção de gametas de boa qualidade (Bromage et al., 1994). A retirada dos óvulos antes ou depois de determinado tempo da ovulação pode comprometer a qualidade das larvas e proporcionar baixas taxas de fertilização (Hirose et al., 1977). Esse fato não para piracanjuba, ao contrário do observado para pacu, em que as menores taxas de fertilização foram observadas nos períodos reprodutivos nos quais foi verificado o maior tempo de desova para as fêmeas.

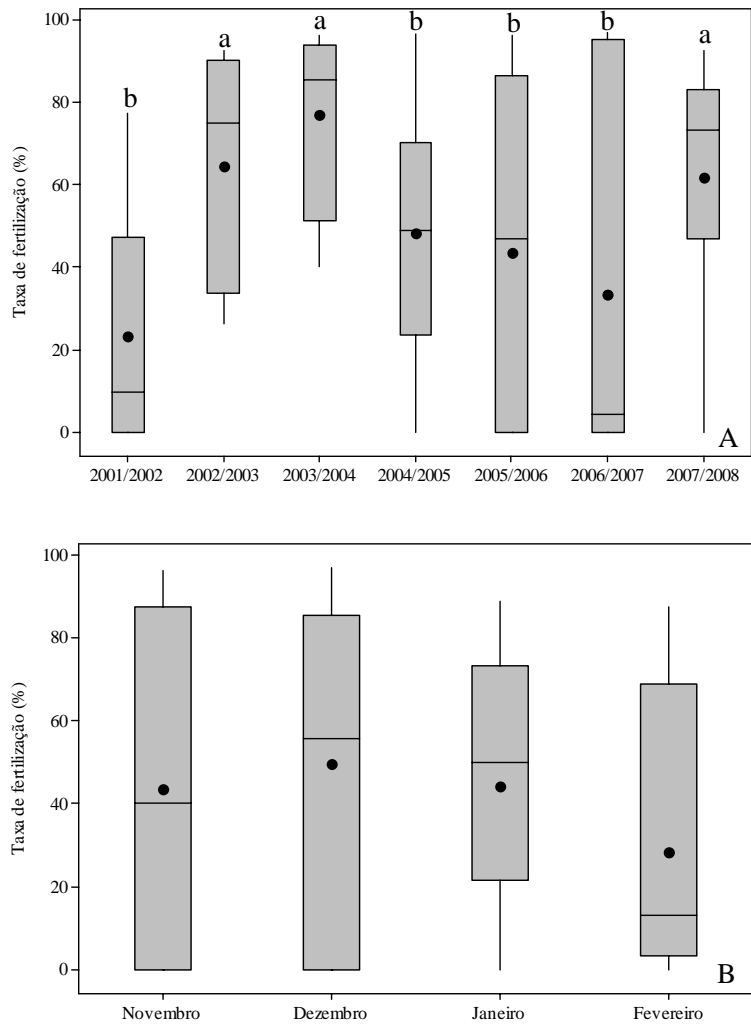


FIGURA 37 Boxplot de taxa de fertilização de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para *Brycon orbignyianus*, os resultados de fertilidade final, neste estudo, foram de  $188.433 \pm 75.200$  a  $45.242 \pm 54.774$  larvas. Sato et al. (2003) obtiveram  $1.542.000 \pm 457.000$  de fertilidade final para matrinxã *Brycon orthotaenia*. A fertilidade final corresponde ao número de ovos que foram fertilizados, o que corresponde ao número estimado de larvas produzidas no processo de reprodução artificial de peixes. Esse parâmetro está diretamente relacionado à taxa de fertilização dos ovos. Esse fato é comprovado neste estudo quanto se observou que as maiores médias observadas foram para os períodos reprodutivos de 2002/2003 e 2003/2004 (FIGURA 38),  $178.437 \pm 116.615$  e  $188.433 \pm 75.200$  larvas, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os meses de estudo (FIGURA 38).

No período reprodutivo de 2003/2004, verificaram-se as maiores médias para a fertilidade final relativa de piracanjuba,  $134,9 \pm 54,3$ . Para matrinxã *Brycon orthotaenia*, a fertilidade final relativa foi de  $59 \pm 18$  (Sato et al., 2003). A fertilidade final relativa avalia a relação entre o número de larvas produzidas em relação ao peso corporal das fêmeas. Assim como para fertilidade final, não houve diferença significativa para a fertilidade final relativa para os meses de estudo (FIGURA 38).

O conhecimento sobre o desempenho reprodutivo das espécies de peixes nativas de interesse comercial, ao longo do período reprodutivo, é escasso, comprovando a necessidade de reflexão sobre a obtenção dessas informações. As interações dos aspectos comportamentais influenciados pelo ambiente, que resulta em respostas fisiológicas, é uma ferramenta útil para o aperfeiçoamento de técnicas usadas nas pisciculturas.

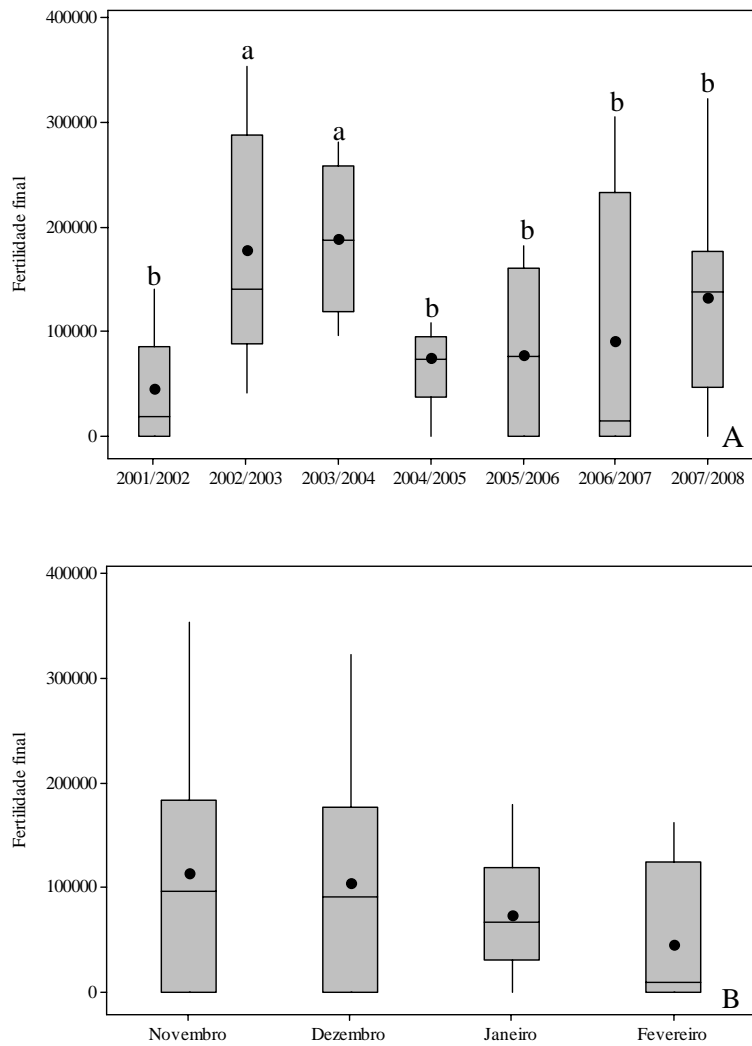


FIGURA 38 Boxplot da fertilidade final de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

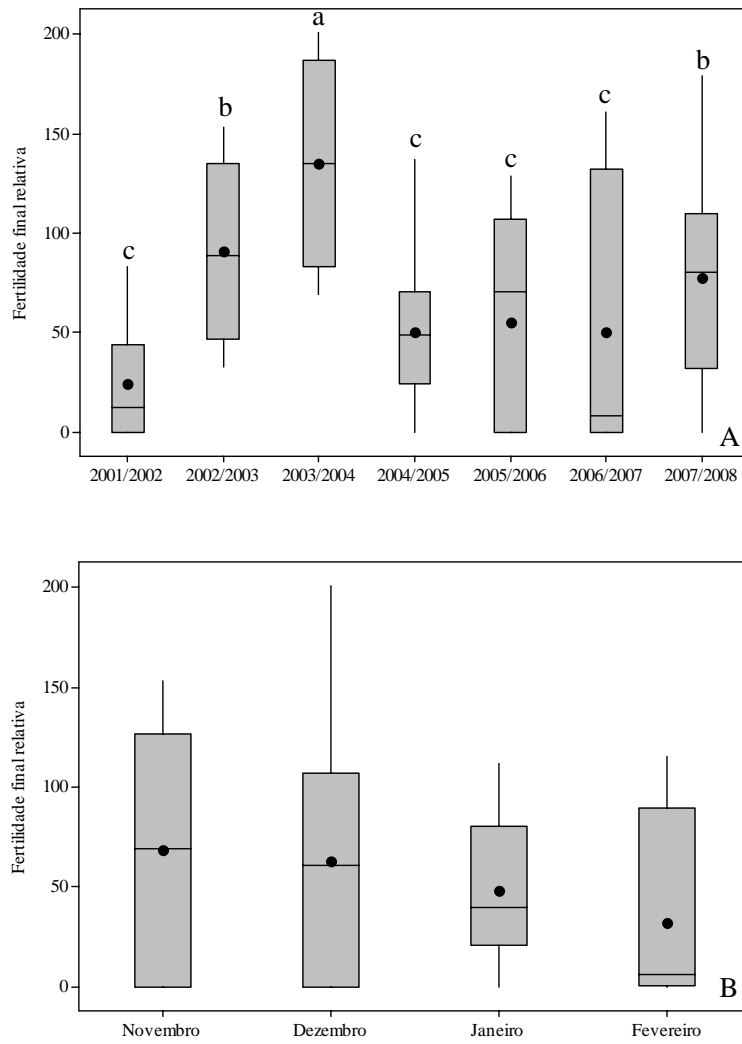


FIGURA 39 Boxplot da fertilidade final relativa de piracanjuba nos sete períodos reprodutivos (A) e nos meses de estudo (B). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Resfriamento de embriões de curimba

Como pode ser observado na FIGURA 40, o aumento na concentração do crioprotetor e o tempo de resfriamento promoveu a redução da taxa de eclosão dos embriões de curimba. Em um trabalho semelhante, a taxa de eclosão de *Cyprinus carpio* foi de até 90% no estudo de Urbányi et al. (1997), após os embriões dessa espécie serem expostos a uma concentração de 4,05% do crioprotetor metanol. No presente estudo, a concentração de 5% promoveu uma taxa de eclosão de 79,85%. Esse resultado foi semelhante ao verificado por Ahammad et al. (2003) para rohu (*Labeo rohita*), em que verificaram uma taxa de eclosão de 74,00% utilizando metanol a 4,8%.

Hubalék et al. (2003) consideram a concentração de 10% como ideal para compor a solução de conservação. A taxa de eclosão para a concentração de 10%, neste estudo, foi de 79,12%. Entretanto, outros autores observaram valores inferiores aos encontrados neste estudo. Ahammad et al. (2003) verificaram 48% de taxa de eclosão de rohu *Labeo rohita*, utilizando metanol a 9,6%. Streit Junior et al. (2007) obtiveram 61,22% e 56,52% para DMSO e metanol, respectivamente, ambos na concentração de 10%, em embriões de pacu *Piaractus mesopotamicus*.

As soluções contendo apenas água e sacarose obtiveram taxas de eclosão menores que 25% (FIGURA 40). Esses resultados observados demonstram a necessidade de utilização de soluções crioprotetoras durante o resfriamento de embriões de curimba, permitindo um aumento significativo das taxas de eclosão dos embriões. Fornari et al. (2008) obtiveram 0% de taxa de eclosão de embriões de cascudo-preto *Rhinelepis aspera*, utilizando apenas água durante o resfriamento a -8°C por um período de 6 horas. Streit Junior et al. (2007) não observaram diferença significativa entre as soluções de resfriamento em que o

metanol e o DMSO foram utilizados em embriões de pacu, à temperatura de resfriamento de 5, -2 e -7°C, concluindo em seu trabalho que os embriões de pacu suportam temperaturas de até -7°C durante quatro horas, sem a presença de nenhuma solução crioprotetora.

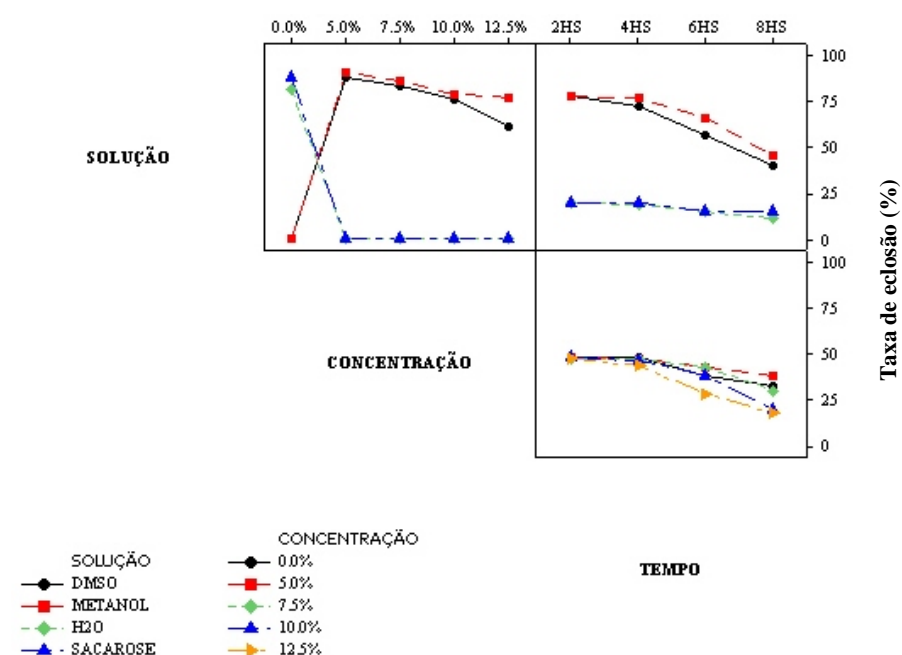


FIGURA 40 Taxa de eclosão dos embriões submetidos a diferentes soluções crioprotetoras em diferentes tempos de resfriamento a 4°C.

Os crioprotetores são essenciais para o processo de resfriamento e congelamento, mas esses agentes sempre causarão mortalidade de células (Chao & Liao, 2001). O aumento na concentração das soluções crioprotetoras potencializou a toxidez, pois a taxa de eclosão e o percentual de larvas normais diminuiram. Cabrita et al. (2003) afirmaram que o efeito de cada crioprotetor

não depende somente de suas propriedades químicas, mas também de uma espécie especificidade do embrião, tendo mostrado resultados distintos quando se compara a ação dos crioprotetores em diferentes espécies.

Observa-se também, neste estudo, que o tempo de resfriamento promoveu uma redução na taxa de eclosão dos embriões de curimba, independentemente da concentração da solução crioprotetoras (FIGURA 40). As soluções de metanol e DMSO apresentam taxas de eclosão próximas de 75% quando mantidos por até 4 horas a 4°C. Aumentando o tempo de resfriamento para 6 horas, observou-se a redução da taxa de eclosão para próxima de 50% e, passando para 8 horas de resfriamento, a taxa de eclosão alcança valores abaixo de 50%. O tempo de exposição excessivo à solução crioprotetora, de acordo com Bart & Kyaw (2003), pode potencializar o efeito tóxico do agente crioprotetor sobre o embrião. Streit Junior (2005) demonstrou que à temperatura de -7°C os embriões de *P.mesopotamicus* apresentaram maior sensibilidade ao frio, pois apenas 40% dos embriões eclodiram em larvas.

