

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DA GAROUPA-VERDADEIRA**

**Francisco da Costa Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Junho – 2016**

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DA GAROUPA-VERDADEIRA**

**Francisco da Costa Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Junho – 2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

S586r

Silva, Francisco da Costa

Refrigeração do sêmen da garoupa verdadeira / Francisco da Costa Silva - São Paulo, 2016.

v, 39f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientador: Eduardo Gomes Sanches

1 *Epinephelus marginatus*. 2. Diluentes. 3. Espermatócrito. 4. Resfriamento espermático. 5. Espermatozoides. I. Sanches, Eduardo Gomes. II. Título.

CDD 639.2

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

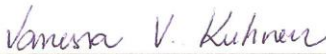
**“REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DA GAROUPA-  
VERDADEIRA”**

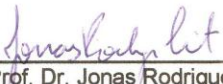
**AUTOR:** Francisco da Costa Silva

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de  
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em  
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vanessa Villanova Kuhn

  
Prof. Dr. Jonas Rodrigues Leite

Data da realização: 07 de junho de 2016

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e forças para poder concluir mais essa importante etapa de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches, o mentor de tudo, pela oportunidade, apoio e dedicação, e por caminharmos juntos nesse longo período de realização do trabalho. Muito obrigado por tudo...!!!

Sou muito grato ao Instituto de Pesca por proporcionar toda a estrutura necessária para realização de meus estudos, ao corpo acadêmico que através das matérias e aulas passaram todas as experiências adquiridas ao longo de suas vidas. Gostaria de gratificar a CAPES pela concessão da bolsa durante todo o período de realização de meus estudos, sendo fundamental para que tudo fosse possível. E não poderia deixar de agradecer ao Programa Meros do Brasil por todo o apoio prestado.

Agradeço também aos membros examinadores da minha qualificação, Prof. Dr. Giovanni Lemos de Mello e Profa. Dra. Anita Rademaker Valença, e de minha defesa, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Villanova Kuhnen e Prof. Dr. Jonas Rodrigues Leite, pelas críticas construtivas, observações e sugestões valiosas.

Um agradecimento especial para meus pais, Juscelino da Silva e Inês Miguel da Costa Silva, por estar sempre ao meu lado, e aos meus irmãos pela compreensão durante toda vida, e para a minha companheira e futura esposa, Sara dos Reis Sartorato, por suportar as minhas ausências, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram durante essa etapa, o meu agradecimento, muito obrigado...!!!

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	i
Sumário.....	ii
Índice de tabelas e figuras .....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Introdução geral .....	01
Objetivo geral .....	06
Objetivos específicos .....	06
Referências .....	07
Capitulo 01 – Refrigeração do sêmen da garoupa- verdadeira.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
Introdução.....	13
Material e métodos.....	15
Resultados e discussão .....	21
Conclusões.....	28
Referências.....	29
Considerações finais.....	39

## ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Taxa de motilidade (%; média ± desvio-padrão) do sêmen de <i>Epinephelus marginatus</i> (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes .....	34
Tabela 2. Duração da motilidade (segundos; média ± desvio-padrão) do sêmen de <i>Epinephelus marginatus</i> (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes .....	35
Tabela 3. Taxa de motilidade (%; média ± desvio-padrão) do sêmen de <i>Epinephelus marginatus</i> (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, em atmosfera modificada (100% oxigênio), diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes.....	36
Tabela 4. Duração da motilidade (segundos; média ± desvio-padrão) do sêmen de <i>Epinephelus marginatus</i> (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, em atmosfera modificada (100% oxigênio), diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes.....	37
Figura 1. Correlação entre concentração espermática (células mL <sup>-1</sup> ) e espermatócrito (%) para o sêmen da garoupa-verdadeira <i>Epinephelus marginatus</i> (n=20, P< 0,05).....	38
Figura 2. Taxas de fertilização (médias ± desvio-padrão) com sêmen fresco e sêmen diluído no diluente A e refrigerado a 4 °C por 24 e 48 horas em ovócitos de uma fêmea de <i>Epinephelus marginatus</i> . a-b Colunas com letras distintas apresentam diferenças significativas (teste de Tukey, P<0,05).....	38

## RESUMO

Este trabalho teve a finalidade de desenvolver um protocolo de refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. Inicialmente, a taxa de motilidade, a duração da motilidade, a concentração espermática e o espermatócrito foram avaliados para caracterizar a qualidade do sêmen fresco. Para os testes de refrigeração a 4 °C, diferentes diluentes com distintas composições iônicas e valores de pH foram testados em atmosfera normal e atmosfera modificada (100% oxigênio). Posteriormente, um teste de fertilização foi realizado para avaliar a viabilidade do sêmen refrigerado. Os resultados demonstraram que o sêmen fresco tem uma concentração espermática de  $3,1 \pm 0,2 \times 10^9$  células/mL, motilidade superior a 90% e permanece móvel por  $3.060 \pm 600$  segundos. Uma relação positiva foi encontrada entre espermatócrito e concentração espermática ( $r^2 = 0,91$ ;  $P < 0,05$ ). No experimento de refrigeração, a taxa de motilidade e a duração da motilidade foram mantidas adequadas durante 72 horas para os diluentes A ( $70 \pm 5$  %;  $3100 \pm 200$  segundos) e B ( $50 \pm 5$  %;  $2000 \pm 200$  segundos) em atmosfera normal. Na atmosfera modificada, a qualidade do sêmen caiu drasticamente durante as primeiras 24 horas, independentemente do diluente utilizado, não propiciando vantagem em sua utilização. Os resultados demonstraram que a refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira é uma alternativa viável, sendo possível manter por até 48 horas uma apropriada qualidade espermática proporcionando uma taxa de fertilização superior a 60%.

Palavras-chave: *Epinephelus marginatus*, diluentes, espermatócrito, resfriamento espermático, espermatozopedes.



## ABSTRACT

This study aimed to develop a protocol for refrigerated storage of the dusky grouper sperm. Initially, motility rate, motility time, sperm density and spermatocrit were analyzed to characterize the fresh sperm quality. Diluents with different ionic compositions and pH values were used in the refrigerated storage sperm at 4 °C in normal atmosphere and modified atmosphere (100% oxygen). Fertilization test was accomplished to evaluate the viability of the refrigerated sperm. The results demonstrated that the fresh sperm has a spermatozoa density of  $3.1 \pm 0.2 \times 10^9$  spermatozoa/mL, motility rate >90% and motility time of  $3,060 \pm 600$  seconds. A positive relationship was found between spermatocrit and spermatozoa density ( $r^2 = 0.91$ ;  $P < 0.05$ ). In the experiment of refrigerated storage, the motility rate and the motility time were maintained appropriate for 72 hours for the extender A ( $70 \pm 5\%$ ;  $3,100 \pm 200$  seconds) and B ( $50 \pm 5\%$ ;  $2,000 \pm 200$  seconds) in normal atmosphere. In the modified atmosphere, the sperm quality decrease drastically during the first 24 hours, independently of the diluent used, not propitiating advantages. The results demonstrated that the refrigerated sperm of dusky grouper is a viable alternative for the short-term storage, being possible, to maintaining for up to 48 hours an appropriate sperm viability, providing fertilization rate up to 60%.

Keywords: *Epinephelus marginatus*, extenders, spermatocrit, spermatic cooling, sperm.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Serranidae é formada por mais de 150 espécies distribuídas em 15 gêneros (HEEMSTRA e RANDALL, 1993). A garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), ocorre nas regiões Sudeste e Sul do litoral brasileiro, podendo atingir até 40 kg de peso e mais de um metro de comprimento total (RODRIGUES FILHO *et al.*, 2009). Estudos dos hábitos alimentares e do conteúdo estomacal indicaram que a garoupa-verdadeira apresenta preferência por crustáceos e pequenos peixes quando jovem e quando adulta tem preferência por peixes maiores e polvos (*Octopus* sp.), entretanto, em cativeiro, aceitam dietas inertes, com resultados expressivos de crescimento (GRACIA LÓPEZ e CASTELLÓ-ORVAY, 2003; MACHADO *et al.*, 2008).

Semelhante a outras espécies de serranídeos, a garoupa-verdadeira apresenta crescimento lento, maturidade sexual tardia e um comportamento bastante territorialista, habitando os fundos rochosos, sendo comuns em áreas próximas a manguezais quando jovens (CARVALHO *et al.*, 2012). A garoupa-verdadeira é uma espécie hermafrodita protogínica, com os indivíduos maturando sexualmente como fêmea e, em certo momento de seu desenvolvimento, passando por inversão sexual, tornando-se macho (ZABALA *et al.*, 1997). Apesar de seu comportamento solitário, uma das características reprodutivas é o fato de determinarem um local para formação de grandes haréns e intensas agregações reprodutivas (FENNESSY, 2006; SEYBOTH *et al.*, 2011).