E de modo geral, nas soluções em que foi utilizado o metanol como crioprotetor intracelular, a porcentagem de larvas viáveis foi superior àquelas em que o crioprotetor intracelular foi o DMSO. A ação positiva do metanol como crioprotetor para embriões de peixes tem sido verificada em outras espécies. Embriões de uma espécie de linguado *Paralichthys olivaceus* foram submetidos a diferentes crioprotetores por Zhang et al. (2004), que constataram que o metanol foi o segundo crioprotetor menos tóxico, comparando-o com DMSO, glicerol, etileno-glicol e propileno-glicol. Para Wolfe & Bryant (2001), se o DMSO tem como principal virtude a permeação rápida para o interior da membrana plasmática, especialmente em baixas temperaturas, como inconveniente, tem a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam e inviabilizam as células, tornando especialmente tóxico.



A eficiência do crioprotetor interno está relacionada com o estreito equilíbrio, baixa toxicidade e alta permeabilidade do crioprotetor no embrião. A utilização do metanol como crioprotetor tem se propagado em função de sua baixa toxicidade e boa permeabilidade na membrana celular (Hagedorn et al., 1997). Essa eficiência do metanol foi observada no estudo de Ahammad et al. (2003) com embriões de *Labeu rohita*.

A porcentagem de larvas viáveis após a eclosão dos embriões apresentou uma regressão linear entre a concentração da solução crioprotetora utilizada no resfriamento de embriões de curimba (FIGURA 41). Streit Junior (2005) também verificou o mesmo resultado, estudando o resfriamento de embriões de pacu, utilizando diferentes concentrações de DMSO e glicerol. Entretanto, na concentração de 5% do crioprotetor, observaram-se 48,45% de larvas viáveis, sendo que Streit Junior (2005) obteve 24,55%.

Levando em consideração o tempo de resfriamento dos embriões, observou-se uma queda linear na porcentagem de larvas viáveis em relação ao aumento do tempo de resfriamento (FIGURA 41). Assim como para a taxa de eclosão, a porcentagem de larvas viáveis, além da ação da temperatura deve-se considerar o tempo de contato com o crioprotetor. A exposição de embriões de peixes à temperaturas próximas de 0°C sempre reduzirá a taxa de eclosão de larvas, mesmo quando tratados com soluções de proteção. De um modo geral, vale ressaltar a afirmação de Chao & Liao (2001) quanto à necessidade de determinação do ponto de equilíbrio entre a eficiência do crioprotetor e a tolerância dos embriões à toxicidade dos crioprotetores.

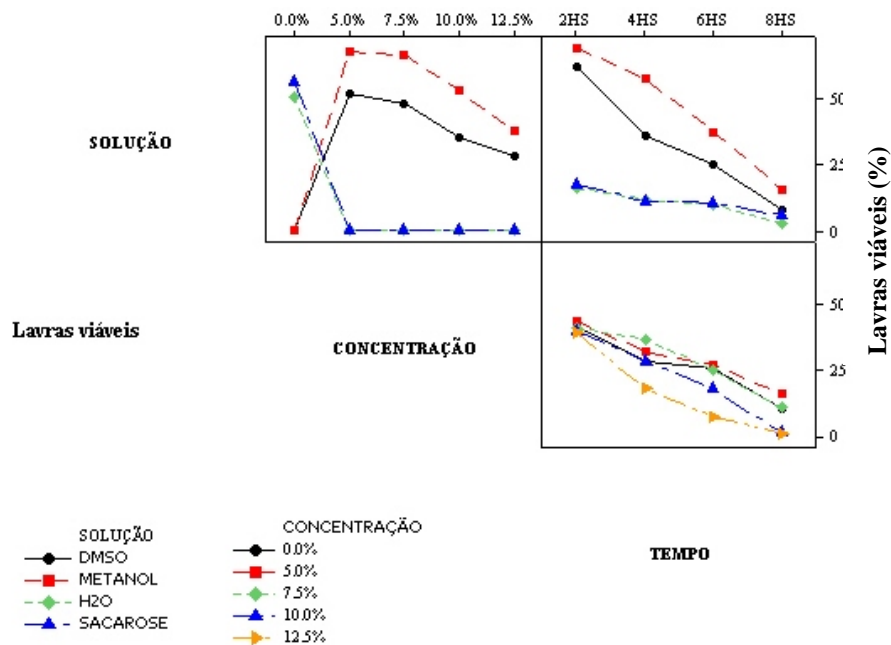


FIGURA 41 Larvas viáveis após a eclosão dos embriões submetidos a diferentes soluções crioprotetoras em diferentes tempos de resfriamento a 4°C.

Streit Junior (2005) demonstrou que à temperatura de -7°C os embriões de *P.mesopotamicus* apresentaram maior sensibilidade ao frio, pois apenas 40% dos embriões eclodiram em larvas. O autor também creditou ao estresse térmico a eclosão de um baixo percentual de larvas viáveis (menos de 10 %), mesmo nas temperaturas intermediárias de 5 e -2°C, em que se registraram as melhores médias para essa variável-resposta. Essa sensibilidade dos embriões de peixes ao frio é observada em inúmeras espécies, como nos embriões de *Cyprinus carpio*, em que as temperaturas de 0 e 4°C levaram Dinnys et al. (1998) a constarem a sensibilidade ao frio para essa espécie. Os embriões de zebrafish (*Brachydanio rerio*) suportam temperaturas de -15°C por

até 1 hora; porém, 3 horas a essa temperatura tornou-se letal, como registraram Zhang & Rawson (1995).

Os açúcares têm importante atuação como solução crioprotetora, que é a manutenção da pressão osmótica (Holt, 2000). Propriedades positivas da sacarose, quando utilizada com outro crioprotetor extracelular, foram destacadas por Woelders (1997), que considerou como ponto principal a estabilidade da membrana celular, especialmente no que se refere à deformação mecânica provocada pela saída da água durante o processo de congelamento e entrada do crioprotetor intracelular.

Ahammad et al. (1998) concluíram que a adição de sacarose à solução de metanol foi essencial para a sobrevivência dos embriões de *Cirrhinus mirgala*. A utilização de 0,1M de sacarose associada e 3M de metanol possibilitaram Zhang & Rawson (1995) obterem 27,3% de sobrevivência dos embriões de *Brachydanio rerio* mantidos durante 6 horas a temperatura de -10°C. O resultados obtidos por Ahammad et al. (2003), utilizando 3M de metanol associado a 0,5M de sacarose, aumentou em até 6 % a eclosão de larvas viáveis de *Cyprinus carpio*, após o resfriamento dos embriões a -2°C. Streit Junior et al. (2007) encontraram resultados positivos na combinação de 9% de metanol e 17,1% de sacarose em um protocolo de resfriamento com embriões de *P. mesopotamicus*, expostos por, no mínimo, seis horas a - 8°C. Com base nesses resultados, foi fixada para este estudo a utilização de 0,5M de sacarose em todos os tratamentos de resfriamento de embriões de curimba, obtendo, assim, resultados positivos.

Na FIGURA 42 estão apresentados os resultados para a porcentagem de ovos gorados, os quais são embriões que, de alguma forma, não completaram o seu desenvolvimento embrionário. A morte dos embriões, quando expostos aos crioprotetores, de acordo com Kusuda et al. (2002), geralmente está relacionada com degeneração celular e as proteínas da membrana nuclear, devido à

desidratação e aumento na concentração salina, em decorrência do contato com o crioprotetor. A toxicidade dos crioprotetores para embriões de peixes é ratificada pela observação de Urbányi et al. (2000), que consideraram esse um grande problema no desenvolvimento de técnicas que envolvam baixas temperaturas.

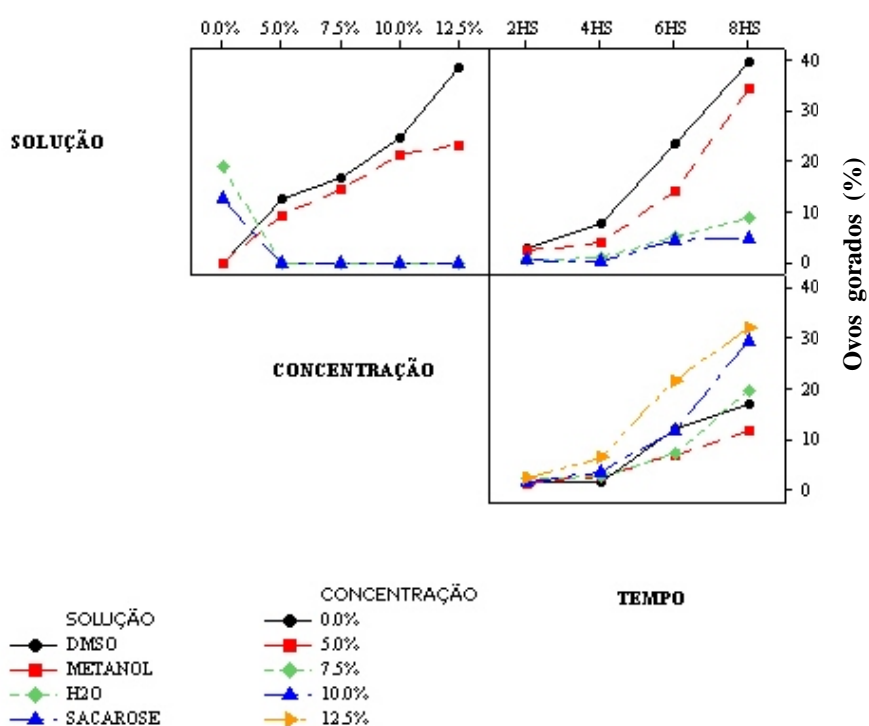


FIGURA 42 Ovos que não se desenvolveram a larvas (ovos gorados) após a eclosão dos embriões submetidos a diferentes soluções crioprotetoras em diferentes tempos de resfriamento a 4°C.

As porcentagens de ovos gorados observados durante o resfriamento de embriões de curimba demonstram um aumento significativo em relação ao incremento das concentrações dos crioprotetores e os tempos de resfriamento. Esse fato também foi verificado nos estudos de resfriamento de embriões de diferentes espécies de peixes, como *Cyprinus carpio* (Dinnyés et al., 1998), *Brachydanio rerio* (Zang & Rawson, 1995) e *Piaractus mesopotamicus* (Streit Junior, 2005).

## 6 CONCLUSÕES

- As espécies de estudo, curimba, pacu e piracanjuba apresentaram elevado desempenho reprodutivo, o que significa que essas espécies são capazes de se reproduzirem em condições de cativeiro.
- Para curimba e pacu, o período reprodutivo ocorre entre os meses de novembro, dezembro e janeiro, ao passo que para piracanjuba, ocorre entre os meses de novembro e dezembro. De modo geral, o mês de fevereiro apresentou um menor desempenho reprodutivo, para todas as espécies, indicando não ser o mês ideal para o manejo reprodutivo dessas espécies.
- Os crioprotetores possibilitaram a conservação dos embriões de curimba *Prochilodus lineatus* quando submetidos à baixa temperatura, demonstrando ser essenciais durante o processo de resfriamento de embriões de peixes.
- Entretanto, deve-se levar em consideração a concentração do crioprotetor utilizado e o tempo de resfriamento, pois pode influenciar diretamente na taxa de eclosão e principalmente na produção de larvas viáveis.
- Os embriões de curimba podem ser resfriados utilizando metanol como crioprotetor interno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADITE, A.; WINEMILLER, K.O.; FIOGBÉ, E.D. Population structure and reproduction of the African bonytongue *Heterotis niloticus* in the Sô River-floodplain system (West Africa): implications for management. **Ecology of Freshwater Fish**, Copenhagen, v.15, n.1, p.30-39, Jan. 2006.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, 2007. 501p.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JÚNIOR, H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Ed.). **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físico, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. p.179-208.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, Aug. 1998.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v.44, n.2, p.114-121, Apr. 2002.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and 2°C in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Woburn, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- ALBUQUERQUE, M.O.; SILVA, J.W.B. e. Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v.47/52, n.1/2, p.79-100, 1994.
- ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.166-172, mar./abr. 2003.

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMTO, E.T.; NARAHARA, M.Y.; FENERICH-VERANI, N. Reprodução induzida de piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.31, n.2, p.803-811, mar./abr. 2002.

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; ROMAGOSA, E. Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, STEINDACHNER, 1876 (PISCES, CHARACIDAE). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, n.1, p.21-28, 2001.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixe aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. 212p.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxilosus* e do curimbatá, *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP. **Acta Limnológica Brasilensia**, São Carlos, v.12, n.3, p.85-91, 2000.

BART, A.N.; KYAW, H.A. Survival of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), embryo after immersion in methanol and exposure to ultrasound with implications to ultrasound with implication to cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v.34, n.8, p.609-615, July 2003.

BEGOVAC, P.C.; WALLACE, R.C. Vitelline envelop proteins in the pipefish. **Journal of Morphology**, New York, v.193, n.1, p.117-133, Jan. 1986.

BELMONT, R.A.F. Considerações sobre a propagação artificial da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* - CESP. In: SEMINÁRIO SOBRE CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon*, 1., 1994, Pirassununga. **Anais...** São Paulo: Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura, 1994. p.17-18.

BERNARDINO, G.; LIMA, V.A. Situação da criação de *Colossoma* e *Piaractus* no sudeste do Brasil: 1988-1991. In: \_\_\_\_\_. **Criação de *Colossoma* e *Piaractus* no Brasil**. Brasília: IBAMA, 1999. p.262-266.

BRICKLE, P.; LAPTIKHOVSKY, V.; ARKHIPKIN, A. Reproductive strategy of a primitive temperate notothenioid *Eleginops maclovinus*. **Journal of Fish Biology**, London, v.66, n.4, p.1044-1059, Aug. 2005.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1999. 184p.



BROMAGE, N.; BRUCE, M.; BASAVARAJA, N.; RANA, N. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.25, n.1, p.13-21, Apr. 1994.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CHEREGUINI, O.; WALLACE, J.C.; HERRÁEZ, M.P. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, San Diego, v.47, n.3, p.204-213, June 2003.

CALVI, S.L.; MAISSE, G. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. **Cryobiology**, San Diego, v.36, n.4, p.255-262, Aug. 1998.

CAMPOS, M.S. **Desvendando o MINITAB™**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2003. 262p.

CARTER, C.A.; WOURMS, J.P. Cells behaviour during early development in the South American annual fishes of the genus *Cynolebias*. **Journal of Morphology**, New York, v.210, n.3, p.247-266, Dec. 1991.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.

CASTAGNOLLI, N.; DONALDSON, E.M. Induced ovulation and rearing of the Pacu (*Colossoma mitrei*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.25, n.2/3, p.275-280, Aug. 1981.

CASTELLANI, L.R.; TSE, H.G.; SANTOS, H.S.L. dos. Desenvolvimento embrionário do curimatá (*P. lineatus*) (VALENCIENNES, 1836). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, São Paulo, v.11, n.2, p.99-105, mar./abr. 1994.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JUNIOR, C.J. **Check list of the freshwater fisher of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.742-745.

CHAO, N.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v.197, n.1, p.161-189, Jan. 2001.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.

COSTA, R.M.R.; MATEUS, L.A.F. Reproductive biology of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei: Characidae) in the Cuiabá River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v.7, n.3, p.447-458, 2009.

CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. 533p.

DENNISTON, R.S.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.59-74.

DINNYÉS, A.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, B. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Woburn, v.50, n.1, p.1-13, July 1998.

DUMONT-NETO, R.; PELLI, A.; FREITAS, J.L.; COSTA, A.E.; BARBOSA, N.D.C. Reprodução induzida da piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1903) durante a primeira maturação sexual, cultivada em cativeiro na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta Grande (CEMIG). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.105-107, 1997. Número especial.

FARKAS, T.; FODOR, E.; KITAJKA, K.; HALVER, J.E. Response of fish membranes to environmental temperature. **Aquaculture Research**, Oxford, v.32, n.8, p.645-655, Aug. 2001.

FERREIRA, L.K.S.G.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. Alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887) em uma área de proteção ambiental-RPPN SESC Pantanal, município de Barão de Melgaço, MT. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSO NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICAS DO PANTANAL, 4., 2004, Corumbá. **Anais...** Corumbá: UFMT, 2004. 1 CD-ROM.

FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JUNIOR, D.P.; SIROL, R.N.; POVH, J.A.; CARVALHO, S.; OLIVEIRA, D. Refriamento de embriões de cascudo preto (*Rhinelepis áspera*) submetidos a diferentes ciroprotetores. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

FUGI, R.; HAHN, N.S.; AGOSTINHO, A.A. Feeding of five species of bottom feeding fish of the Paraná River (PR, MS, Brasil). **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v.46, n.3, p.297-307, Sept. 1996.

FURUYA, W.M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. (Ed.). **Fundamentos da moderna aqüicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. p.83-90.

GANECO, L.N. **Análise dos ovos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Valenciennes, 1894), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida**. 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.351-360, maio/jun. 2007.

GODINHO, H.P.; MIRANDA, M.O.T.; GODINHO, A.L.; SANTOS, J.E. Pesca e biologia do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* no rio São Francisco. In: MIRANDA, M.O.T. (Org.). **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p.27-42.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil**: Subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, 1975. 848p.

HAGA, Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v.48, n.11, p.1569-1572, 1982.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E.; RALL, W.F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, June 1997.

HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebrafish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, Oct. 1983.

HIROSE, K.; ISHIDA, R.; SAKAI, K. Induced ovulation of ayu using HCG, with special reference to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation. **Bulletin Japanese of the Society Science Fish**, Tokyo, v.6, n.1, p.409-416, Jan. 1997.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, v.62, n.1, p.3-22, Jan. 2000.

HUBALÉK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, San Diego, v.46, n.1, p.205-229, Feb. 2003.

IHERING, R. von. A method for inducing fish to spawn. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.34, n.1, p.15-16, 1937.

JAOUL, A.; ROUBAUD, P. Resistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, v.60, n.1, p.3409-3419, 1982.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, n.1, p.67-75, Apr. 1996.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R. Stages embryonic developmental of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v.203, n.3, p.253-310, July 1995.

KOGER, C.S.; TEH, S.J.; HINTON, D.E. Variations of light and temperature regimes and resulting effects on reproductive parameters in Medaka (*Oryzias latipes*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.61, n.5, p.1287-1293, Nov. 1999.

KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, San Diego, v.45, n.1, p.60-67, Feb. 2002.

LANDINEZ, M.A.; SENHORINI, J.A.; SANABRIA, A.I. Desenvolvimento embrionário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.17, n.1, p.1-12, 2004.

LIMA, J.A.F. de; CHABALIN, E. A pesca no pantanal de Mato Grosso, rio Cuiabá: biologia e ecologia pesqueira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 2., 1981, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 1981. p.517-529.

LIU, K.; CHOU, T.; LIN, H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v.6, n.1, p.145-153, 1993.

LIU, X.H.; ZANG, T.; RAWSON, D.M. Effects of cooling and partial removal of yolk at the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, n.8, p.1719-1731, 2001.

LOPES, R.N.M.; SENHORINI, J.A.; SOARES, M.C.F. Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* GUNTHER, 1869, (PISCES, CHARACIDAE). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.8, n.1, p.25-39, 1995.

LUZ, R.K.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; FERREIRA, A.A. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, n.1, p.49-55, jan. 2001.

MACHADO, A.B.M.; FONSECA, G.A.B.; MACHADO, R.B.; AGUIAR, L.M.S.; LINS, L.V. **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 608p.

MADDOCK, B.G. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v.36, n.4, p.219-222, Oct. 1974.

MAGALHÃES, M.F.; SCHLOSSER, I.J.; COLLARES-PAREIRA, M.J. The role of life history in the relationship between population dynamics and environmental variability in two Mediterranean stream fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v.63, n.2, p.300-317, Apr. 2003.

MAGNUS, Y.; AR, A.; LUBZENS, E. Permeability and toxicity of H<sub>2</sub>O and DMSO to developing ornamental carp eggs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 5., 1995, Austin. **Proceedings...** Austin: University of Texas, 1995. p.2-8.

MARIA, A.N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento de semen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARTINS-QUEIROZ, M.F.; MATEUS, L.A.F.; GARUTTI, V.; VENERE, P.C. Reproductive biology of *Triportheus trifurcatus* (Castelnau, 1855) (Characiformes: Characidae) in the Middle Rio Araguaia, MT. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v.6, n.2, p.231-236, 2008.

MATKOVIC, M.V.; CUSSAC, V.E.; CUKIER, M. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (VALENCIENNES, 1840) EIGENMANN Y EIGENMANN, 1888 (PISCES, PIMELODIDAE): I., segmentación, morfogénesis y organogénesis temprana. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.45, n.1/2, p.39-50, 1985.

MAZZONI, R.; SILVA, A.P.F. Aspectos da história de vida de *Bryconamericus microcephalus* (Miranda Ribeiro) (Characiformes, Characidae) de um riacho costeiro de Mata Atlântica, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, MG, v.23, n.1, p.228-233, jan./fev. 2006.

MEDEIROS, R.F.; MORAIS, R.F.; MATEUS, L.A.F.; COSTA, R.M.R. Hábito alimentar de pacu - *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) na bacia do rio Cuiabá no Pantanal Mato-Grossense, Mato Grosso. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9., 2009, São Lourenço. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. 1 CD-ROM.

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

MOFFETT, I.J.J.; ALLEN, M.; FLANAGAN, C.; CROZIER, W.W.; KENNEDY, G.J.A. Fecundity, egg size and early hatchery survival for wild Atlantic salmon, from the River Bush. **Fisheries Management and Ecology**, Oxford, v.13, n.2, p.73-79, Apr. 2006.

MORRIS, G.J.; WATSON, P.F. Cold shock injury-a comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, London, v.5, n.4, p.352-372, Aug. 1984.

MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; FREITAS, R.T.F.; FREATO, T.A.; SANTOS, V.B. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 28p.

NAKATANI, K.A.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKARKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce**: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

NAVARRO, R.D.; OLIVEIRA, A.A.; RIBEIRO FILHO, O.P.; CARRACA, F.P.; PEREIRA, F.K.S.; SANTOS, L.C. Reprodução induzida de curimbatá (*Prochilodus affinis*) com uso de extrato bruto hipofisário de rã touro (*Rana catesbeiana*). **Zootecnia Tropical**, Maracay, v.25, n.2, p.143-147, 2007.

NEVES, P.R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Woburn, v.35, n.1, p.109-124, 1991.

OYAKAMA, O.T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. **Peixes de riachos da Mata Atlântica nas unidades de conservação do Vale do rio Ribeira de Iguapé no Estado de São Paulo**. São Paulo: Neotrópica, 2006. 201p.

PAIVA, M.P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra, 1982. 292p.

PEREIRA, G.J.M.; MURGAS, L.D.S.; SILVA, J.M.A.; MILIORINI, A.B.; LOGATO, P.V.R.; LIMA, D. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG e EBHC. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.56, n.2, p.156-160, mar./abr. 2009.

PEREIRA, G.J.M.; BOTTA, P.; SCIARA, A.; ARRANZ, S.; MURGAS, L.D.S.; PAULINO, M.S. Estudo de desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JUNIOR, C.J. **Check list of the freshwater fisher of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742p.

RIBEIRO, C.R.; SANTOS, H.S.L.; BOLZAN, A.A. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu). **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.55, n.1, p.65-78, jan./mar. 1995.

ROBERTSON, S.M. et al. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.50, n.3, p.148-154, June 1988.

ROMAGOSA, E. **Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultraestrutura) e indução da reprodução do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro, Vale do Ribeira, São Paulo**. 1988. 218f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas e da Saúde)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ROMAGOSA, E. **Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento**. 1991. 177f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

ROMAGOSA, E.; DEPAIVA, P.; GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (*Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, Amsterdam, v.86, n.1, p.105-110, Apr. 1990.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; FENERICH-VERANI, N. Stages embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (PISCES, CHARACIDAE). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, n.1, p.27-32, jan. 2001.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M.; STORFER, E.B. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.40, n.1, p.60-64, 1988.

ROUBAUD, P.; CHAILLOU, C.; SJAFEI, D. Variations cycliques de la tolerance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de l'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v.63, n.3, p.657-663, 1985.



SAMPAIO, E.V.; SATO, Y. Aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Osteichthyes, Anostomidae) da Bacia do Rio São Francisco, submetido à desova induzida. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.1, p.157-165, fev. 2009.

SANCHES, E.A.; BAGGIO, D.M.; BOMBARDELLI, R.A.; SOUZA, B.E.; PIANA, P.A.; VIDAL, E. Fertilização artificial de ovócitos de pacu *Piaractus mesopotamicus* por meio de diferentes volumes de água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2007. 1 CD-ROM.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; GODINHO, A.L.; GODINHO, H.P. Hypophysation of the fish *Prochilodus affinis* from the Rio São Francisco basin, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.48, n.1, p.55-62, 1996a. Suplemento.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; GODINHO, A.L.; GODINHO, H.P. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.56, n.1, p.59-64, jan./mar. 1996b.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC-Minas, 2003. p.257-289.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.P.; VERANI, J.R.; VIEIRA, L.J.S. Reprodução induzida do matrinhã *Brycon lundii* Reinhardt, 1877, da bacia do rio São Francisco. In: SEMINÁRIO REGIONAL DE ECOLOGIA, 8., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 1997. v.8, p.353-359.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R.; VIEIRA, L.J.S.; GODINHO, H.P. Induced reproductive responses of the neotropical anostomids fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. **Aquaculture Research**, Oxford, v.11, n.1, p.189-193, 2000.

SATO, Y.; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, MG, v.23, n.1, p.267-273, jan./fev. 2006.

SHATUNOVSKIY, M.I. Some indices of reproductive ability of fishes. **Journal of Ichthyology**, Silver Spring, v.28, n.3, p.119-123, 1988.

SILVA, M.O.B. **Reprodução de peixes**: princípios básicos de piscicultura. Itutinga: CEMIG, 2000. 25p.

STONECYPHER JUNIOR, R.W.; HUBERT, W.A.; GERN, W.A. Effect of reduced incubation temperatures on survival of trout embryos. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.56, n.3, p.180-184, June 1994.

STOSS, J.; DONALDSON, E.M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.31, n.1, p.51-65, Feb. 1983.

STREIT JUNIOR, D.P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*)**. 2005. 75p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

STREIT JUNIOR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; CARDOZO, R.M.; MOREIRA, H.L.M. As técnicas da utilização do extrato de hipófise na reprodução de peixes: revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Cascavel, v.5, n.2, p.231-238, 2002.

STREIT JUNIOR, D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.8, p.119-122, ago. 2007.

TARKAN, A.S. Reproductive ecology of two cyprinid fishes in an oligotrophic lake near the southern limits of their distribution range. **Ecology of Freshwater Fish**, Copenhagen, v.15, n.2, p.131-138, Mar. 2006.

URBÁNYI, B.; BARANYAI, B.; MAGYARY, I.; DINNYES, A. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different developmental stages. **Theriogenology**, Stoneham, v.47, n.1, p.408, 1997.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos**: teoria e prática. Maringá: EDUEM, 1996. 169p.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book**: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Eugene: University of Oregon, 1993. 300p.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v.19, n.3, p.135-138, Sept. 1997.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, Surrey, v.24, n.5, p.438-450, Oct. 2001.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 1989. 225p.

ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.56, n.4, p.655-659, jul./ago. 1996.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, maio/jun. 2007.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, San Diego, v.32, n.3, p.239-246, Apr. 1995.

ZHANG, Y.Z.; ZANG, S.C.; LIU, X.Z.; XU, Y.J.; HU, J.H.; XU, Y.Y.; LI, J.; CHEN, S.L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, n.3, p.763-773, June 2004.

ZOAR, Y.; MYLONAS, C.C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In: WORKSHOP HOSTED, 1., 1999, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier, 1999. p.99-136.

## ANEXO

Análises estatísticas para os dados da espécie curimba (*Prochilodus lineatus*)

### Regression Analysis: Pluviosidade versus Eficiência Reprodutiva

The regression equation is  
Pluviosidade = 354 - 1,28 C4

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	353,97	97,67	3,62	0,001
C4	-1,278	1,093	-1,17	0,254

S = 111,238 R-Sq = 5,6% R-Sq(adj) = 1,5%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	16907	16907	1,37	0,254
Residual Error	23	284597	12374		
Total	24	301504			

#### Unusual Observations

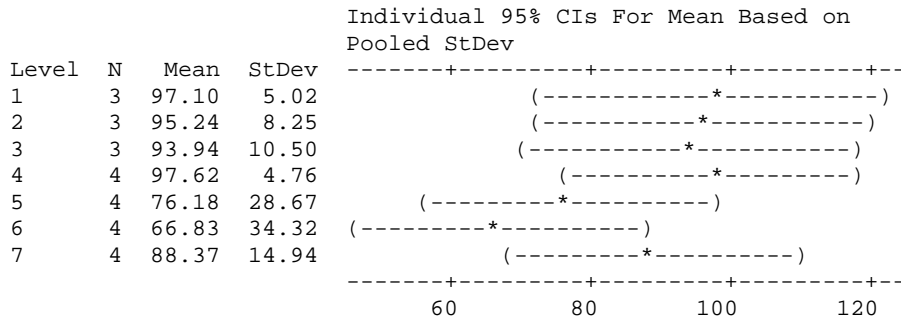
Obs	C4	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
5	33	150,0	311,4	62,7	-161,4	-1,76 X
6	41	555,0	301,1	54,6	253,9	2,62RX
9	33	280,0	311,4	62,7	-31,4	-0,34 X
24	100	470,0	226,2	26,4	243,8	2,26R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

### One-way ANOVA: Eficiência Reprodutiva versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	3209	535	1.35	0.288
Error	18	7144	397		
Total	24	10353			

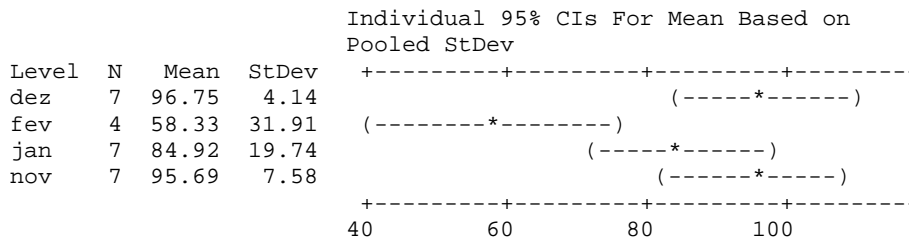
S = 19.92 R-Sq = 30.99% R-Sq(adj) = 7.99%



### One-way ANOVA: Eficiência Reprodutiva versus MÊS

Source	DF	SS	MS	F	P
MÊS	3	4511	1504	5.41	0.006
Error	21	5841	278		
Total	24	10353			