Devido ao valor obtido com sua comercialização, a garoupa-verdadeira está incluída na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) como ameaçada (RODRIGUES-FILHO *et al.*, 2009). No Brasil, recentemente, foi incluída como vulnerável na Portaria nº 445 (IBAMA, 2014), a qual lista as espécies de peixes ameaçadas de extinção, divididas em três categorias, as criticamente em perigo, as em perigo e as vulneráveis.

No Brasil a piscicultura marinha tem enfrentado diversas barreiras para se desenvolver como uma atividade produtiva sendo que o setor tem ampliado as buscas por espécies de peixes marinhos de elevado valor econômico e potencial para cultivo. A piscicultura marinha de espécies ameaçadas pode ser um instrumento estratégico de conservação, além de fomentar o desenvolvimento de uma cadeia produtiva, beneficiando as comunidades litorâneas com nova fonte de renda e com geração de empregos, pode auxiliar a expansão da atividade da maricultura (SANCHES *et al.*, 2014)

Um grupo de espécies que desperta o interesse para cultivo são os serranídeos (garoupas, chernes e badejos). Em função da complexidade do ciclo biológico dessas espécies, a obtenção de reprodutores torna-se um dos problemas para realizar a reprodução em cativeiro (TUCKER e FITZGERALD, 1994; SADOVY e COLIN, 1995). Tentando encontrar alternativas para essa dificuldade, vários pesquisadores vêm comprovando a viabilidade de inversão sexual de serranídeos em cativeiro com a utilização de andrógenos (ROBERTS e SCHLIEDER, 1983; KUO *et al.*, 1988; TAN-FERMIN *et al.*, 1994; QUNITIO *et al.*, 1997; SANCHES *et al.*, 2009).

Vários estudos vêm sendo realizados para consolidar um pacote tecnológico para a produção destas espécies em cativeiro (KERBER *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2012; ROUMBEDAKIS *et al.*, 2013; SANCHES *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014), entretanto, ainda existem diversos aspectos na área de reprodução e larvicultura a serem desenvolvidos. As dificuldades com a obtenção de formas jovens de serranídeos vem sendo solucionadas lentamente nos últimos anos (LIN *et al.*, 2007; RACHMANSYAH *et al.*, 2009;).

Uma ferramenta importante para a reprodução de peixes é a refrigeração do sêmen. O objetivo desta técnica é manter o sêmen em temperaturas de 4 °C por um curto período de tempo, dias ou horas, sem causar danos na viabilidade espermática, para que possa ser posteriormente utilizado no processo de fertilização. Um dos pontos positivos é a dispensa dos machos na hora da fecundação, liberando tempo para o monitoramento das fêmeas no momento da ovulação, possibilitando assim deixar o processo

reprodutivo mais prático e ágil, e conseqüentemente acarretando em melhores resultados no ato da reprodução (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A refrigeração estende a viabilidade temporal do sêmen não diluído por algumas horas. Esse efeito pode ser explicado pela redução da atividade metabólica dos espermatozoides a temperaturas abaixo da fisiológica. A refrigeração, após sua combinação com soluções diluentes imobilizadoras da motilidade, que mimetizam a composição iônica e a osmolaridade do plasma seminal, tem sido efetivo em potencializar a longevidade, sem promover mudanças significativas da qualidade do sêmen (PEÑARANDA *et al.*, 2010). Atualmente, trata-se de uma técnica relativamente simples, de baixo custo, que não requer equipamentos sofisticados e pode resultar em benefícios técnicos e econômicos às estações de piscicultura.

Embora esse procedimento já venha sendo utilizado com algumas espécies marinhas, caso do *Pogonias cromis* (Linnaeus, 1766) (WAYMAN *et al.*, 1997), *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus, 1766) (WAYMAN e TIERSCH, 1998), *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) (BILLARD *et al.*, 2004) e *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758 ) (PEÑARANDA *et al.*, 2010) somente recentemente esta estratégia começou a ser aplicada no Brasil, sendo o ariocó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758), a primeira espécie de peixe marinho a ter fertilização e produção de formas jovens oriundos de sêmen refrigerado (SANCHES e CERQUEIRA, 2010). Posteriormente foi produzido também formas jovens da cioba, *Lutjanus analis* (Cuvier, 1828), com sêmen refrigerado (SANCHES e CERQUEIRA, 2011). Não existem na literatura estudos sobre a refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira.

A maioria das pesquisas envolvendo o armazenamento do sêmen para uso futuro utiliza métodos de criopreservação em nitrogênio líquido. A refrigeração do sêmen não permite seu armazenamento por período tão prolongado quanto o congelamento, porém é uma técnica mais simples, de baixo custo e que não exige a utilização de criopreservantes (CARNEIRO *et al.*, 2006). Para a implementação da técnica de refrigeração do sêmen é necessário que a temperatura seja reduzida gradualmente, evitando o

ressecamento do sêmen pela ação do frio, e garantindo que as células espermáticas permaneçam oxigenadas durante todo o tempo.

Para a refrigeração do sêmen é necessário a utilização de diluentes como um meio protetor. A diluição diminui a competição entre os espermatozóides por espaço e oxigênio, e pode evitar, paralelamente, o início da motilidade espermática (SANCHES *et al.*, 2009). A preservação da viabilidade espermática submetendo o sêmen a uma atmosfera exclusiva de oxigênio durante o processo de refrigeração ainda é pouco esclarecida para diversas espécies de peixes. Alguns autores consideram essencial uma expressiva disponibilidade de oxigênio para os espermatozóides quando o sêmen é submetido ao processo de refrigeração (BILLARD *et al.*, 2004).

Na enguia européia *Anguilla anguilla* o desenvolvimento de um diluente específico para a refrigeração do sêmen proporcionou melhores resultados na preservação da qualidade espermática e elevação das taxas de fecundação (PEÑARANDA *et al.*, 2010). Com isso viabilidade dos espermatozóides é essencial para que o processo reprodutivo seja eficiente em peixes, deste modo, a motilidade progressiva constitui-se em um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade do sêmen (HONEYFIELD e KRISE, 2000). Considerando todos estes fatores, a definição de um adequado protocolo de refrigeração do sêmen deve ainda, ser confirmada pela capacidade de fecundação obtida com o sêmen refrigerado comparativamente ao sêmen fresco.

Atualmente a disponibilidade de formas jovens de *E. marginatus* é inconstante, o que dificulta o desenvolvimento do cultivo da espécie. A complexidade técnica para a formação dos reprodutores, o tempo dispendido e os elevados custos associados, tornam a produção de formas jovens desta espécie uma atividade de alto risco. O empreendimento Redemar Alevinos (Ilhabela/SP) vem produzindo formas jovens da garoupa-verdadeira, adotando modificações no protocolo de larvicultura buscando elevar a eficiência e reduzir os custos. Grandes avanços na produção de formas jovens deste serranídeo podem ser alcançados com a utilização das técnicas de refrigeração de sêmen,

que proporcionaria a possibilidade de melhoras significativas na escala de produção.

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três diferentes diluentes na preservação do sêmen refrigerado da garoupa-verdadeira, em atmosfera normal e modificada (100% oxigênio).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar qual o diluente mais adequado para a refrigeração do sêmen desta espécie.

Avaliar a utilização de atmosfera modificada (100% oxigênio) na refrigeração do sêmen.

Avaliar a viabilidade de produção de formas jovens utilizando sêmen refrigerado.

Avaliar a correlação entre o espermatócrito e a concentração espermática.

## REFERÊNCIAS

- BILLARD, R.; COSSON, S.B.; NOVIERI M.; POURKAZEMI, M. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon: a review. *Aquaculture*, 236(1): 1-9.
- CARNEIRO, P.C.F; SEGUI, M.S.; ÍORIS FILHO, C.R.; MIKOS, J.D. 2006. Viabilidade do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen* armazenado sob refrigeração. *Revista Acadêmica*, 4(3): 11-16.
- CARVALHO, M. O. X.; PAIVA, M. P.; FONTELES FILHO, A. 2012. Idade e crescimento da garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Epinephelidae), no Sudeste do Brasil. *Arquivos de Ciência do Mar*, 45(2).
- FENNESSY, S. T. 2006. Reproductive biology and growth of the yellowbelly rockcod *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from South-East Africa. *African Journal of Marine Science*, 28(1): 1-11.
- GRACIA LÓPEZ, V. e CASTELLÓ-ORVAY, F. 2003. Preliminary data on the culture of juveniles of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Hidrobiológica*, 13(4): 321-327.
- HEEMSTRA, P.C. e RANDALL, J.E. 1993. *Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae)*. Rome: FAO. 382p.
- HONEYFIELD, D.C. e KRISE, W.F. 2000. Measurement of milt quality and factors affecting viability. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 49-58.
- IBAMA 2014 PORTARIA Nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Proibição da pesca de espécies ameaçadas de extinção. Diário Oficial da União, 18 de dezembro de 2014, Nº 245, Seção 1, p. 126.
- KERBER, C.E.; AZEVEDO SILVA, H.K.; SANTOS, P.A.; SANCHES. E.G. 2012. Reproduction and larviculture of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) in Brazil. *Journal of Agricultural Sciences and Technology*, 2:229-234.
- KUO, C.M.; TING, Y.Y.; YEH, S.L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74: 113-126.
- LIN, H.Z.; LIU, Y.J.; HE, J.G.; ZHENG, W.H.; TIAN, L.X. 2007. Alternative vegetable lipid sources in diets for grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton): effects on growth and muscle and liver fatty acid composition. *Aquaculture Research*, 38: 1605-1611.
- MACHADO, L.F.; DAROS, F.A.M.L.; BERTONCINI, A.A.; HOSTIM-SILVA, M.; BARREIROS, J.P. 2008. Feeding strategy and trophic ontogeny in *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from Southern Brazil. *Cybium*, 32(1): 33-41.



OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. FREITAS, R.T.F.; IZAÚ, Z.A. 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento do sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(6): 1509-1515.

PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; GALLEGO, V.; BARRERA, R.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. 2010. European eel sperm diluent for short-term storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 407-415.

QUINITIO, G.F.; CABEROY, N.D.; REYES JR, D.M. 1997. Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. *Israel Journal of Aquaculture*, 49: 77-83.

RACHMANSYAH, U.; PALINGGI, N.N.; WILLIAMS, K. 2009. Formulated feed for tiger grouper grow-out. *Aquaculture Asia Magazine*, 4(3): 30-35.

RAMOS, F.M.; SANCHES, E.G.; FUJIMOTO, R.Y.; COTTENS, K.F.; CERQUEIRA, V.R. 2012. Growth of juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* at three different diets. *Boletim do Instituto de Pesca*, 38(1): 81-88.

ROBERTS, D.E. JR. e SCHLIEDER, R.A. 1983. Induced sex inversion, maturation, spawning and embriogeny of the protogynous grouper, *Mycteroperca microlepis*. *Journal of World Mariculture Society*, 14: 639-649.

RODRIGUES FILHO, J.A.; SANCHES, E.G.; GARCIA, C.E.O.; PANNUTI, C.V.; SEBASTIANI, E.F.; MOREIRA, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, 85(4): 301-302.

ROUMBEDAKIS, K.; MARCHIORI, N.C.; PASETO, Á.; GONÇALVES, E.L.T.; LUQUE, J.L.; CEPEDA, P.B.; SANCHES, E.G.; MARTINS, M.L. 2013. Parasite fauna of wild and cultured dusky-grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) from Ubatuba, Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 73(4): 871-878.

SADOVY, Y. e COLIN, P.L. 1995. Sexual development and sexuality in the Nassau grouper. *Journal of Fisheries Biology*, 46: 961-976.

SANCHES, E.G.; CERQUEIRA, V.R. 2010. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36: 293-305.

SANCHES, E.G.; CERQUEIRA, V.R. 2011. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 1673-1680.

SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C. 2009. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(3): 389-399.

SANCHES, E.G.; SILVA, F.C.; LEITE, J.R.; SILVA, P.K.A.; KERBER, C.E.; SANTOS, P.A. 2014. A incorporação de óleo de peixe na dieta pode melhorar o desempenho da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* ?. *Boletim do Instituto de Pesca*, 40(2): 147-155.

SEYBOTH, E.; CONDINI, M. V.; ALBUQUERQUE, C. Q.; VARELA JR, A. S.; VELASCO, G.; VIEIRA, J. P.; GARCIA, A. M. 2011. Age, growth, and reproductive aspects of the dusky grouper *Mycteroperca marginata* (Actinopterygii: Epinephelidae) in a man-made rocky habitat in southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9(4): 849-856.

SOUZA, R.S.R.; ANNUNCIACÃO, W.F.; LINS, S.M.; SANCHES, E.G.; MARTINS, M.L.; TSUZUKI, M.Y. 2014. Can barber goby *Elacatinus figaro* control *Neobenedenia melleni* infections on dusky grouper *Epinephelus marginatus*? *Aquaculture Research*, 45: 619–628.

TAN-FERMIN, J.D.; GARCIA, I.M.B.; CASTILLO JR, A.R. 1994. Induction of sex inversion in juvenile grouper *Epinephelus suillus*, (Valenciennes) by injections of 17-alfametiltestosterone. *Japanese Journal of Ichthyology*, 40: 413-420.

TUCKER, J.W. Jr. e FITZGERALD, W.J. 1994. Induced spawning in two Western Tropical Pacific groupers, *Plectropomus areolatus* and *Epinephelus fuscoguttatus*, in Palau. *Asian Fisheries Science*, 7: 57-62.

WAYMAN, W.R. and TIERSCH, T.R. 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquaculture Research*, 29(1): 267-273.

WAYMAN, W.R.; THOMAS, R.G. TIERSCH, T.R. 1997. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum *Pogonias cromis* spermatozoa. *Theriogenology*, 47(1): 1519-1529.

ZABALA, M.; LOUISY, P.; GARCIA-RUBIES, A.; GRACIA, V. 1997. Social-behavioral context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61(1): 79-89.

## **CAPÍTULO 1**

### **Refrigeração do sêmen da garoupa verdadeira**

Artigo redigido nas normas do periódico científico  
**Pesquisa Agropecuária Brasileira**

QUALIS B1

## Refrigeração do sêmen da garoupa verdadeira

Francisco da Costa Silva <sup>(1)</sup>, Ana Paula dos Santos <sup>(1)</sup> e Eduardo Gomes Sanches <sup>(1\*)</sup>

<sup>(1)</sup> Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte, Instituto de Pesca/APTA/SAA. Rua Joaquim Lauro Monte Claro Neto, 2275 – Itaguá – CEP: 11.680-000 – Ubatuba - SP – Brasil. e-mail: francysco.bio@gmail.com, apaulasa13@gmail.com, esanches@pesca.sp.gov.br (\*autor correspondente).

Resumo - Este trabalho teve a finalidade de desenvolver um protocolo de refrigeração do sêmen da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*. Primeiramente, a taxa de motilidade, a duração da motilidade, a concentração espermática e o espermatócrito foram avaliados para caracterizar a qualidade do sêmen fresco. Para os testes de refrigeração a 4 °C, diferentes diluentes com distintas composições iônicas e valores de pH foram testados em atmosfera normal e atmosfera modificada (100% oxigênio). Posteriormente, um teste de fertilização foi realizado para avaliar a viabilidade do sêmen refrigerado. Os resultados demonstraram que o sêmen fresco tem uma concentração espermática de  $3,1 \pm 0,2 \times 10^9$  células/mL, motilidade superior a 90% e permanece móvel por  $3.060 \pm 600$  segundos. Uma relação positiva foi encontrada entre espermatócrito e concentração espermática ( $r^2 = 0,91$ ;  $P < 0,05$ ). No experimento de refrigeração, a taxa de motilidade e a duração da motilidade foram mantidas adequadas durante 72 horas para os diluentes A ( $70 \pm 5$  %;  $3100 \pm 200$  segundos) e B ( $50 \pm 5$  %;  $2000 \pm 200$  segundos) em atmosfera normal. Na atmosfera modificada, a qualidade do sêmen caiu drasticamente durante as primeiras 24 horas, independentemente do diluente utilizado, não propiciando vantagem em sua utilização. Os resultados demonstraram que

a refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira é uma alternativa viável, sendo possível manter por até 48 horas uma apropriada qualidade espermática proporcionando uma taxa de fertilização superior a 60%.

Palavras-chave: *Epinephelus marginatus*, diluentes, espermátocrito, resfriamento espermático, espermatozopedes.

### **Refrigerated storage of dusky grouper *Epinephelus marginatus* sperm**

Abstract - This study aimed to develop a protocol for refrigerated storage of the dusky grouper sperm. Initially, motility rate, motility time, sperm density and spermatocrit were analyzed to characterize the fresh sperm quality. Diluents with different ionic compositions and pH values were used in the refrigerated storage sperm at 4 °C in normal atmosphere and modified atmosphere (100% oxygen). Fertilization test was accomplished to evaluate the viability of the refrigerated sperm. The results demonstrated that the fresh sperm has a spermatozoa density of  $3.1 \pm 0.2 \times 10^9$  spermatozoa/mL, motility rate >90% and motility time of  $3,060 \pm 600$  seconds. A positive relationship was found between spermatocrit and spermatozoa density ( $r^2 = 0.91$ ;  $P < 0.05$ ). In the experiment of refrigerated storage, the motility rate and the motility time were maintained appropriate for 72 hours for the extender A ( $70 \pm 5\%$ ;  $3,100 \pm 200$  seconds) and B ( $50 \pm 5\%$ ;  $2,000 \pm 200$  seconds) in normal atmosphere. In the modified atmosphere, the sperm quality decrease drastically during the first 24 hours, independently of the diluent used, not propitiating advantages. The results demonstrated that the refrigerated sperm of dusky grouper is a viable alternative for the

short-term storage, being possible, to maintaining for up to 48 hours an appropriate sperm viability, providing fertilization rate up to 60%.