S = 16.68 R-Sq = 43.58% R-Sq(adj) = 35.51%



### Regression Analysis: Pluviosidade versus Peso da desova

The regression equation is  
 Pluviosidade = 269 - 0.0833 PO

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	268.97	12.77	21.06	0.000
PO	-0.08325	0.04824	-1.73	0.085

S = 105.160 R-Sq = 0.9% R-Sq(adj) = 0.6%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	32938	32938	2.98	0.085
Residual Error	337	3726745	11059		
Total	338	3759683			

Unusual Observations

Obs	PO	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
51	550	175.00	223.18	16.15	-48.18	-0.46 X
76	106	555.00	260.14	8.51	294.86	2.81R
77	220	555.00	250.65	5.77	304.35	2.90R
78	64	555.00	263.64	10.11	291.36	2.78R
79	147	555.00	256.73	7.17	298.27	2.84R
80	133	555.00	257.89	7.60	297.11	2.83R
81	72	555.00	262.97	9.79	292.03	2.79R
82	132	555.00	257.98	7.63	297.02	2.83R
83	68	555.00	263.30	9.95	291.70	2.79R
84	78	555.00	262.47	9.56	292.53	2.79R
102	515	220.00	226.09	14.58	-6.09	-0.06 X
195	535	310.00	224.42	15.48	85.58	0.82 X
199	760	310.00	205.69	25.88	104.31	1.02 X
204	600	310.00	219.01	18.43	90.99	0.88 X
209	535	280.00	224.42	15.48	55.58	0.53 X
215	580	280.00	220.68	17.51	59.32	0.57 X
265	274	460.00	246.15	5.99	213.85	2.04R
273	545	460.00	223.59	15.92	236.41	2.27RX
276	284	460.00	245.32	6.15	214.68	2.04R
279	309	460.00	243.24	6.69	216.76	2.07R
294	525	170.00	225.26	15.03	-55.26	-0.53 X
318	161	470.00	255.56	6.78	214.44	2.04R
319	196	470.00	252.65	6.04	217.35	2.07R
320	257	470.00	247.57	5.79	222.43	2.12R
321	130	470.00	258.14	7.69	211.86	2.02R
322	194	470.00	252.81	6.07	217.19	2.07R
323	423	470.00	233.75	10.64	236.25	2.26R
324	189	470.00	253.23	6.16	216.77	2.06R
325	147	470.00	256.73	7.17	213.27	2.03R
326	180	470.00	253.98	6.34	216.02	2.06R
327	167	470.00	255.06	6.63	214.94	2.05R
328	404	470.00	235.33	9.88	234.67	2.24R
329	217	470.00	250.90	5.79	219.10	2.09R
330	110	470.00	259.81	8.37	210.19	2.01R
331	220	470.00	250.65	5.77	219.35	2.09R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

## Regression Analysis: Pluviosidade versus Horas até a desova

The regression equation is  
 Pluviosidade = 271 - 0.0439 H

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	271.32	25.25	10.74	0.000
H	-0.04387	0.04887	-0.90	0.370

S = 105.498    R-Sq = 0.2%    R-Sq(adj) = 0.0%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	8966	8966	0.81	0.370
Residual Error	337	3750717	11130		
Total	338	3759683			

### Unusual Observations

Obs	H	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
74	830	150.00	234.91	16.97	-84.91	-0.82 X
75	850	150.00	234.03	17.89	-84.03	-0.81 X
76	405	555.00	253.55	7.47	301.45	2.86R
77	430	555.00	252.46	6.75	302.54	2.87R
78	450	555.00	251.58	6.29	303.42	2.88R
79	465	555.00	250.92	6.03	304.08	2.89R
80	480	555.00	250.26	5.84	304.74	2.89R
81	450	555.00	251.58	6.29	303.42	2.88R
82	470	555.00	250.70	5.95	304.30	2.89R
83	480	555.00	250.26	5.84	304.74	2.89R
84	533	555.00	247.94	5.91	307.06	2.92R
111	848	265.00	234.12	17.80	30.88	0.30 X
112	901	265.00	231.80	20.27	33.20	0.32 X
114	837	265.00	234.60	17.29	30.40	0.29 X
117	773	265.00	237.41	14.38	27.59	0.26 X
118	845	265.00	234.25	17.66	30.75	0.30 X
169	1395	260.00	210.13	43.96	49.87	0.52 X
211	30	280.00	270.00	23.83	10.00	0.10 X
264	505	460.00	249.17	5.73	210.83	2.00R
266	520	460.00	248.51	5.79	211.49	2.01R
269	525	460.00	248.29	5.83	211.71	2.01R
270	505	460.00	249.17	5.73	210.83	2.00R
276	585	460.00	245.66	6.99	214.34	2.04R
277	570	460.00	246.32	6.60	213.68	2.03R
278	605	460.00	244.78	7.59	215.22	2.05R
298	1410	75.00	209.47	44.69	-134.47	-1.41 X
300	15	75.00	270.66	24.54	-195.66	-1.91 X

318	385	470.00	254.43	8.14	215.57	2.05R
319	370	470.00	255.09	8.67	214.91	2.04R
320	443	470.00	251.89	6.44	218.11	2.07R
321	460	470.00	251.14	6.11	218.86	2.08R
322	545	470.00	247.41	6.08	222.59	2.11R
323	535	470.00	247.85	5.94	222.15	2.11R
324	505	470.00	249.17	5.73	220.83	2.10R
325	525	470.00	248.29	5.83	221.71	2.10R
326	406	470.00	253.51	7.44	216.49	2.06R
327	435	470.00	252.24	6.63	217.76	2.07R
328	1375	470.00	211.00	42.99	259.00	2.69RX
329	420	470.00	252.90	7.03	217.10	2.06R
330	487	470.00	249.96	5.78	220.04	2.09R
331	475	470.00	250.48	5.89	219.52	2.08R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

### Regression Analysis: Peso das fêmeas versus Peso da desova

The regression equation is  
 $C3 = 902 + 3.62 PO$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	901.67	65.10	13.85	0.000
PO	3.6248	0.2459	14.74	0.000

S = 535.989    R-Sq = 39.2%    R-Sq(adj) = 39.0%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	62437759	62437759	217.34	0.000
Residual Error	337	96814630	287284		
Total	338	159252389			

#### Unusual Observations

Obs	PO	C3	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
19	100	100.0	1264.1	44.5	-1164.1	-2.18R
43	200	2800.0	1626.6	30.5	1173.4	2.19R
51	550	4000.0	2895.3	82.3	1104.7	2.09RX
58	290	3800.0	1952.9	31.9	1847.1	3.45R
81	72	2500.0	1162.7	49.9	1337.3	2.51R
85	315	3300.0	2043.5	34.9	1256.5	2.35R
102	515	3100.0	2768.4	74.3	331.6	0.62 X
129	287	3600.0	1942.0	31.6	1658.0	3.10R



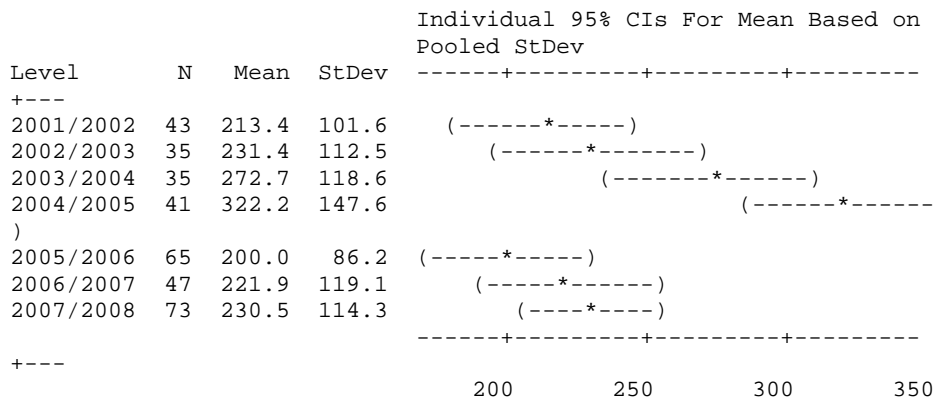
155	111	2400.0	1304.0	42.5	1096.0	2.05R
160	200	2700.0	1626.6	30.5	1073.4	2.01R
177	182	2700.0	1561.4	32.1	1138.6	2.13R
178	133	2800.0	1383.8	38.7	1416.2	2.65R
179	141	2500.0	1412.8	37.5	1087.2	2.03R
191	388	3600.0	2308.1	47.2	1291.9	2.42R
195	535	3000.0	2840.9	78.9	159.1	0.30 X
199	760	3100.0	3656.5	131.9	-556.5	-1.07 X
204	600	2800.0	3076.5	93.9	-276.5	-0.52 X
209	535	2700.0	2840.9	78.9	-140.9	-0.27 X
215	580	2400.0	3004.0	89.3	-604.0	-1.14 X
247	220	2900.0	1699.1	29.4	1200.9	2.24R
261	69	2700.0	1151.8	50.5	1548.2	2.90R
273	545	3500.0	2877.2	81.2	622.8	1.18 X
290	135	2500.0	1391.0	38.4	1109.0	2.07R
294	525	3000.0	2804.7	76.6	195.3	0.37 X
311	363	3600.0	2217.5	42.5	1382.5	2.59R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

### One-way ANOVA: Peso da desoba versus Piracemas

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	469820	78303	6.07	0.000
Error	332	4282227	12898		
Total	338	4752047			

S = 113.6    R-Sq = 9.89%    R-Sq(adj) = 8.26%

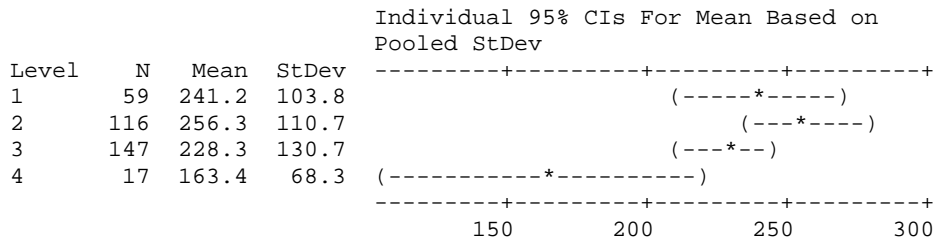


### One-way ANOVA: Peso da desova versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	147518	49173	3.58	0.014

Error 335 4604529 13745  
 Total 338 4752047

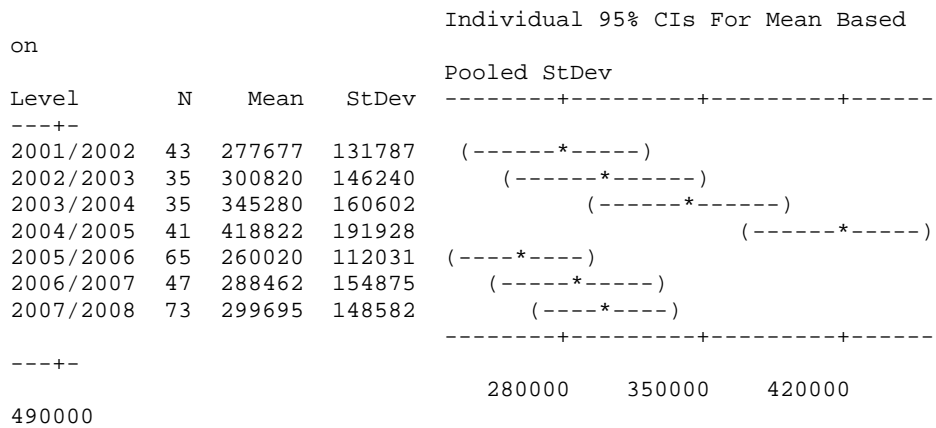
S = 117.2 R-Sq = 3.10% R-Sq(adj) = 2.24%



### One-way ANOVA: FI versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	7.65779E+11	1.27630E+11	5.80	0.000
Error	332	7.30312E+12	21997363650		
Total	338	8.06890E+12			

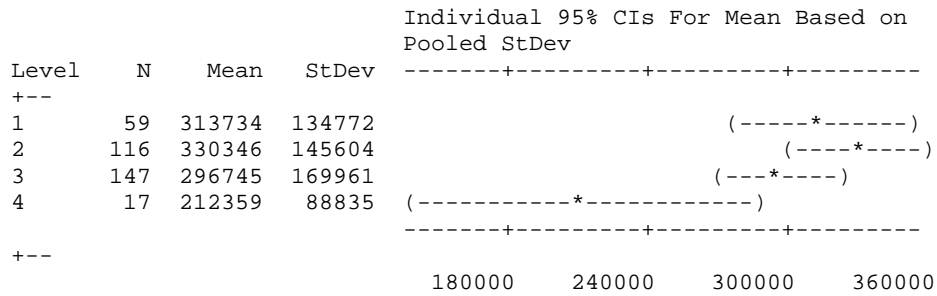
S = 148315 R-Sq = 9.49% R-Sq(adj) = 7.85%



### One-way ANOVA: FI versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	2.33625E+11	77875079390	3.33	0.020
Error	335	7.83528E+12	23388890940		
Total	338	8.06890E+12			

S = 152934 R-Sq = 2.90% R-Sq(adj) = 2.03%



### Regression Analysis: Pluviosidade versus TF

The regression equation is  
 Pluviosidade = 228 + 0.493 TF

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	227.784	8.990	25.34	0.000
TF	0.4930	0.1605	3.07	0.002

S = 104.175    R-Sq = 2.7%    R-Sq(adj) = 2.4%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	102423	102423	9.44	0.002
Residual Error	337	3657260	10852		
Total	338	3759683			

#### Unusual Observations

Obs	TF	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
76	78.5	555.00	266.48	7.97	288.52	2.78R
77	95.7	555.00	274.96	10.10	280.04	2.70R
78	59.0	555.00	256.87	6.18	298.13	2.87R
79	66.6	555.00	260.62	6.76	294.38	2.83R
80	44.6	555.00	249.77	5.66	305.23	2.93R
81	36.7	555.00	245.86	5.76	309.14	2.97R
82	54.0	555.00	254.40	5.90	300.60	2.89R
83	13.0	555.00	234.19	7.49	320.81	3.09R
84	9.0	555.00	232.22	7.92	322.78	3.11R
262	42.9	460.00	248.94	5.66	211.06	2.03R
264	15.6	460.00	235.50	7.21	224.50	2.16R
265	13.4	460.00	234.41	7.44	225.59	2.17R

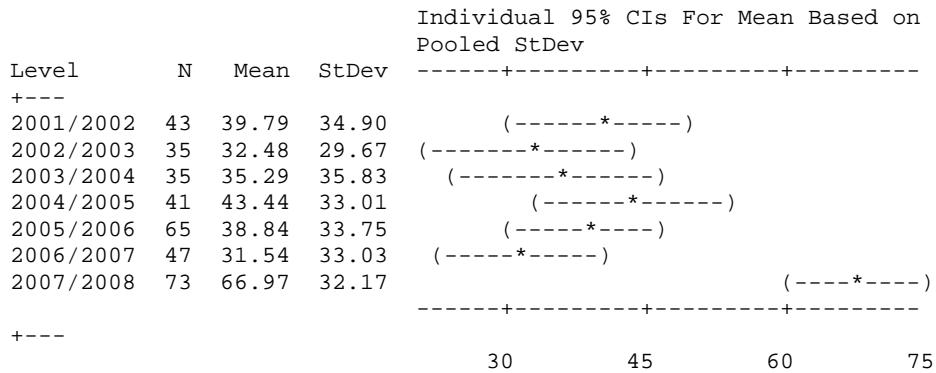
266	0.0	460.00	227.78	8.99	232.22	2.24R
269	0.0	460.00	227.78	8.99	232.22	2.24R
270	31.8	460.00	243.47	5.96	216.53	2.08R
271	33.3	460.00	244.22	5.89	215.78	2.07R
274	19.9	460.00	237.58	6.81	222.42	2.14R
276	7.8	460.00	231.62	8.06	228.38	2.20R
278	27.0	460.00	241.08	6.25	218.92	2.11R
279	24.8	460.00	240.00	6.41	220.00	2.12R
318	45.7	470.00	250.31	5.67	219.69	2.11R
320	61.1	470.00	257.92	6.32	212.08	2.04R
321	17.9	470.00	236.63	6.99	233.37	2.25R
323	42.4	470.00	248.70	5.66	221.30	2.13R
325	63.6	470.00	259.12	6.51	210.88	2.03R
327	65.1	470.00	259.86	6.63	210.14	2.02R
328	0.0	470.00	227.78	8.99	242.22	2.33R
330	0.0	470.00	227.78	8.99	242.22	2.33R

R denotes an observation with a large standardized residual.

### One-way ANOVA: TF versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	55557	9259	8.40	0.000
Error	332	365901	1102		
Total	338	421458			

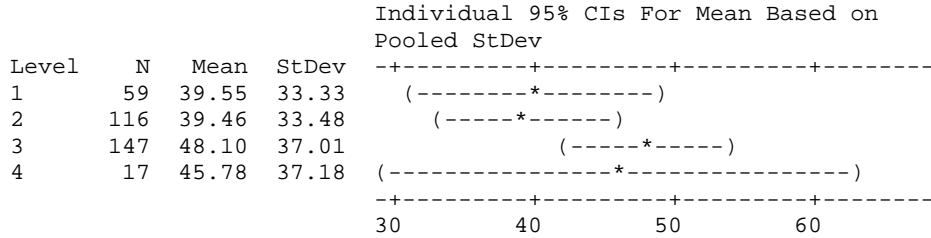
S = 33.20    R-Sq = 13.18%    R-Sq(adj) = 11.61%



### One-way ANOVA: TF versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	6023	2008	1.62	0.185
Error	335	415435	1240		
Total	338	421458			

S = 35.22 R-Sq = 1.43% R-Sq(adj) = 0.55%

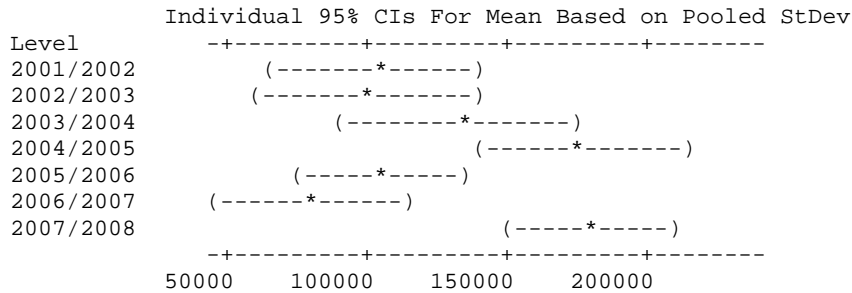


### One-way ANOVA: FF versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	4.93297E+11	82216170893	5.52	0.000
Error	332	4.94272E+12	14887723075		
Total	338	5.43602E+12			

S = 122015 R-Sq = 9.07% R-Sq(adj) = 7.43%

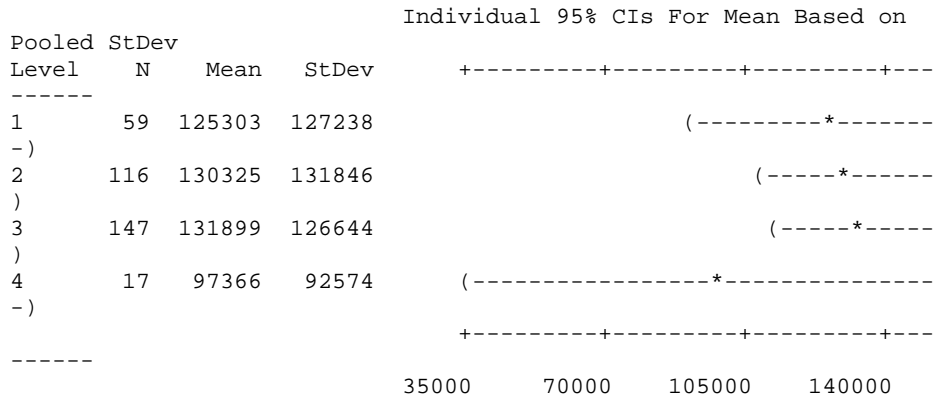
Level	N	Mean	StDev
2001/2002	43	103217	95687
2002/2003	35	100082	120918
2003/2004	35	132542	157284
2004/2005	41	175821	150276
2005/2006	65	106798	112355
2006/2007	47	78085	96625
2007/2008	73	180195	122432



### One-way ANOVA: FF versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	19166586440	6388862147	0.40	0.757
Error	335	5.41685E+12	16169714925		
Total	338	5.43602E+12			

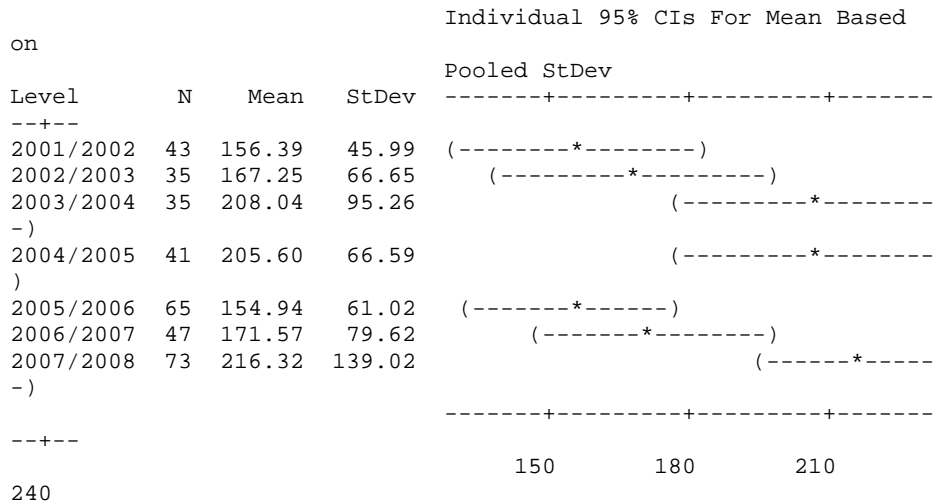
S = 127160 R-Sq = 0.35% R-Sq(adj) = 0.00%



### One-way ANOVA: FIR versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	220278	36713	4.60	0.000
Error	332	2647047	7973		
Total	338	2867325			

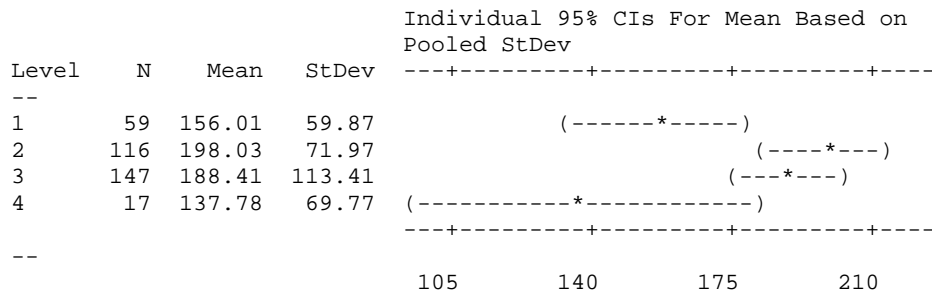
S = 89.29 R-Sq = 7.68% R-Sq(adj) = 6.01%



### One-way ANOVA: FIR versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	108154	36051	4.38	0.005
Error	335	2759170	8236		
Total	338	2867325			

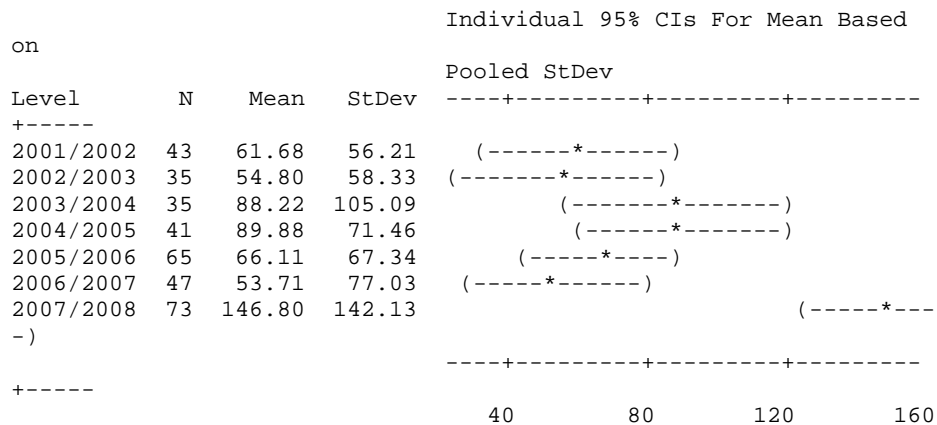
S = 90.75    R-Sq = 3.77%    R-Sq(adj) = 2.91%



### One-way ANOVA: FFR versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	404611	67435	7.87	0.000
Error	332	2845772	8572		
Total	338	3250384			

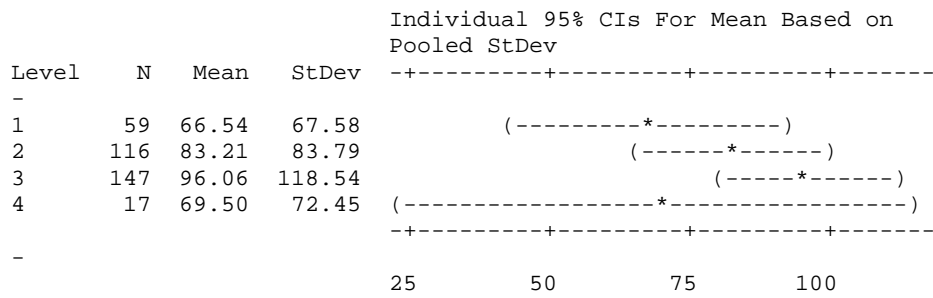
S = 92.58    R-Sq = 12.45%    R-Sq(adj) = 10.87%



### One-way ANOVA: FFR versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	42528	14176	1.48	0.220
Error	335	3207855	9576		
Total	338	3250384			

S = 97.86    R-Sq = 1.31%    R-Sq(adj) = 0.42%





Análises estatísticas para os dados da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

### Regression Analysis: Pluviosidade versus Eficiência reprodutiva

The regression equation is  
 Pluviosidade = 262 - 0,21 Eficiência reprodutiva (%)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	262,2	119,9	2,19	0,040
Eficiência reprodutiva (%)	-0,209	1,408	-0,15	0,883

S = 118,093 R-Sq = 0,1% R-Sq(adj) = 0,0%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	308	308	0,02	0,883
Residual Error	21	292866	13946		
Total	22	293174			

#### Unusual Observations

Obs	Eficiência reprodutiva (%)	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
6	63	555,0	249,1	38,3	305,9	2,74R

R denotes an observation with a large standardized residual.

### One-way ANOVA: Eficiência reprodutiva versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	3338	556	2,41	0,075
Error	16	3699	231		
Total	22	7037			

S = 15,21 R-Sq = 47,43% R-Sq(adj) = 27,72%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
2001/2002	3	86,19	6,44	(-----*-----)
2002/2003	3	88,56	9,92	(-----*-----)
2003/2004	3	78,33	20,21	(-----*-----)
2004/2005	3	100,00	0,00	(-----*-----)
2005/2006	3	100,00	0,00	(-----*-----)
2006/2007	4	69,79	21,35	(-----*-----)
2007/2008	4	69,58	20,29	(-----*-----)

60                      80                      100                      120

### One-way ANOVA: Eficiência reprodutiva (%) versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	2071	690	2,64	0,079
Error	19	4966	261		
Total	22	7037			

S = 16,17    R-Sq = 29,43%    R-Sq(adj) = 18,29%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
dez	7	80,71	15,33	(-----*-----)
fev	2	55,00	7,07	(-----*-----)
jan	7	87,67	18,84	(-----*-----)
nov	7	89,72	15,15	(-----*-----)

40                      60                      80                      100

### Regression Analysis: Pluviosidade versus Horas até a desova

The regression equation is  
 Pluviosidade = 192 + 0,0771 Horas até a desova

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	192,04	24,83	7,73	0,000
Horas até a desova	0,07709	0,03172	2,43	0,017

S = 117,643    R-Sq = 4,7%    R-Sq(adj) = 3,9%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	81758	81758	5,91	0,017

Residual Error	120	1660796	13840
Total	121	1742554	

Unusual Observations

Obs	Horas até a desova	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
19	610	555,0	239,1	11,1	315,9	2,70R
20	670	555,0	243,7	10,7	311,3	2,66R

R denotes an observation with a large standardized residual.

### Regression Analysis: Pluviosidade versus Horas até a desova

The regression equation is  
 $Pluviosidade = 192,0 + 0,07709 \text{ Horas até a desova}$

S = 117,643    R-Sq = 4,7%    R-Sq(adj) = 3,9%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	81758	81757,6	5,91	0,017
Error	120	1660796	13840,0		
Total	121	1742554			

### Regression Analysis: Pluviosidade versus Peso da desova

The regression equation is  
 $Pluviosidade = 225 + 0,0694 \text{ Peso da desova}$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	224,72	32,20	6,98	0,000
Peso da desova	0,06945	0,09638	0,72	0,473

S = 120,244    R-Sq = 0,4%    R-Sq(adj) = 0,0%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	7507	7507	0,52	0,473
Residual Error	120	1735048	14459		

Total 121 1742554

Unusual Observations

Obs	Peso da desova	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
19	350	555,0	249,0	11,4	306,0	2,56R
20	350	555,0	249,0	11,4	306,0	2,56R
28	583	265,0	265,2	28,1	-0,2	-0,00 X
83	596	170,0	266,1	29,2	-96,1	-0,82 X
84	700	170,0	273,3	38,7	-103,3	-0,91 X
111	87	470,0	230,8	24,5	239,2	2,03R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
 X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

**Regression Analysis: Peso versus Peso da desova**

The regression equation is  
 Peso = 2262 + 2,41 Peso da desova

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	2262,1	199,8	11,32	0,000
Peso da desova	2,4120	0,5981	4,03	0,000

S = 746,121 R-Sq = 11,9% R-Sq(adj) = 11,2%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	9055139	9055139	16,27	0,000
Residual Error	120	66803632	556697		
Total	121	75858770			

Unusual Observations

Obs	Peso da desova	Peso	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
13	340	4700,0	3082,2	69,3	1617,8	2,18R
28	583	4500,0	3668,3	174,3	831,7	1,15 X
81	250	4500,0	2865,1	77,8	1634,9	2,20R
83	596	4000,0	3699,7	181,4	300,3	0,41 X
84	700	4300,0	3950,5	240,3	349,5	0,49 X
87	234	1300,0	2826,5	82,9	-1526,5	-2,06R

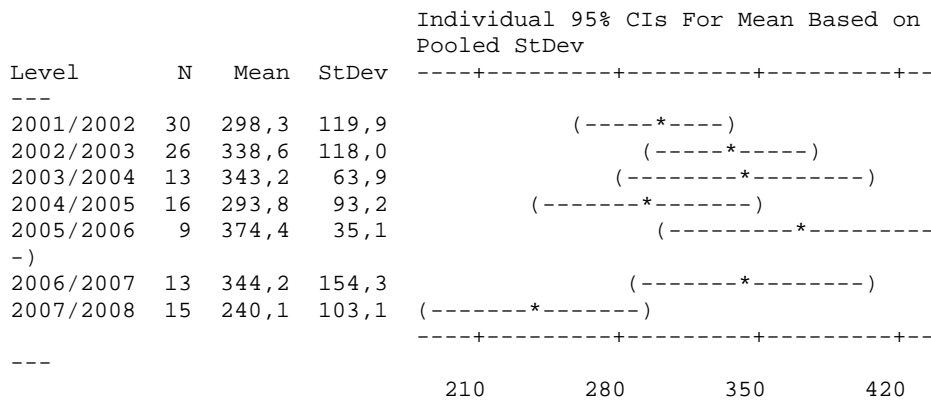
R denotes an observation with a large standardized residual.