Keywords: *Epinephelus marginatus*, extenders, spermatocrit, spermatoc cooling, sperm.

## Introdução

A garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) é uma espécie hermafrodita protogínica, onde as fêmeas maturam com 2,5 kg e 38 cm (cinco anos de idade) e invertem o sexo com 11,0 kg e 57 cm (sete anos de idade) apresentando baixa resiliência e alta vulnerabilidade à exploração humana (Cunha et al., 2013). Atualmente está incluída como ameaçada na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN, 2012). A piscicultura marinha de espécies ameaçadas pode ser desenvolvida como um instrumento estratégico de conservação, além de, paralelamente, fomentar o desenvolvimento de uma nova cadeia produtiva, beneficiando a expansão da maricultura e a geração de emprego e de renda para comunidades litorâneas (Sanches et al., 2009). No caso da garoupa-verdadeira, significativos avanços já foram obtidos na área de patologia (Roumbedakis et al., 2013; Souza et al., 2014) e em técnicas de manejo alimentar (Ramos et al., 2012; Sanches et al., 2014), entretanto, ainda existem lacunas para a produção de formas jovens em cativeiro (Cunha et al., 2013).

Importante ferramenta para a reprodução de peixes, a refrigeração do sêmen tem contribuído para o sucesso da reprodução artificial de muitas espécies de peixes (Sanches & Cerqueira, 2010). Esta técnica tem como objetivo manter a viabilidade

espermática por um curto período de tempo (horas ou dias) em temperaturas de refrigeração (4 °C) para que o sêmen possa ser utilizado posteriormente no processo de fertilização, dispensando a presença dos machos no ato da fecundação e liberando tempo para o monitoramento da ovulação das fêmeas, proporcionando melhores resultados nos procedimentos de reprodução (Oliveira et al., 2007). Apesar das vantagens da refrigeração do sêmen em espécies de água doce, ainda são escassos os estudos desta técnica na reprodução de peixes de água salgada (Carneiro et al., 2006; Sanches & Cerqueira, 2011). Recentemente importantes avanços foram obtidos para a produção de formas jovens da garoupa-verdadeira (Kerber et al., 2012) porém ainda não existem relatos na literatura sobre a refrigeração do sêmen desta espécie.

A utilização de técnicas de armazenamento de sêmen é essencial para os procedimentos de reprodução de espécies hermafroditas protogínicas (Kiryakit et al., 2011). Para a conservação do sêmen faz-se necessário a utilização de diluentes, que tem a função de fornecer um meio protetor aos espermatozóides. A diluição possibilita diminuir a competição entre os espermatozóides por oxigênio e espaço e pode, paralelamente, evitar a iniciação da motilidade espermática (Sanches et al., 2009). O desenvolvimento de diluentes espécie-específicos pode propiciar melhores resultados na preservação da viabilidade espermática, auxiliando na padronização das técnicas de refrigeração e congelamento de sêmen de peixes (Salmito-Vanderley et al., 2012). A preservação da viabilidade espermática submetendo o sêmen a uma atmosfera exclusiva de oxigênio durante o processo de refrigeração ainda é pouco esclarecida para diversas espécies de peixes. Alguns autores consideram essencial uma expressiva disponibilidade de oxigênio para os espermatozóides quando o sêmen é submetido ao processo de refrigeração (Billard et al., 2004). Considerando todos estes fatores, a definição de um

adequado protocolo de resfriamento do sêmen deve, ainda, ser confirmada pela capacidade de fecundação obtida com o sêmen resfriado comparativamente ao sêmen fresco. A utilização de técnicas de refrigeração de sêmen, possibilitando ampliar a escala de produção, proporcionaria um grande avanço na produção de formas jovens deste serranídeo, contribuindo para a redução dos custos de produção.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes diluentes, em atmosfera normal e modificada (100% oxigênio), na preservação de sêmen refrigerado da garoupa-verdadeira *E. marginatus*.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Piscicultura Marinha, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte, do Centro Avançado de Pesquisa e Tecnologia do Agronegócio do Pescado Marinho, localizado em Ubatuba/SP, do Instituto de Pesca/APTA/SAA.

### **Manejo dos reprodutores**

No início do verão, vinte exemplares de garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*), oriundos de captura na região litorânea de Ubatuba/SP, foram invertidos sexualmente (Sanches et. al., 2009) e mantidos em três tanques circulares com 3.000 litros, em sistema de recirculação de água salgada, dotado de filtragem mecânica (*bag* de 100 micra), *skimmer* e esterilização da água através de lâmpadas ultra-violeta. A temperatura foi mantida constante ( $28 \pm 1,0$  °C controlada por termostatos e



aquecedores). Os peixes foram alimentados 1 x ao dia com sardinha *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) até a saciação aparente.

### **Coleta do sêmen**

No final do processo de inversão sexual, com duração de seis meses, os peixes, com  $44,5 \pm 3,7$  cm e  $1377,9 \pm 357,7$  g, em jejum de 24 horas, foram anestesiados (benzocaína a 0,1 g/L) e em seguida o sêmen extraído individualmente de cada exemplar (sem a necessidade de indução hormonal) e colhido com o auxílio de seringas plásticas para insulina graduadas (1 mL) envolvidas com papel alumínio, para evitar a incidência da luz ambiente sobre as amostras. A medida do volume foi feita diretamente na seringa.

Foram tomados cuidados para evitar a contaminação do sêmen por ocasião da coleta. A região abdominal dos exemplares foi lavada com água doce (evitando qualquer risco da água salgada ativar as amostras) sendo esta região imediatamente seca com toalhas de papel descartáveis antes de se iniciar a coleta com seringas individuais para cada peixe. Após cada coleta uma subamostra era observada em microscópio para avaliar se os espermatozóides estavam ativados (caso de contaminação por urina) e em caso positivo a amostra era descartada.

### **Caracterização do sêmen fresco**

A avaliação da qualidade seminal foi feita, individualmente, antes de se realizar a mistura do sêmen dos diversos machos, em partes iguais, para a realização dos experimentos de refrigeração. Foram determinados os parâmetros: taxa de motilidade espermática (porcentagem de células da amostra que apresentam movimento

progressivo), duração da motilidade espermática (duração da atividade de movimento celular, em segundos) e concentração espermática (número de espermatozoides/mL de sêmen) do sêmen fresco. A análise da motilidade e da duração da motilidade espermáticas foram aferidas simultaneamente na mesma preparação, por um único técnico, usando um único campo focal escolhido aleatoriamente, com intensidade de luz mantida inalterada. Para a ativação do sêmen foi utilizada uma taxa de diluição de 1:1, idêntica a utilizada por Sanches et al. (2009), sendo feita imediatamente após a mistura de sêmen em água marinha (salinidade 35‰) (15 µL de sêmen:15 µL de água) e observadas sob microscópio óptico, em ampliação de 200x. A motilidade foi estimada subjetivamente, registrando-se a porcentagem das células em movimento de deslocamento visualizadas no campo microscópico. A duração da motilidade foi cronometrada do início da ativação até o momento em que todas as células se tornaram imóveis. A concentração espermática foi avaliada através da contagem, sob microscópio (200x), das células espermáticas presentes em amostras de sêmen, previamente diluídas em solução tamponada de formol (5%), preparadas em câmara hematimétrica de Neubauer (1 mm<sup>3</sup>). Comparativamente, para determinação da concentração espermática, foi empregada a técnica de espermatócrito, mesma técnica utilizada por Sanches & Cerqueira (2010). O sêmen foi colocado em capilares para microhematócrito, com uma das extremidades selada com plastilina, e submetido a centrifugação em microcentrífuga a 7000 rpm (18000 g) por quinze minutos. Estes valores foram determinados através de um experimento prévio. Após a centrifugação a leitura da massa celular foi feita com régua graduada e os valores obtidos expressos em porcentagem. Foi estimada a correlação entre o espermatócrito e a concentração espermática.

### **Refrigeração do sêmen**

### **Experimento I – Refrigeração do sêmen com diferentes diluentes**

Neste experimento foi analisado o efeito de diferentes soluções diluidoras na preservação da motilidade e da duração da motilidade do sêmen resfriado (4 °C) por até seis dias (144 horas). Foram empregadas três soluções iônicas baseadas na composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos anteriormente utilizadas com sucesso na criopreservação de sêmen da garoupa-verdadeira (Sanches et al., 2009): Diluente A (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluente B (g/L) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm; Diluente C (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm.