X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

### One-way ANOVA: Peso da desova versus piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	167274	27879	2,31	0,039
Error	115	1389138	12079		
Total	121	1556412			

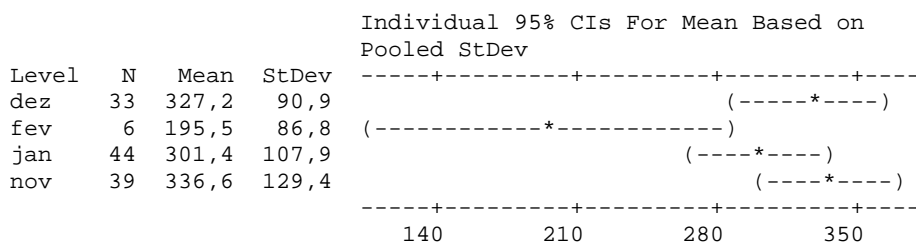
S = 109,9    R-Sq = 10,75%    R-Sq(adj) = 6,09%



### One-way ANOVA: Peso da desova versus mês

Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	116888	38963	3,19	0,026
Error	118	1439524	12199		
Total	121	1556412			

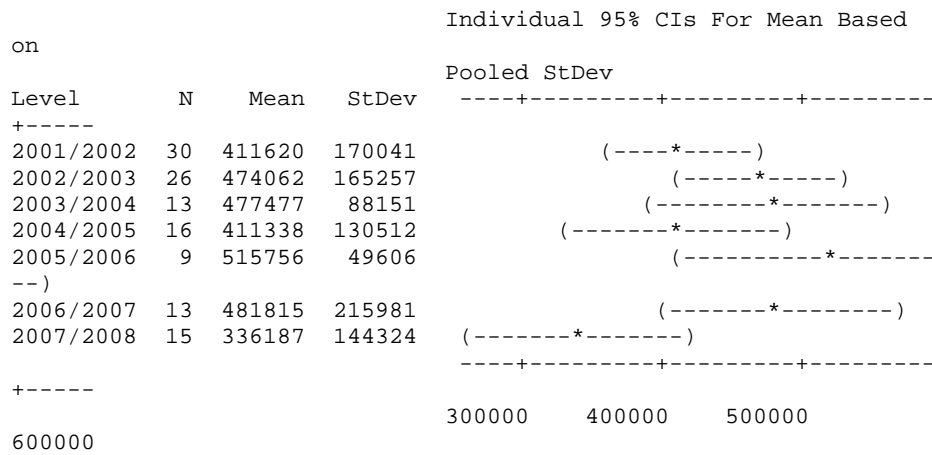
S = 110,5    R-Sq = 7,51%    R-Sq(adj) = 5,16%



### One-way ANOVA: FI versus piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	3,21177E+11	53529498409	2,25	0,044
Error	115	2,74108E+12	23835460231		
Total	121	3,06225E+12			

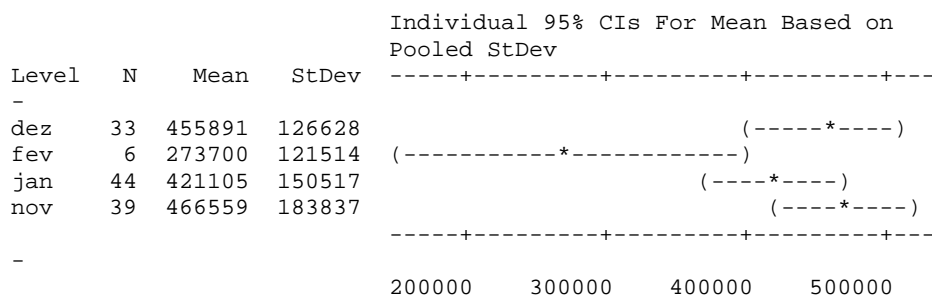
S = 154387    R-Sq = 10,49%    R-Sq(adj) = 5,82%



### One-way ANOVA: FI versus mês

Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	2,16894E+11	72297892109	3,00	0,033
Error	118	2,84536E+12	24113230854		
Total	121	3,06225E+12			

S = 155284    R-Sq = 7,08%    R-Sq(adj) = 4,72%



### Regression Analysis: Pluviosidade versus TF

The regression equation is

Pluviosidade = 261 - 0.265 TF

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	260.86	18.24	14.30	0.000
TF	-0.2651	0.2717	-0.98	0.331

S = 120.029 R-Sq = 0.8% R-Sq(adj) = 0.0%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	13715	13715	0.95	0.331
Residual Error	120	1728839	14407		
Total	121	1742554			

Unusual Observations

Obs	TF	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
19	96.0	555.0	235.4	15.8	319.6	2.69R
20	0.0	555.0	260.9	18.2	294.1	2.48R

R denotes an observation with a large standardized residual.

**One-way ANOVA: TF versus piracema**

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	55997	9333	7,72	0,000
Error	115	139114	1210		
Total	121	195111			

S = 34,78 R-Sq = 28,70% R-Sq(adj) = 24,98%

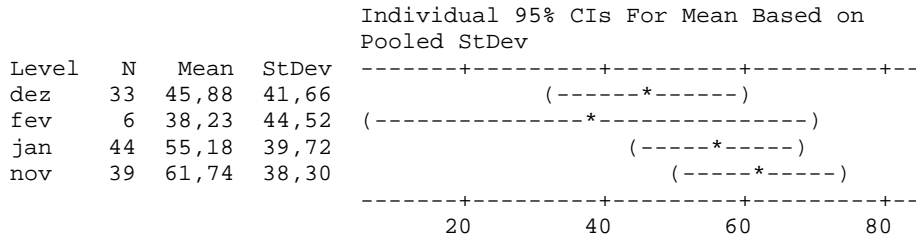
Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
2001/2002	30	30,98	34,72	(----*----)
2002/2003	26	78,07	30,69	(-----*-----)
2003/2004	13	68,56	31,04	(-----*-----)
2004/2005	16	62,29	44,44	(-----*-----)
2005/2006	9	77,83	33,96	(-----*-----)
2006/2007	13	54,80	38,46	(-----*-----)
2007/2008	15	21,28	29,81	(-----*-----)

100 25 50 75

**One-way ANOVA: TF versus mês**

Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	6064	2021	1,26	0,291
Error	118	189047	1602		
Total	121	195111			

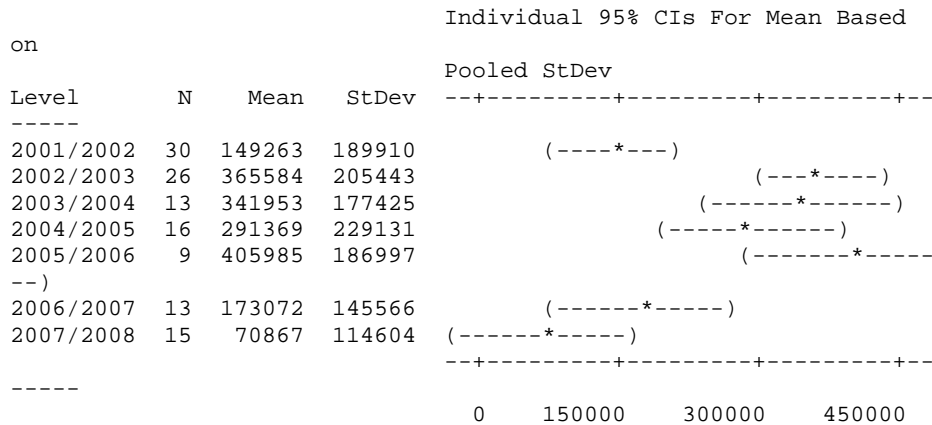
S = 40,03 R-Sq = 3,11% R-Sq(adj) = 0,64%



**One-way ANOVA: FF versus piracema**

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	1,56472E+12	2,60787E+11	7,53	0,000
Error	115	3,98424E+12	34645560926		
Total	121	5,54896E+12			

S = 186133 R-Sq = 28,20% R-Sq(adj) = 24,45%

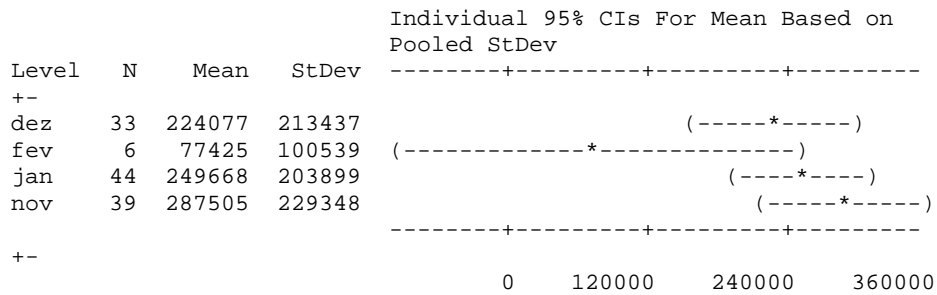


**One-way ANOVA: FF versus mês**



Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	2,54125E+11	84708426989	1,89	0,135
Error	118	5,29484E+12	44871491536		
Total	121	5,54896E+12			

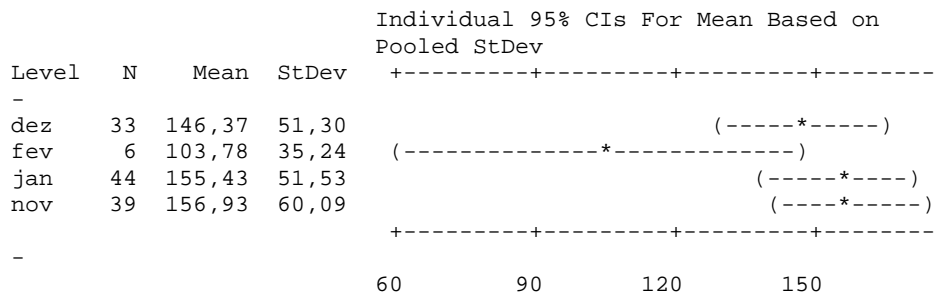
S = 211829 R-Sq = 4,58% R-Sq(adj) = 2,15%



### One-way ANOVA: FIR versus mês

Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	16318	5439	1,88	0,137
Error	118	341768	2896		
Total	121	358085			

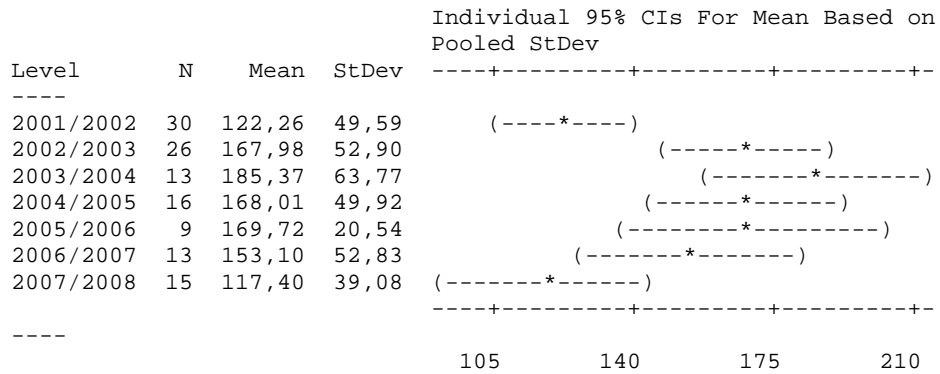
S = 53,82 R-Sq = 4,56% R-Sq(adj) = 2,13%



### One-way ANOVA: FIR versus piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	72390	12065	4,86	0,000
Error	115	285695	2484		
Total	121	358085			

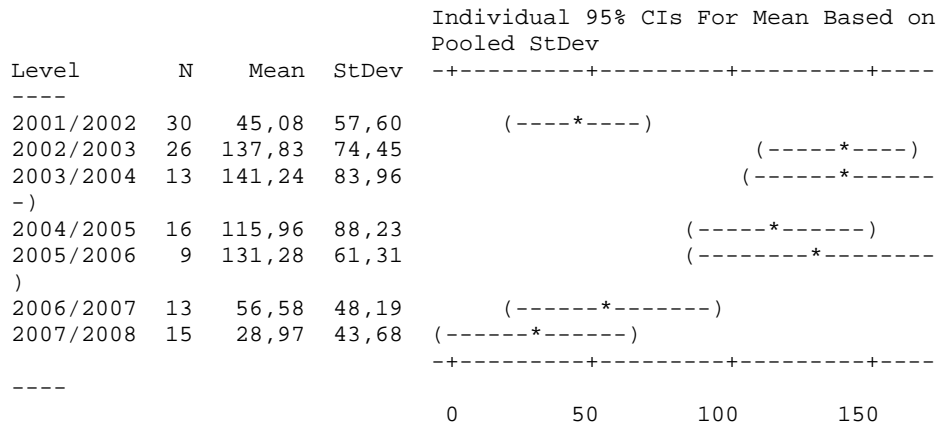
S = 49,84 R-Sq = 20,22% R-Sq(adj) = 16,05%



**One-way ANOVA: FFR versus piracema**

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	250685	41781	9,23	0,000
Error	115	520809	4529		
Total	121	771494			

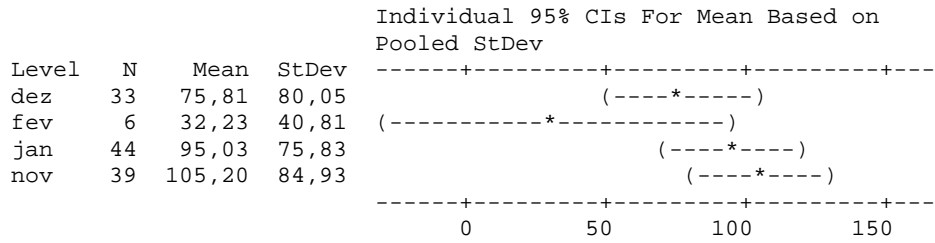
S = 67,30    R-Sq = 32,49%    R-Sq(adj) = 28,97%



**One-way ANOVA: FFR versus mês**

Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	36786	12262	1,97	0,122
Error	118	734707	6226		
Total	121	771494			

S = 78,91    R-Sq = 4,77%    R-Sq(adj) = 2,35%



Análises estatísticas para os dados da espécie piracanjuba (*Brycon orbignyana*)

### Regression Analysis: Pluviosidade versus eficiencia

The regression equation is  
 Pluviosidade = 341 - 127 eficiencia

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	341,24	56,55	6,03	0,000
eficiencia	-126,70	74,55	-1,70	0,105

S = 109,114 R-Sq = 12,6% R-Sq(adj) = 8,3%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	34390	34390	2,89	0,105
Residual Error	20	238119	11906		
Total	21	272509			

#### Unusual Observations

Obs	eficiencia	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
4	0,50	555,0	277,9	27,3	277,1	2,62R

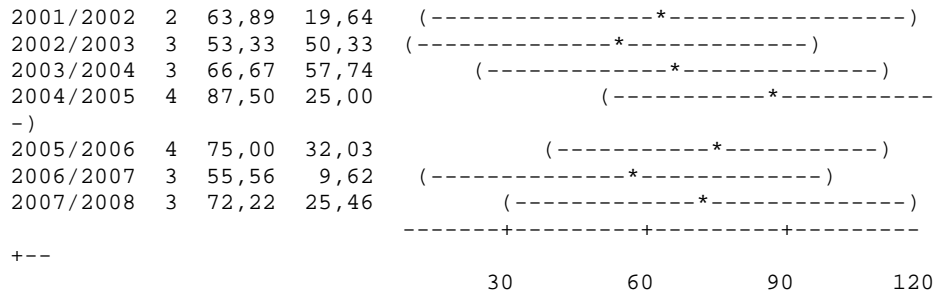
R denotes an observation with a large standardized residual.

### One-way ANOVA: eficiencia versus piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
piracema	6	2891	482	0,39	0,874
Error	15	18554	1237		
Total	21	21445			

S = 35,17 R-Sq = 13,48% R-Sq(adj) = 0,00%

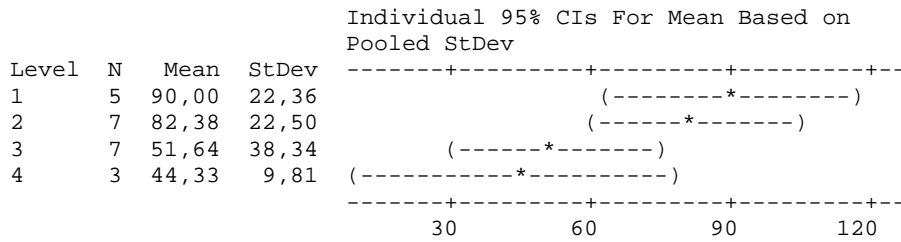
Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
---				-----+-----+-----+-----
---				



### One-way ANOVA: eficiencia versus mês

Source	DF	SS	MS	F	P
mês	3	7394	2465	3,16	0,050
Error	18	14051	781		
Total	21	21445			

S = 27,94 R-Sq = 34,48% R-Sq(adj) = 23,56%



### Regression Analysis: Pluviosidade versus Tempo de desova

The regression equation is  
 Pluviosidade = 260 - 0,0182 Tempo de desova

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	259,98	28,89	9,00	0,000
Tempo de desova	-0,01816	0,05603	-0,32	0,747

S = 104,426 R-Sq = 0,1% R-Sq(adj) = 0,0%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Regression	1	1145	1145	0,10	0,747
Residual Error	72	785142	10905		
Total	73	786286			

Unusual Observations

Obs	Tempo de desova	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
13	315	555,0	254,3	14,9	300,7	2,91R
61	1105	75,0	239,9	37,7	-164,9	-1,69 X
62	1060	75,0	240,7	35,3	-165,7	-1,69 X
68	495	470,0	251,0	12,2	219,0	2,11R
69	340	470,0	253,8	14,1	216,2	2,09R
70	1355	470,0	235,4	51,2	234,6	2,58RX
71	460	470,0	251,6	12,1	218,4	2,11R
72	385	470,0	253,0	13,0	217,0	2,09R
73	415	470,0	252,4	12,5	217,6	2,10R
74	465	470,0	251,5	12,1	218,5	2,11R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
 X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

**Regression Analysis: Pluviosidade versus Peso da desova**

The regression equation is  
 Pluviosidade = 320 - 0,458 Peso da desova

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	320,29	34,54	9,27	0,000
Peso da desova	-0,4583	0,2163	-2,12	0,038

S = 101,388    R-Sq = 5,9%    R-Sq(adj) = 4,6%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	46158	46158	4,49	0,038
Residual Error	72	740129	10280		
Total	73	786286			

Unusual Observations

Obs	Peso da desova	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
8	290	175,0	187,4	32,5	-12,4	-0,13 X

13	98	555,0	275,4	16,3	279,6	2,79R
19	20	280,0	311,1	30,5	-31,1	-0,32 X
59	308	170,0	179,1	36,1	-9,1	-0,10 X
68	177	470,0	239,2	13,1	230,8	2,30R
69	221	470,0	219,0	19,3	251,0	2,52R
70	116	470,0	267,1	13,9	202,9	2,02R
73	134	470,0	258,9	12,3	211,1	2,10R
74	142	470,0	255,2	11,9	214,8	2,13R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

### Regression Analysis: Peso das fêmeas versus Peso da desova

The regression equation is  
Peso = 1187 + 2,82 Peso da desova

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	1186,72	84,42	14,06	0,000
Peso da desova	2,8158	0,5285	5,33	0,000

S = 247,787    R-Sq = 28,3%    R-Sq(adj) = 27,3%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1742688	1742688	28,38	0,000
Residual Error	72	4420691	61398		
Total	73	6163378			

#### Unusual Observations

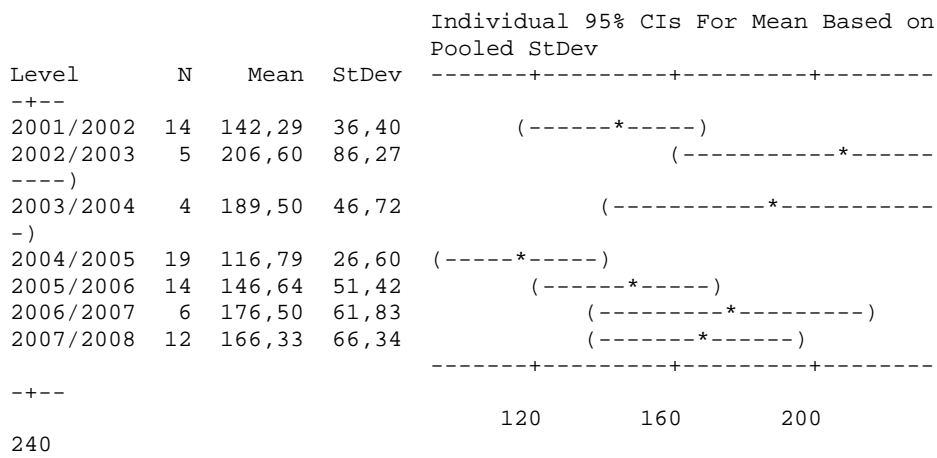
Obs	Peso da desova	Peso	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
8	290	1800,0	2003,3	79,3	-203,3	-0,87 X
19	20	1600,0	1243,0	74,6	357,0	1,51 X
30	140	900,0	1580,9	29,3	-680,9	-2,77R
52	256	1400,0	1907,5	62,9	-507,5	-2,12R
59	308	2300,0	2054,0	88,3	246,0	1,06 X
68	177	2500,0	1685,1	32,1	814,9	3,32R
69	221	2300,0	1809,0	47,2	491,0	2,02R

R denotes an observation with a large standardized residual.  
X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

### One-way ANOVA: Peso da desova versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	51619	8603	3,43	0,005
Error	67	168182	2510		
Total	73	219801			

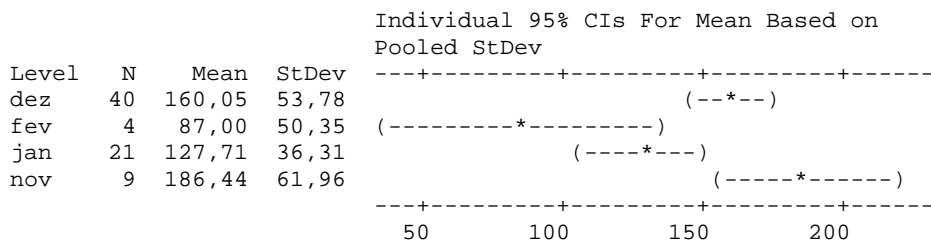
S = 50,10    R-Sq = 23,48%    R-Sq(adj) = 16,63%



### One-way ANOVA: Peso da desova versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	42298	14099	5,56	0,002
Error	70	177502	2536		
Total	73	219801			

S = 50,36    R-Sq = 19,24%    R-Sq(adj) = 15,78%



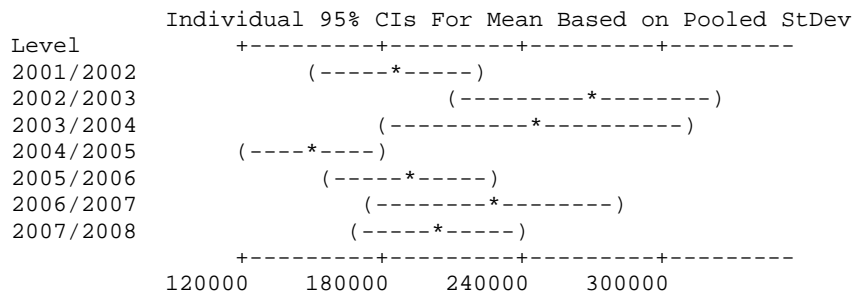
### One-way ANOVA: FI versus Piracema



Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	81317434556	13552905759	3,24	0,007
Error	67	2,79920E+11	4177907334		
Total	73	3,61237E+11			

S = 64637    R-Sq = 22,51%    R-Sq(adj) = 15,57%

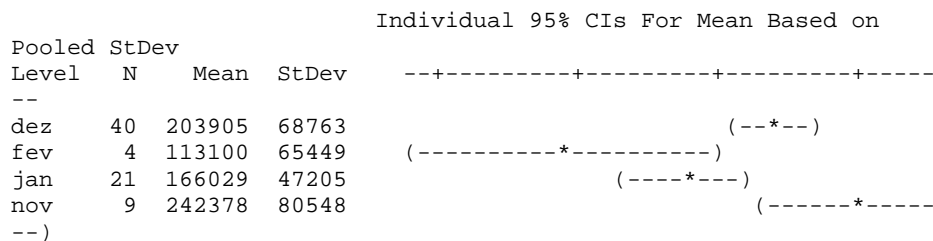
Level	N	Mean	StDev
2001/2002	14	184971	47321
2002/2003	5	268580	112153
2003/2004	4	246350	60730
2004/2005	19	151826	34579
2005/2006	14	190636	66845
2006/2007	6	226633	80326
2007/2008	12	203775	83970

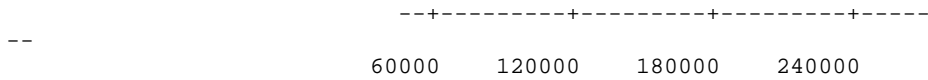


### One-way ANOVA: FI versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	67512508533	22504169511	5,36	0,002
Error	70	2,93725E+11	4196067392		
Total	73	3,61237E+11			

S = 64777    R-Sq = 18,69%    R-Sq(adj) = 15,20%





### Regression Analysis: Pluviosidade versus TF

The regression equation is  
 Pluviosidade = 277 - 0,558 TF

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	277,33	19,74	14,05	0,000
TF	-0,5583	0,3397	-1,64	0,105

S = 102,596    R-Sq = 3,6%    R-Sq(adj) = 2,3%

#### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	28425	28425	2,70	0,105
Residual Error	72	757861	10526		
Total	73	786286			

#### Unusual Observations

Obs	TF	Pluviosidade	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
13	0,0	555,0	277,3	19,7	277,7	2,76R
69	45,2	470,0	252,1	11,9	217,9	2,14R
73	77,3	470,0	234,2	15,9	235,8	2,33R

R denotes an observation with a large standardized residual.

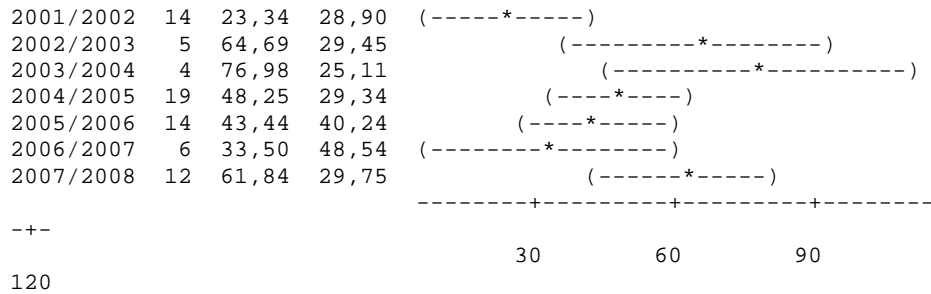
### One-way ANOVA: TF versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	16907	2818	2,54	0,028
Error	67	74290	1109		
Total	73	91197			

S = 33,30    R-Sq = 18,54%    R-Sq(adj) = 11,24%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

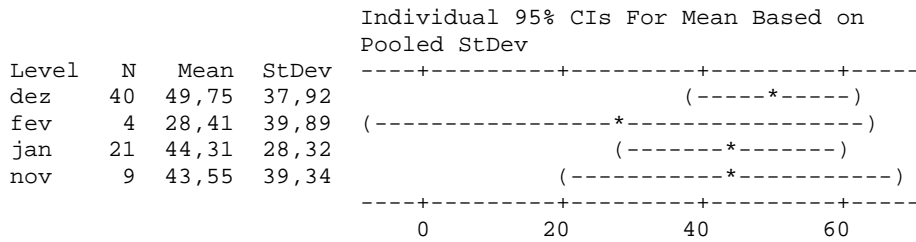
Level	N	Mean	StDev
--+-			



### One-way ANOVA: TF versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	1907	636	0,50	0,685
Error	70	89290	1276		
Total	73	91197			

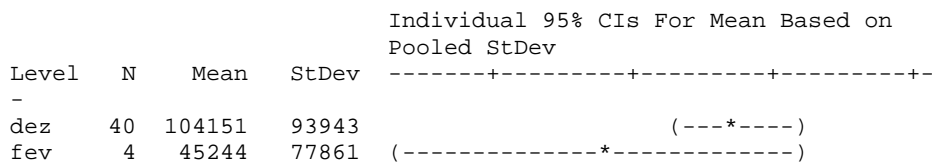
S = 35,72 R-Sq = 2,09% R-Sq(adj) = 0,00%



### One-way ANOVA: FF versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	25423707909	8474569303	1,11	0,349
Error	70	5,32382E+11	7605456885		
Total	73	5,57806E+11			

S = 87209 R-Sq = 4,56% R-Sq(adj) = 0,47%

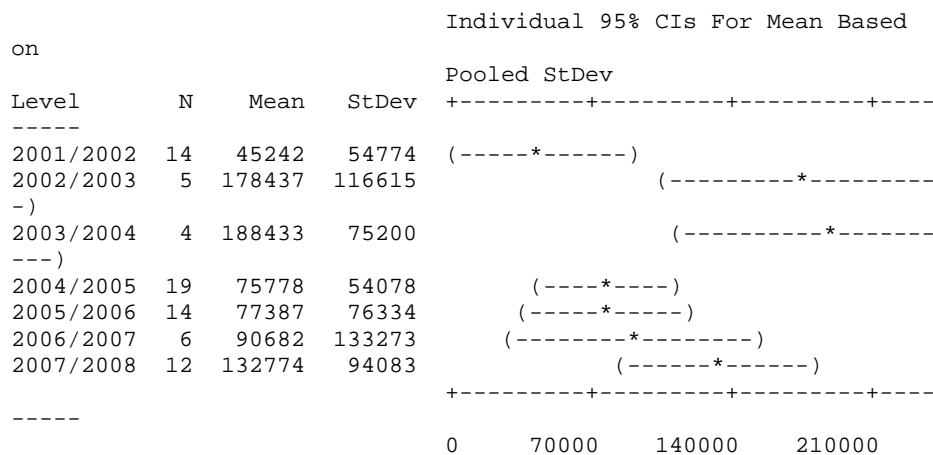




### One-way ANOVA: FF versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	1,32877E+11	22146223504	3,49	0,005
Error	67	4,24928E+11	6342214161		
Total	73	5,57806E+11			