Foram utilizadas amostras de sêmen de 10 indivíduos, misturadas entre si, em quantidades iguais, que apresentaram motilidade espermática superior a 90%. Foram realizados quatro tratamentos: Controle (sêmen *in natura*, sem diluição); T1 (sêmen + diluente A); T2 (sêmen + diluente B); T3 (sêmen + diluente C). A proporção empregada de sêmen:diluente foi de 1:3 (v/v). Cada tratamento teve três repetições. As amostras (com volume sêmen + diluidor totalizando 1 mL) foram mantidas em tubos de ensaio de 5 mL, devidamente identificadas e armazenadas em refrigerador (4 °C). A taxa e a duração da motilidade espermática de cada unidade experimental foram avaliadas após 0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas de resfriamento a 4 °C. O momento 0 h da avaliação foi o imediatamente após a diluição.

### **Experimento II – Refrigeração do sêmen em atmosfera modificada (100% oxigênio)**

Neste experimento foi analisado o efeito de diferentes soluções diluidoras na preservação e na duração da motilidade do sêmen resfriado (4°C) por até dois dias utilizando atmosfera modificada (exclusivamente oxigênio). Foram empregadas as mesmas soluções diluentes do experimento anterior.

Foi utilizada uma mistura de partes iguais de sêmen de 10 indivíduos, (os mesmos do experimento anterior), com taxa de motilidade espermática superior a 90%. Foram realizados quatro tratamentos: Controle (sêmen *in natura*, sem diluição); T1 (sêmen + diluente A); T2 (sêmen + diluente B); T3 (sêmen + diluente C). A proporção empregada de sêmen:diluente foi de 1:3 (v/v). Cada tratamento teve três repetições. As amostras (com volume sêmen + diluidor totalizando 1 mL) foram mantidas em tubos de ensaio de 5 mL, devidamente identificadas e armazenadas em refrigerador (4 °C). Todas as amostras foram seladas em um saco plástico (com capacidade de sessenta litros) que foi mantido inflado com oxigênio puro. A taxa e a duração da motilidade espermática de cada unidade experimental foram avaliadas após 0, 12, 24 e 48 horas de resfriamento a 4 °C. O momento 0 h da avaliação foi o imediatamente após a diluição.

### **Experimento III – Capacidade de fertilização do sêmen refrigerado**

Os testes de fertilidade do sêmen fresco e refrigerado por 24 e 48 horas foram realizados simultaneamente, inseminando ovócitos oriundos de uma mesma fêmea. A fêmea foi injetada com uma dose única de LH-RHa (50 µg/kg) (SIGMA, EUA). Para este experimento foi utilizado um “pool” de partes iguais de sêmen de três machos, o sêmen foi diluído somente com o diluente A, devido aos resultados dos experimentos anteriores I e II, no qual o diluente A apresentou melhor desempenho, e submetido a refrigeração em atmosfera normal por 24 e 48 horas.

A liberação dos ovócitos maduros teve início 36 horas após a injeção do hormônio, momento em que foi feita a extrusão para os testes de fertilização a seco. Os ovócitos foram recolhidos em bandejas de plástico e divididos em 30 parcelas, com 1.000 ovócitos por parcela, distribuídos em recipientes de plástico de 50 mL para a fertilização simultânea de 10 parcelas com sêmen fresco, 10 parcelas com sêmen refrigerado por 24 horas e 10 parcelas com sêmen refrigerado por 48 horas. O sêmen fresco, antes de ser misturado, foi diluído no mesmo diluente A e à mesma proporção utilizada para diluir o sêmen refrigerado.

Após a mistura do sêmen com os ovócitos (0,05 mL de sêmen para cada 1.000 ovócitos, relação espermatozoide:ovócito de 200.000:1) adicionaram-se 20 mL de água marinha (salinidade 35‰), para ativar os espermatozoides e iniciar a fecundação. O material correspondente a cada parcela foi posteriormente depositado em incubadoras individuais (1 L), feitas com tubos de PVC, fechadas na extremidade inferior por uma tela de 500 µm e mantidas em flutuação dentro de tanque com circulação contínua de água marinha, à temperatura de 28°C. A taxa de fertilização, calculada com base na relação entre o número de ovos fertilizados e o número total de ovos, foi estimada quatro horas após a fertilização, no estágio de gástrula. Para estimar a taxa de fertilização, os ovos foram contados em três subamostras de 100 ovos de cada incubadora, pela seguinte equação: taxa de fertilização = número de ovos em divisão/número total de ovos contados.

### **Análise dos dados**

Para análise estatística de todos os experimentos foi utilizado o SAS (Statistical Analyses System, o SAS/STAT, versão 6.11 de 1990) (SAS INSTITUTE INC., 1990). Os dados das taxas de motilidade e taxas de fertilização sofreram transformação angular, antes da análise estatística. A relação matemática entre percentagem de espermátocrito e concentração espermática foi determinada por análise de regressão linear. Todos os dados foram testados para normalidade e homogeneidade das variâncias. A análise de variância foi efetuada pelo procedimento ANOVA. Posteriormente, para verificação de diferenças significativas, foi aplicado o teste de variação múltipla de Tukey. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

## **Resultados e Discussão**

### **Caracterização do sêmen fresco**

O valor médio para o espermátocrito foi de  $76,2 \pm 5,1$  %. Foi observada uma correlação positiva ( $r = 0,90$ ) entre a concentração espermática e o espermátocrito (Figura 1). A regressão foi significativa ( $P < 0,05$ ) apresentando elevado coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,91$ ), sendo possível, portanto, estimar a concentração espermática de *E. marginatus* a partir da obtenção do espermátocrito. Tal técnica já havia sido utilizada por Sanches & Cerqueira (2010) para estimar a concentração espermática do ariocó *Lutjanus synagris* e mais recentemente por Sanches et al. (2013) com o sêmen da cioba *Lutjanus analis*. A utilização desta técnica torna o procedimento da determinação da concentração espermática mais ágil e com ampla confiabilidade.

A taxa e a duração da motilidade, a concentração e o volume espermáticos são parâmetros indicados para avaliação da qualidade do sêmen de uma espécie e de sua

capacidade de fertilização (Alavi et al., 2004; Fan et al., 2014). Para os peixes deste estudo, com peso médio de 1378 g, foi obtido um volume médio de 0,36 mL de sêmen, com taxa de motilidade de 100%. Os valores médios da duração da motilidade espermática obtidos ( $3060 \pm 600$  segundos) foram muito superiores aos encontrados para outras espécies de peixes marinhos. O sêmen do ariocó *Lutjanus synagris* apresentou motilidade superior a 90%, permanecendo móvel por  $137 \pm 20$  segundos (Sanches & Cerqueira, 2010) e o sêmen da cioba *Lutjanus analis* duração de motilidade de  $148 \pm 29$  segundos (Sanches et al., 2013). Tempos elevados de motilidade espermática, superiores a 4.500 segundos, foram observados em outra espécie de garoupa, a asiática *Epinephelus malabaricus* (Chao et al., 1992). Em peixes de água doce, a duração da motilidade é bem mais reduzida. Para o sêmen do curimbatá *Prochilodus brevis* foi reportado apenas 63 segundos (Silva et al., 2014). O elevado tempo de motilidade espermática obtido para essa espécie de peixe pode estar relacionado ao complexo processo reprodutivo, que envolve formação de haréns e intensas agregações reprodutivas (Fennessy, 2006; Seyboth et al., 2011; Carvalho et al., 2012).

Neste estudo, a concentração espermática encontrada foi de  $3,1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>. Este valor foi similar ao obtido com a mesma espécie por Sanches et al. (2009). Em outro estudo com esta mesma espécie foram obtidas concentrações entre 1,2 a  $16,6 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup> (Cabrita et al., 2009). A concentração espermática pode variar ao longo da estação reprodutiva, com tendência a ser reduzida ao final do período (Aramli et al., 2014), entretanto, a concentração obtida para *Epinephelus marginatus* no presente estudo pode estar relacionada a se tratarem de exemplares em primeira maturação sexual. Outro ponto a se ressaltar é que o sêmen da garoupa-verdadeira foi colhido sem

a necessidade de indução hormonal dos peixes. A indução hormonal pode acarretar redução da concentração espermática e aumento do percentual de espermatozóides com patologias (Streit Jr. et al., 2007).

## **Refrigeração do sêmen**

### **Experimento I – Refrigeração do sêmen com diferentes diluentes**

Para as análises de viabilidade espermática foi considerada a premissa de Marques & Godinho (2004) como limite para utilização do sêmen uma taxa de motilidade espermática de no mínimo 30%. Os resultados deste experimento, em relação à motilidade espermática, indicaram que o sêmen fresco, sem a adição de diluentes, diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) do sêmen com adição de diluentes, apresentando baixa taxa de motilidade (inferior a 24 horas) quando submetido ao processo de refrigeração. Foi observado, também, que o diluente A foi eficiente em preservar a motilidade espermática (acima de 30%) por até 144 horas, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) dos diluentes B e C que não foram eficientes em manter a motilidade (acima de 30%) por períodos prolongados (Tabela 1).

Em relação à duração da motilidade espermática o sêmen fresco não suportou o rigor do processo de refrigeração, apresentando queda brusca do parâmetro analisado em apenas 12 horas. O sêmen acrescido do diluente A diferiu dos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ), não apresentando expressiva diminuição da duração da motilidade por até 144 horas de refrigeração (Tabela 2).

Foi possível manter a viabilidade espermática da garoupa-verdadeira por até 144 horas de refrigeração. Intervalos de tempo bem inferiores aos obtidos neste estudo foram



obtidos para a refrigeração do sêmen da carpa, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), (11 horas) (Padua et al., 2012) e para o sêmen do curimatã, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1874), (21 horas) (Silva et al., 2014). Todos estes autores observaram uma queda gradual na viabilidade do sêmen ao longo do tempo, semelhante à observada no presente estudo. Recentemente, em pequena escala, foi obtida a preservação da qualidade espermática do sêmen do baiacu, *Takifugu niphobles* (Jordan & Snyder, 1901), por até sete dias sob refrigeração (Gallego et al., 2013). Espermatozoides de diferentes espécies de peixes reagem de maneira distinta ao processo de refrigeração, sendo o decréscimo do ATP e o metabolismo espermático as chaves para a ampliação da viabilidade seminal durante o processo de preservação pela redução da temperatura (Zietara et al., 2009).

O diluente A (pH 6,1) difere dos demais pela ausência de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) presente no diluente B e, em maior quantidade no C, o que poderia explicar o melhor desempenho do diluente A no processo de refrigeração da garoupa-verdadeira. Resultados positivos na refrigeração do sêmen da cioba com este diluente sem a adição de bicarbonato de sódio foi atribuído ao efeito da dissociação do bicarbonato em meio aquoso, que resultaria em uma queda expressiva no pH intracelular dos espermatozoides e conseqüente efeito danoso na sobrevivência espermática (Sanches & Cerqueira, 2011). O emprego de diluentes tamponados tem o objetivo de impedir que os metabólitos dos espermatozoides, acumulados no decorrer do processo de congelamento, causem mudanças no pH do sêmen, causando efeitos deletérios às células espermáticas. O processo de refrigeração, entretanto, implica em redução da atividade metabólica dos espermatozoides a temperaturas abaixo da fisiológica o que poderia explicar o melhor desempenho do diluente A no processo de refrigeração.

Outro ponto a ser destacado foi o aumento da duração da motilidade espermática quando empregado o diluente A no processo de refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira. Diluentes com adequadas composições iônicas podem prolongar o tempo de motilidade espermática (Sanches et al., 2009). Aparentemente isto pode ser possível pela sustentação de um novo micro-ambiente aos espermatozóides, distinto do ambiente fisiológico proporcionado pelo plasma seminal, fato já reportado por Sanches & Cerqueira (2010) para o ariocó *Lutjanus synagris* e por Sanches & Cerqueira (2011) para a cioba *Lutjanus analis*.

Dois fatores podem contribuir para a queda acentuada na taxa de motilidade espermática: a contaminação bacteriana do sêmen, resultante do método de coleta, e a proporção de diluição utilizada (Sanches & Cerqueira, 2011). A coleta de sêmen, por meio de massagem abdominal, produz uma alta taxa de contaminação bacteriana, em razão do contato do sêmen com o muco externo do peixe; e o prolongamento das condições de estocagem, durante a refrigeração, pode afetar a qualidade do sêmen pelo desenvolvimento de bactérias. Resultados positivos foram obtidos com a adição de antibióticos (25 ppm de penicilina + 25 ppm de estreptomicina) ampliando a viabilidade espermática do sêmen refrigerado da carpa *Cyprinus carpio* de 9 para 29 dias (Thanh & Le, 2013).

## **Experimento II – Refrigeração do sêmen em atmosfera modificada (100% oxigênio)**

A taxa de motilidade e a duração da motilidade espermática apresentaram uma expressiva queda, não sendo possível obter tempos de refrigeração superiores a 12 horas

com resultados significativos de sobrevivência espermática. A adição de diluentes ao sêmen, comparativamente ao sêmen fresco, diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ), entretanto não foram observadas diferenças entre os diferentes diluentes (Tabelas 3 e 4). Resultados expressivos de 99% e 40% de motilidade espermática após 5 e 17 dias foram obtidos respectivamente para o sêmen do esturjão do Atlântico *Acipenser oxyrinchus* (Mitchill, 1815) quando mantido sob refrigeração em tubos com oxigênio puro (Dilauro et al., 1994). Por outro lado, não foram observados resultados positivos sobre a ampliação do tempo de refrigeração quando o sêmen do linguado *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) foi mantido sob atmosfera modificada (100% oxigênio ou 100% nitrogênio) (Chereguini et al., 1997). Após 20 horas a taxa de motilidade foi significativamente mais alta em atmosfera normal, ocorrendo queda brusca da taxa de motilidade quando utilizada atmosfera modificada. Resultado similar foi obtido por Marques & Godinho (2004) que não encontraram diferenças na viabilidade espermática (motilidade e duração da motilidade espermática) de seis espécies de peixes tropicais de água doce do Brasil quando o sêmen foi mantido conservado sob refrigeração utilizando-se comparativamente atmosfera normal e oxigênio puro. Sanches & Cerqueira (2010) avaliaram o sêmen do ariocó submetido à refrigeração em atmosfera modificada (100% oxigênio) e Sanches & Cerqueira (2011) avaliaram o sêmen da cioba mantido sob refrigeração nestas mesmas condições. Ambos estudos não observaram resultados positivos advindos da utilização de oxigênio, obtendo piores resultados comparativamente à utilização de atmosfera normal. No presente estudo, não houve vantagem na utilização de uma atmosfera de 100% oxigênio durante o processo de refrigeração do sêmen de *Epinephelus marginatus*. Tanto a taxa de motilidade como a duração da motilidade espermática ficaram muito aquém dos obtidos com atmosfera normal.

### **Experimento III - Capacidade de fertilização do sêmen refrigerado**

A taxa de fertilização com o uso de sêmen fresco (80%) foi significativamente superior ( $P > 0,05$ ) às obtidas com sêmen refrigerado (Figura 2). As taxas de fertilização com o sêmen refrigerado por 24 horas (70%) e por 48 horas (66%) não diferiram entre si. As taxas de fertilização podem ser afetadas pela qualidade dos ovócitos, principalmente de fêmeas de primeira maturação sexual. Os experimentos deste trabalho foram baseados na utilização de uma única fêmea jovem (primeira maturação, 2850 g) e a ausência da informação da relação ideal espermatozóide:ovócito (que não foi determinada neste estudo, sendo altamente interessante de ser abordada em estudos futuros com esta espécie) pode ter contribuído para a obtenção de taxas de fertilização mais baixas. A taxa de fertilização obtida com o sêmen refrigerado por 48 horas (66%), embora inferior a obtida com o sêmen fresco (80%) ainda pode ser considerada uma boa alternativa, considerando-se a praticidade e a ampliação do tempo de armazenagem do sêmen para os procedimentos de reprodução induzida desta espécie. Não foram encontrados, na literatura, relatos de fertilização de ovócitos de garoupa-verdadeira *E. marginatus* com sêmen refrigerado. Poucos dados estão disponíveis sobre taxas de fertilização em espécies de peixes marinhos com sêmen refrigerado. Taxas de fertilização de 70% (utilizando-se sêmen fresco) foram obtidas com *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskål, 1775) (Vuthiphandchai et al., 2009). Sanches & Cerqueira (2010) obtiveram taxas de fertilização de 63% com a utilização do sêmen fresco do ariocó e 62% com o sêmen refrigerado por 24 horas. Com a cioba, foram obtidas taxas de fertilização de 72% com sêmen fresco e 69% com sêmen refrigerado por 24 horas (Sanches & Cerqueira, 2011). Comparativamente, em função da maior disponibilidade de informações, os resultados com peixes de água doce não foram expressivamente superiores aos obtidos com

espécies marinhas. Taxas de fertilização entre 26 a 61% foram obtidas para o sêmen de curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) diluído e resfriado por quatro dias (Orfão et al., 2010).