S = 79638 R-Sq = 23,82% R-Sq(adj) = 17,00%

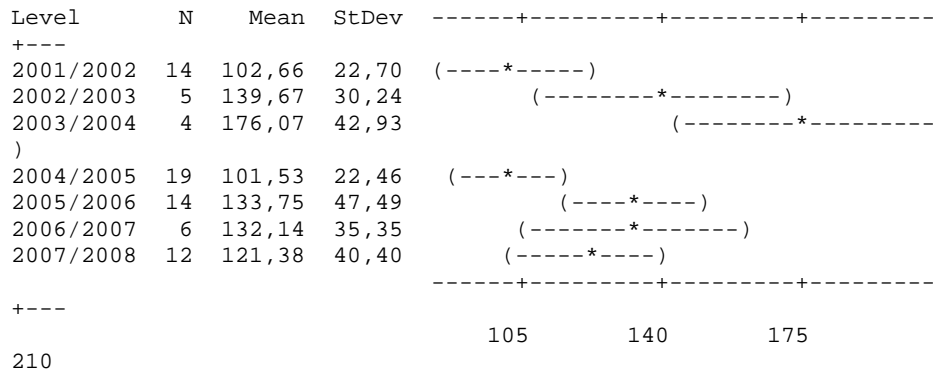


### One-way ANOVA: FIR versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	28755	4792	4,09	0,001
Error	67	78476	1171		
Total	73	107231			

S = 34,22 R-Sq = 26,82% R-Sq(adj) = 20,26%

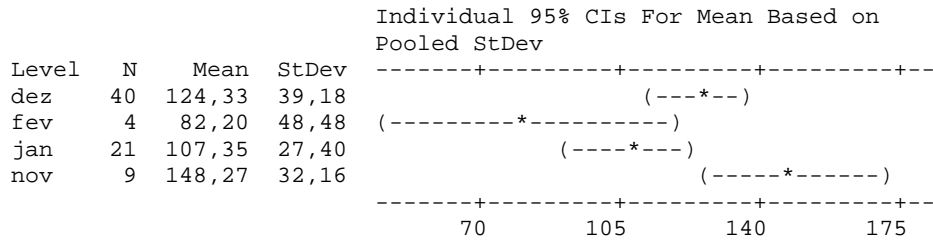
Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev



### One-way ANOVA: FIR versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	17017	5672	4,40	0,007
Error	70	90214	1289		
Total	73	107231			

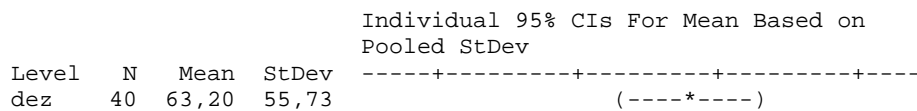
S = 35,90    R-Sq = 15,87%    R-Sq(adj) = 12,26%

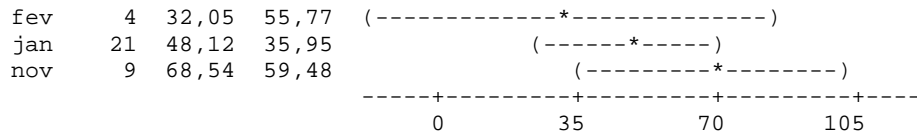


### One-way ANOVA: FFR versus Mês

Source	DF	SS	MS	F	P
Mês	3	6822	2274	0,86	0,465
Error	70	184601	2637		
Total	73	191423			

S = 51,35    R-Sq = 3,56%    R-Sq(adj) = 0,00%

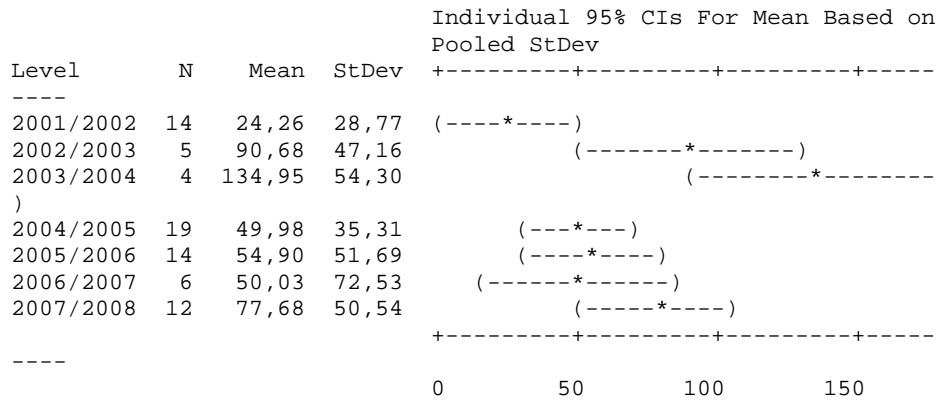




### One-way ANOVA: FFR versus Piracema

Source	DF	SS	MS	F	P
Piracema	6	51342	8557	4,09	0,001
Error	67	140081	2091		
Total	73	191423			

S = 45,72    R-Sq = 26,82%    R-Sq(adj) = 20,27%



**General Linear Model: OVOGOR; VIAVEL; ... versus SOLUÇÃO;  
CONCENTRAÇÃO; ...**

Factor	Type	Levels	Values
SOLUÇÃO	fixed	4	DMSO; METANOL; H2O; SACAROSE
CONCENTRAÇÃO	fixed	5	0.0%; 5.0%; 7.5%; 10.0%; 12.5%
TEMPO	fixed	4	2HS; 4HS; 6HS; 8HS

Analysis of Variance for OVOGOR, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F
P					
SOLUÇÃO	3	18044.1	18044.1	6014.7	14.96
0.000					
CONCENTRAÇÃO	4	4929.1	4929.1	1232.3	3.07
0.017					
TEMPO	3	26247.0	26247.0	8749.0	21.76
0.000					
SOLUÇÃO*CONCENTRAÇÃO	12	27109.3	27109.3	2259.1	5.62
0.000					
SOLUÇÃO*TEMPO	9	12699.9	12699.9	1411.1	3.51
0.000					
CONCENTRAÇÃO*TEMPO	12	4218.0	4218.0	351.5	0.87
0.574					
SOLUÇÃO*CONCENTRAÇÃO*TEMPO	36	21082.9	21082.9	585.6	1.46
0.049					
Error	320	128644.2	128644.2	402.0	
Total	399	242974.6			

S = 20.0503 R-Sq = 47.05% R-Sq(adj) = 33.98%

Unusual Observations for OVOGOR

Obs	OVOGOR	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
16	10.476	58.157	8.967	-47.681	-2.66 R
19	11.321	50.508	8.967	-39.187	-2.19 R
20	11.702	81.840	8.967	-70.138	-3.91 R
32	0.990	42.368	8.967	-41.378	-2.31 R
36	7.547	60.550	8.967	-53.003	-2.96 R
40	3.846	46.418	8.967	-42.572	-2.37 R
44	3.797	44.051	8.967	-40.253	-2.24 R
87	75.000	17.210	8.967	57.790	3.22 R
88	100.000	24.193	8.967	75.807	4.23 R
91	100.000	22.756	8.967	77.244	4.31 R
92	100.000	35.566	8.967	64.434	3.59 R
95	100.000	26.800	8.967	73.200	4.08 R
96	100.000	58.157	8.967	41.843	2.33 R

98	57.895	18.099	8.967	39.796	2.22 R
99	100.000	50.508	8.967	49.492	2.76 R
108	100.000	22.592	8.967	77.408	4.32 R
112	100.000	42.368	8.967	57.632	3.21 R
115	78.571	19.148	8.967	59.423	3.31 R
116	100.000	60.550	8.967	39.450	2.20 R
123	100.000	25.058	8.967	74.942	4.18 R
124	100.000	44.051	8.967	55.949	3.12 R
143	100.000	22.524	8.967	77.476	4.32 R
144	100.000	23.613	8.967	76.387	4.26 R
192	81.818	42.368	8.967	39.450	2.20 R
200	92.857	46.418	8.967	46.439	2.59 R
256	100.000	58.157	8.967	41.843	2.33 R
279	100.000	36.029	8.967	63.971	3.57 R
280	98.864	46.418	8.967	52.446	2.92 R
336	6.780	58.157	8.967	-51.377	-2.86 R
352	0.000	42.368	8.967	-42.368	-2.36 R
356	22.222	60.550	8.967	-38.328	-2.14 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for VIAVEL, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS
F				
P				
SOLUÇÃO	3	86240.3	86240.3	28746.8
62.73 0.000				
CONCENTRAÇÃO	4	9649.6	9649.6	2412.4
5.26 0.000				
TEMPO	3	58574.1	58574.1	19524.7
42.60 0.000				
SOLUÇÃO*CONCENTRAÇÃO	12	178414.1	178414.1	14867.8
32.44 0.000				
SOLUÇÃO*TEMPO	9	25380.0	25380.0	2820.0
6.15 0.000				
CONCENTRAÇÃO*TEMPO	12	3330.6	3330.6	277.5
0.61 0.837				
SOLUÇÃO*CONCENTRAÇÃO*TEMPO	36	45044.0	45044.0	1251.2
2.73 0.000				
Error	320	146649.2	146649.2	458.3
Total	399	553282.0		

S = 21.4074 R-Sq = 73.49% R-Sq(adj) = 66.95%

Unusual Observations for VIAVEL

Obs	VIAVEL	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
14	86.207	39.594	9.574	46.613	2.43 R
18	80.612	17.234	9.574	63.379	3.31 R



86	12.500	52.664	9.574	-40.164	-2.10	R
87	0.000	42.822	9.574	-42.822	-2.24	R
89	38.710	79.887	9.574	-41.177	-2.15	R
90	15.152	68.833	9.574	-53.681	-2.80	R
106	25.714	76.977	9.574	-51.263	-2.68	R
107	0.000	65.336	9.574	-65.336	-3.41	R
108	0.000	40.992	9.574	-40.992	-2.14	R
111	17.857	69.527	9.574	-51.670	-2.70	R
115	0.000	45.417	9.574	-45.417	-2.37	R
122	0.000	58.098	9.574	-58.098	-3.03	R
123	0.000	50.126	9.574	-50.126	-2.62	R
142	0.000	56.144	9.574	-56.144	-2.93	R
143	0.000	52.635	9.574	-52.635	-2.75	R
166	3.125	52.664	9.574	-49.539	-2.59	R
167	0.000	42.822	9.574	-42.822	-2.24	R
173	19.048	71.409	9.574	-52.362	-2.73	R
174	0.000	39.594	9.574	-39.594	-2.07	R
177	32.432	71.293	9.574	-38.860	-2.03	R
202	16.000	58.098	9.574	-42.098	-2.20	R
203	9.091	50.126	9.574	-41.035	-2.14	R
222	9.091	56.144	9.574	-47.053	-2.46	R
223	0.000	52.635	9.574	-52.635	-2.75	R
268	82.716	40.992	9.574	41.724	2.18	R
302	96.154	56.144	9.574	40.010	2.09	R
326	100.000	52.664	9.574	47.336	2.47	R
327	100.000	42.822	9.574	57.178	2.99	R
328	69.565	23.662	9.574	45.903	2.40	R
331	98.305	31.040	9.574	67.265	3.51	R
334	88.889	39.594	9.574	49.295	2.57	R
335	85.000	26.825	9.574	58.175	3.04	R
339	78.571	23.827	9.574	54.744	2.86	R
348	100.000	40.992	9.574	59.008	3.08	R
352	77.778	31.256	9.574	46.522	2.43	R
355	85.714	45.417	9.574	40.297	2.10	R
362	100.000	58.098	9.574	41.902	2.19	R
363	100.000	50.126	9.574	49.874	2.60	R
382	98.333	56.144	9.574	42.189	2.20	R
383	100.000	52.635	9.574	47.365	2.47	R
384	92.188	29.464	9.574	62.724	3.28	R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Analysis of Variance for TXECLOSAO, using Adjusted SS for Tests

Source		DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS
F	P				
SOLUÇÃO		3	222542.4	222542.4	74180.8
184.52	0.000				
CONCENTRAÇÃO		4	4929.1	4929.1	1232.3
3.07	0.017				

TEMPO		3	26247.0	26247.0	8749.0
21.76	0.000				
SOLUÇÃO*CONCENTRAÇÃO		12	437104.9	437104.9	36425.4
90.61	0.000				
SOLUÇÃO*TEMPO		9	12699.9	12699.9	1411.1
3.51	0.000				
CONCENTRAÇÃO*TEMPO		12	4218.0	4218.0	351.5
0.87	0.574				
SOLUÇÃO*CONCENTRAÇÃO*TEMPO		36	21082.9	21082.9	585.6
1.46	0.049				
Error		320	128644.2	128644.2	402.0
Total		399	857468.5		

S = 20.0503 R-Sq = 85.00% R-Sq(adj) = 81.29%

Unusual Observations for TXECLOSAO

Obs	TXECLOSAO	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
16	89.524	41.843	8.967	47.681	2.66 R
19	88.679	49.492	8.967	39.187	2.19 R
20	88.298	18.160	8.967	70.138	3.91 R
32	99.010	57.632	8.967	41.378	2.31 R
36	92.453	39.450	8.967	53.003	2.96 R
40	96.154	53.582	8.967	42.572	2.37 R
44	96.203	55.949	8.967	40.253	2.24 R
87	25.000	82.790	8.967	-57.790	-3.22 R
88	0.000	75.807	8.967	-75.807	-4.23 R
91	0.000	77.244	8.967	-77.244	-4.31 R
92	0.000	64.434	8.967	-64.434	-3.59 R
95	0.000	73.200	8.967	-73.200	-4.08 R
96	0.000	41.843	8.967	-41.843	-2.33 R
98	42.105	81.901	8.967	-39.796	-2.22 R
99	0.000	49.492	8.967	-49.492	-2.76 R
108	0.000	77.408	8.967	-77.408	-4.32 R
112	0.000	57.632	8.967	-57.632	-3.21 R
115	21.429	80.852	8.967	-59.423	-3.31 R
116	0.000	39.450	8.967	-39.450	-2.20 R
123	0.000	74.942	8.967	-74.942	-4.18 R
124	0.000	55.949	8.967	-55.949	-3.12 R
143	0.000	77.476	8.967	-77.476	-4.32 R
144	0.000	76.387	8.967	-76.387	-4.26 R
192	18.182	57.632	8.967	-39.450	-2.20 R
200	7.143	53.582	8.967	-46.439	-2.59 R
256	0.000	41.843	8.967	-41.843	-2.33 R
279	0.000	63.971	8.967	-63.971	-3.57 R
280	1.136	53.582	8.967	-52.446	-2.92 R
336	93.220	41.843	8.967	51.377	2.86 R
352	100.000	57.632	8.967	42.368	2.36 R
356	77.778	39.450	8.967	38.328	2.14 R

R denotes an observation with a large standardized residual.