Os presentes resultados demonstraram que a refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira mostrou-se uma técnica de fácil adoção pelos empreendimentos comerciais, o que certamente elevará o nível técnico de produção de formas jovens da garoupa-verdadeira. As perspectivas futuras de adoção desta técnica devem contribuir para ganhos de escala na produção, possibilitando a redução no custo das formas jovens e permitindo ampliar sua disponibilidade junto aos produtores de peixes marinhos.

### **Conclusões**

1. A refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira *E. marginatus* mostrou-se eficiente para a conservação de curto prazo, sendo possível, utilizando-se o diluente A, manter por até 144 horas uma adequada qualidade espermática.
2. Não há vantagens na utilização de atmosfera modificada (100% oxigênio) na refrigeração do sêmen desta espécie.
3. O sêmen refrigerado possibilita boas taxas de fertilização, sendo viável a sua utilização nos procedimentos de reprodução induzida desta espécie.
4. A técnica do espermátocrito apresentou uma correlação positiva, mostrando ser uma alternativa prática para a determinação da concentração espermática.

## Referências

- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.; KARAMI, M.; AMIRI, B.M. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. **Reproduction Research**, v. 128, n. 1, p. 819-828, 2004.
- ARAMLI, S.; KALBASSI, M.R.; NAZARI, R.M. Monthly fluctuations during the breeding season of sperm density, volume, motility, and composition of seminal and coelomic fluid in broodfish of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, p. 261-266, 2014.
- BILLARD, R.; COSSON, S.B.; NOVIERI M.; POURKAZEMI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon: a review. **Aquaculture**, v. 236, n. 1, p.1-9, 2004.
- CABRITA, E.; ENGROLA, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; POUSÃO-FERREIRA, P.; DINIS, M.T. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. **Aquaculture**, v. 287, p.152-157, 2009.
- CARNEIRO, P.C.F; SEGUI, M.S.; IÓRIS FILHO, C.R.; MIKOS, J.D. Viabilidade do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen* armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica: ciência animal**, v. 4, n. 3, p.11-16, 2006.
- CARVALHO, M. O. X.; PAIVA, M. P.; FONTELES FILHO, A. Idade e crescimento da garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834)(Pisces: Epinephelidae), no Sudeste do Brasil. **Arquivos de Ciência do Mar**, v. 45, n. 2, 2012.
- CHAO, N.H.; TSAI, H.P.; LIAO, I.C. Short and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider 1801). **Asian Fisheries Science**, v. 5, p. 103-116, 1992.

CHEREGUINI, O.; CAL, R.M.; DREANNO, C.; BAULNY, B.O.; SUQUET, M.; MAISSE, G. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. **Aquatic Living Resources**, v. 10, p. 251-255, 1997.

CUNHA, M.E.; RE, P.; QUENTAL-FERREIRA, H.; GAVAIA, P.J.; POUSAO-FERREIRA, P. Larval and juvenile development of dusky grouper *Epinephelus marginatus* reared in mesocosms. **Journal of Fish Biology**, v. 83, p. 448–465, 2013.

DILAURO, M.N., KRISE, W.F., HENDRIX, M.A., BAKER, S.E. Short term storage of Atlantic sturgeon sperm. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 56, n. 1, p. 143-144, 1994.

FAN, B.; LIU, X-C.; MENG, Z-N.; TAN, B.H.; WANG, L.; ZHANG, H.F.; ZHANG, Y.; WANG, Y-X.; LIN, H-R. Cryopreservation of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch, 1790) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, p. 334-339, 2014.

FENNESSY, S. T. Reproductive biology and growth of the yellowbelly rockcod *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from South-East Africa. **African Journal of Marine Science**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2006.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J.F.; YOSHIDA, M. Study of pufferfish (*Takifugu niphobles*) sperm: Development of methods for short-term storage, effects of different activation media and role of intracellular changes in  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  in the initiation of sperm motility. **Aquaculture**, v. 414, p. 82-91, 2013.

IUCN (2012). *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2* . Available at [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (accessed on 21 March 2015).

KERBER, C.E.; AZEVEDO SILVA, H.K.; SANTOS, P.A.; SANCHES. E.G. Reproduction and larviculture of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in Brazil. **Journal of Agricultural Sciences and Technology**, v. 2, p. 229-234, 2012.

KIRIYAKIT, A.; GALLARDO, W.G.; BART, A.N. Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* x *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. **Aquaculture**, v. 320, p. 106-112, 2011.

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short-term cold storage of sperm from six tropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 799-804, 2004.

ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N.; NASCIMENTO, A.F.; ISAÚ, Z.A.; VIVEIROS, A.T.M. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 679-687, 2010.

OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. FREITAS, R.T.F.; IZAÚ, Z.A. Sucesso do resfriamento e congelamento do sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

PADUA, N.H.; SHIMODA, E.; BARBOSA, P.S.; PEREIRA JUNIOR, G. Conservação do sêmen da carpa comum, *Cyprinus carpio*, variedade ornamental, por resfriamento. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 1, p. 63-72, 2012.

PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; GALLEGOS, V.; BARRERA, R.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. European eel sperm diluent for short-term storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 407-415, 2010.

RAMOS, F.M.; SANCHES, E.G.; FUJIMOTO, R.Y.; COTTENS, K.F.; CERQUEIRA, V.R. Growth of juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* at three different diets. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 1, p. 81-88, 2012.

ROUMBEDAKIS, K.; MARCHIORI, N.C.; PASETO, Á.; GONÇALVES, E.L.T.; LUQUE, J.L.; CEPEDA, P.B.; SANCHES, E.G.; MARTINS, M.L. Parasite fauna of



wild and cultured dusky-grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) from Ubatuba, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 4, p. 871-878, 2013.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; VIEIRA, M.J.A.F.; LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E.; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família characidae. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 255-268, 2012.

SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 389-399, 2009.

SANCHES, E.G.; CERQUEIRA, V.R. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, p. 293-305, 2010.

SANCHES, E.G.; CERQUEIRA, V.R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1673-1680, 2011.

SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.; CERQUEIRA, V.R. Cryopreservation of mutton snapper *Lutjanus analis* sperm. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1083-1091, 2013.

SANCHES, E.G.; SILVA, F.C.; LEITE, J.R.; SILVA, P.K.A.; KERBER, C.E.; SANTOS, P.A. A incorporação de óleo de peixe na dieta pode melhorar o desempenho da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* ?. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 40, n. 2, p. 147-155, 2014.

SAS INSTITUTE INC. 1990 *SAS technical report*. Release 6.11. Cary: NC, 229p.

SEYBOTH, E.; CONDINI, M. V.; ALBUQUERQUE, C. Q.; VARELA JR, A. S.; VELASCO, G.; VIEIRA, J. P.; GARCIA, A. M. Age, growth, and reproductive aspects of the dusky grouper *Mycteroperca marginata* (Actinopterygii: Epinephelidae) in a

man-made rocky habitat in southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 4, p. 849-856, 2011.

SILVA, A.C.; GALVÃO, J.A.S.; TEIXEIRA, E.G.; FARIAS, W.R.L. Caracterização e resfriamento do sêmen de curimatá, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1874). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 3, 105-129, 2014.

SOUZA, R.S.R.; ANNUNCIACÃO, W.F.; LINS, S.M.; SANCHES, E.G.; MARTINS, M.L.; TSUZUKI, M.Y. Can barber goby *Elacatinus figaro* control *Neobenedenia melleni* infections on dusky grouper *Epinephelus marginatus*? **Aquaculture Research**, v. 45, p. 619–628, 2014.

STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; GALO, J.M.; DIGMAYER, M. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 337-344, 2008.

THANH, T.N.T.; LE, M.H. Study on sperm chilled storage of common carp *Cyprinus carpio* in Viet Nam. **Aquaculture Asia Magazine**, v. 3, p. 20-23, 2013.

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

ZIETARA, M.S.; BIEGNIIEWSKA, A.; RURANGWA, E.; SWIERCZYNSKI, J.; OLLEVIER, F.; SKORKOWSKI, E.F. Bioenergetics of fish spermatozoa during semen storage. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 35, p. 607–614, 2009.

**Tabela 1.** Taxa de motilidade (%; média  $\pm$  desvio-padrão) do sêmen de *Epinephelus marginatus* (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes.

Diluidores	Tempo de Resfriamento (h)					
	0	12	24	48	72	144
A (pH 6,1)	100 $\pm$ 0aA	90 $\pm$ 0aA	90 $\pm$ 0aA	70 $\pm$ 0aB	70 $\pm$ 5aB	32 $\pm$ 3aC
B (pH 7,8)	100 $\pm$ 0aA	90 $\pm$ 0aA	90 $\pm$ 0aA	60 $\pm$ 0aB	50 $\pm$ 5aB	5 $\pm$ 1 bC
C (pH 8,2)	100 $\pm$ 3aA	90 $\pm$ 0aA	70 $\pm$ 0bB	20 $\pm$ 0bC	3 $\pm$ 0bD	0 $\pm$ 0cD
Sêmen não diluído	100 $\pm$ 3aA	40 $\pm$ 3bB	0 $\pm$ 0cC	-	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha,

apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Diluyente A (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B (g/L) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm; Diluyente C (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm.

**Tabela 2.** Duração da motilidade (segundos; média  $\pm$  desvio-padrão) do sêmen de *Epinephelus marginatus* (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes.

Diluidores	Tempo de resfriamento (h)					
	0	12	24	48	72	144
A (pH 6,1)	3060 $\pm$ 600aB	3800 $\pm$ 400aA	3400 $\pm$ 300aA	3200 $\pm$ 300aA	3100 $\pm$ 200aA	2900 $\pm$ 200aB
B (pH 7,8)	3060 $\pm$ 600aB	3600 $\pm$ 400aA	3200 $\pm$ 400aA	2500 $\pm$ 300bB	2000 $\pm$ 200bC	1500 $\pm$ 200bD
C (pH 8,2)	3060 $\pm$ 600aB	3600 $\pm$ 400aA	3000 $\pm$ 300bB	1200 $\pm$ 200cC	600 $\pm$ 300cD	0 $\pm$ 0cE
Sêmen não diluído	3060 $\pm$ 600aA	600 $\pm$ 200bB	0 $\pm$ 0cC	-	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Diluyente A (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B (g/L) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm; Diluyente C (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm.

**Tabela 3.** Taxa de motilidade (%; média  $\pm$  desvio-padrão) do sêmen de *Epinephelus marginatus* (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, em atmosfera modificada (100% oxigênio), diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes.

Diluidores	Tempo de resfriamento (h)			
	0	12	24	48
A (pH 6,1)	100 $\pm$ 0aA	30 $\pm$ 10aB	10 $\pm$ 5aC	0 $\pm$ 0aC
B (pH 7,8)	100 $\pm$ 0aA	30 $\pm$ 10aB	10 $\pm$ 0aC	0 $\pm$ 0aC
C (pH 8,2)	100 $\pm$ 0aA	20 $\pm$ 5aB	10 $\pm$ 0aC	0 $\pm$ 0aC
Sêmen não diluído	100 $\pm$ 0aA	0 $\pm$ 0bB	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha,

apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Diluyente A (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B (g/L) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm; Diluyente C (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm.

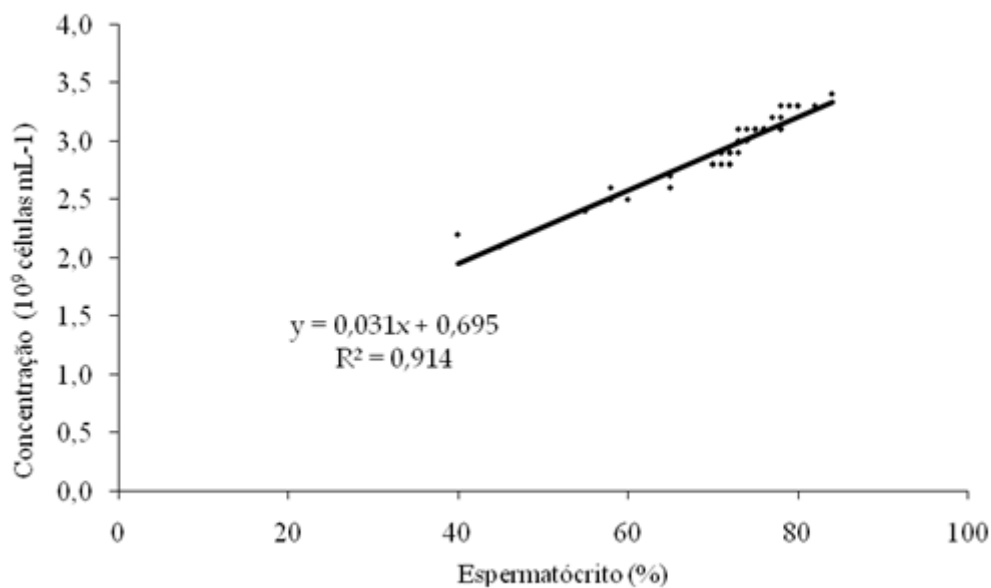
**Tabela 4.** Duração da motilidade (segundos; média  $\pm$  desvio-padrão) do sêmen de *Epinephelus marginatus* (n=10 machos, 3 replicatas/tratamento) submetido a refrigeração a 4 °C, em atmosfera modificada (100% oxigênio), diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes.

Diluidores	Tempo de resfriamento (h)			
	0	12	24	48
A (pH 6,1)	3060 $\pm$ 600aA	2100 $\pm$ 200aB	1000 $\pm$ 150aC	0 $\pm$ 0aD
B (pH 7,8)	3060 $\pm$ 600aA	2200 $\pm$ 300aB	1100 $\pm$ 200aC	0 $\pm$ 0aD
C (pH 8,2)	3060 $\pm$ 600aA	2000 $\pm$ 300aB	1000 $\pm$ 200aC	0 $\pm$ 0aD
Sêmen não diluído	3060 $\pm$ 600aA	0 $\pm$ 0bB	-	-

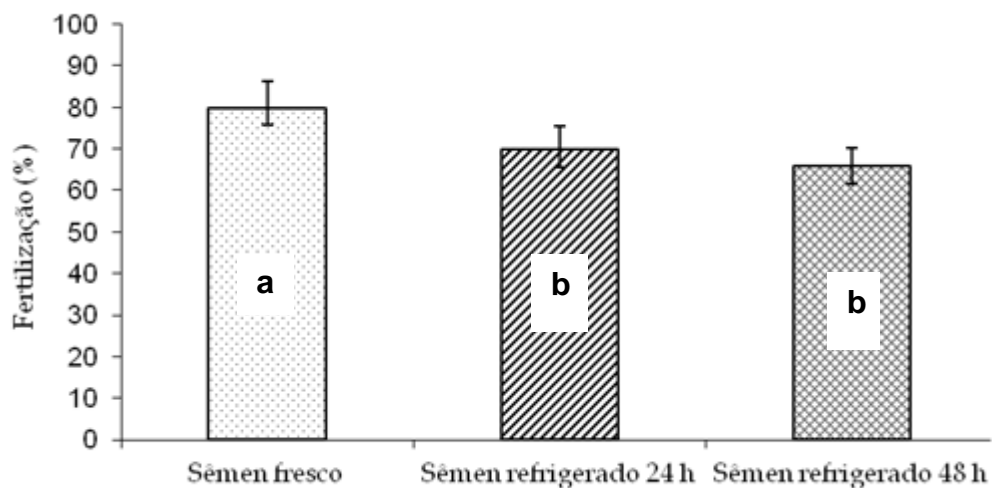
Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha,

apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Diluyente A (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B (g/L) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm; Diluyente C (g/L) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm.



**Figura 1.** Correlação entre concentração espermática (células mL<sup>-1</sup>) e espermatócrito (%) para o sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (n=20, P< 0,05).



**Figura 2.** Taxas de fertilização (médias  $\pm$  desvio-padrão) com sêmen fresco e sêmen diluído no diluente A e refrigerado a 4 °C por 24 e 48 horas em ovócitos de uma fêmea de *Epinephelus marginatus*. a-b Colunas com letras distintas apresentam diferenças significativas (teste de Tukey, P<0,05)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito de diferentes diluentes, em atmosfera normal e modificada, na preservação de sêmen refrigerado da garoupa-verdadeira, visando contribuir para a ampliação do conhecimento da biologia reprodutiva da espécie. Acredito que conseguimos alcançar os objetivos previstos inicialmente para esse estudo, obtendo bons e significativos resultados, trazendo uma nova ferramenta para melhorar os resultados obtidos na produção de formas jovens da espécie.

Através dos experimentos realizados conseguimos detectar que a refrigeração do sêmen é uma alternativa viável de curto prazo, por até 144 horas de conservação, utilizando-se diluentes específicos para manter uma qualidade espermática adequada. Os resultados indicam a nula efetividade da adoção de atmosfera modificada para a refrigeração do sêmen desta espécie, reduzindo a complexidade e os custos do procedimento de refrigeração. De forma inédita foi obtida a fertilização de ovócitos da garoupa-verdadeira com sêmen refrigerado por 48 horas, possibilitando a utilização desse procedimento na reprodução induzida desta espécie.

A refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira mostrou-se uma técnica de fácil adoção pelos empreendimentos comerciais, o que certamente elevará o nível técnico de produção de formas jovens da garoupa-verdadeira. As perspectivas futuras de adoção desta técnica devem contribuir para ganhos de escala na produção, possibilitando a redução no custo das formas jovens e permitindo ampliar sua disponibilidade junto aos produtores de peixes marinhos.