

Medição de Densidade Específica de Ovos e Larvas de Peixes do Rio Madeira

Relatório Técnico

Contrato JIRAU 263/09

Contratada:

Projeto Pacu Aqüicultura Ltda.

Responsáveis Técnicos:

Martin Halverson (Mestre em Aqüicultura)

Maristela Martins Halverson (Médica Veterinária)

Consultores Participantes:

Dr. Domingo Rodriguez Fernandez

Dr. Angelo Antonio Agostinho

Dr. Ronaldo Barthem

Fevereiro de 2010

INTRODUÇÃO

Existe uma ampla literatura sobre dispersão e outros fatores relacionados que influenciam a sobrevivência de ovos e larvas de peixes, principalmente das espécies marinhas de valor comercial.

A Densidade Específica (DE) define a flutuabilidade de ovos e larvas de peixes e é uma característica determinante na dispersão de espécies marinhas e de água doce que desovam em rios (Cowley *et al.*, 2009,).

A medição da DE de ovos e larvas em tempos modernos envolve a introdução dos mesmos em soluções salinas de concentrações variáveis, com o objetivo de determinar a densidade em que as amostras ficam em equilíbrio com a solução próxima às suas DE (Coombs, 1981, Tu *et al.*, 1999).

Existe pouca informação sobre DE e características físicas que influenciam a transposição de ovos e larvas de peixes de espécies de água doce, e virtualmente nada incluindo espécies Sul Americanas.

Informações sobre o tamanho e a DE de ovos e larvas de espécies de peixes durante todas as fases do seu desenvolvimento seria fundamental na modelagem de sua dispersão em rios. A importância do conhecimento da DE na fabricação de ovos artificiais, exibindo comportamento parecido com ovos autênticos em águas naturais, foi salientada no estudo de Stira *et al.*, 1976. Ovos artificiais fabricados de materiais de DE e tamanhos que imitaram propriedades físicas de ovos semi-flutuantes de peixes de água doce foram testados *in loco* (Dudley e Platania, 1999).

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi subsidiar os experimentos sobre deslocamentos de ovos e larvas em modelo reduzido com informações de densidade específica (DE) e diâmetro/comprimento de ovos e larvas de oito espécies de peixes representativas das grandes migradoras neotropicais (jaú, cachara, curimatá, matrinxã, tambaqui, pirarara e jurupense e jundiá).

MATERIAIS & MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em três etapas devido ao fato das espécies alvo não apresentarem condições adequadas para reprodução induzida ao mesmo tempo, sendo que as duas primeiras foram realizadas nas dependências do Projeto Pacu Aqüicultura, em Campo Grande/MS e a última em Pimenta Bueno/RO.

Os trabalhos da primeira etapa foram conduzidos entre os dias 20 a 24 de dezembro de 2009, tendo sido acompanhados de forma contínua pelos consultores doutores Domingo Rodriguez Fernandez e Angelo Antonio Agostinho. Nessa etapa foram avaliadas apenas cinco espécies, incluindo a curimatá *Prochilodus lineatus*, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*, o tambaqui *Colossoma mesopotamicus*, o matrinxã *Brycon orbignyanus* e a pirarara *Phractocephalus hemiliopterus*, uma vez que as demais espécies solicitadas para a determinação de DE não se apresentavam maduras neste período.

A segunda etapa foi realizada durante os dias 17 a 21 de janeiro de 2010, acompanhada pelos consultores doutores Domingo Rodriguez Fernandez e Ronaldo Barthem. As duas

espécies trabalhadas neste período foram o jaú (*Z. jehu*) e a jurupensem (*Surubim cf lima*). A espécie jurupoca (*Hemisurubim platyrhynchos*) encontrava-se madura para reprodução nessa etapa, entretanto não foi possível realizar a fecundação dos ovócitos e, por este motivo, as análises dessa espécie foram interrompidas.

A terceira etapa, que envolveu apenas o jundiá (*Rhandia sp*), foi realizada durante os dias 23 a 26 de janeiro de 2010, sem acompanhamento dos consultores da Energia Sustentável do Brasil S.A. (ESBR).

Nesse trabalho foi possível determinar a DE e o diâmetro e/ou comprimento de ovos e larvas de oito espécies conforme escopo definido de trabalho. A espécie *Surubim cf lima* (o jurupensem), peixe de couro nativo do rio Madeira, que não estava prevista inicialmente, também foi analisada. A pirarara *Phractocephalus hemioliopus* e jundiá *Rhandia sp*, que eram as duas espécies reservas, foram incluídas na análise, devido à impossibilidade de realizar as determinações propostas para a piraíba (*B. filamentosum*) e o barbado (*P. pinirampu*) face ao fato de, nesse ano, o plantel de reprodutores dessas duas espécies, atualmente em cativeiro no Projeto Pacu Aqüicultura, não terem apresentado ovários repletos de ovócitos maduros apropriados à indução da desova. Somente no próximo ciclo reprodutivo, no final de 2010 ou início de 2011, estes peixes poderão apresentar tais condições.

As oito espécies avaliadas com sucesso nas três etapas de trabalho foram: jaú (*Z. zungaru*), cachara (*P. fasciatum*), curimatá (*P. lineatus*), matrinxã (*B. orbignyanus*), tambaqui (*C. mesopotamicus*), jundiá (*Randia sp*), pirarara (*P. hemioliopus*) e jurupensem (*S. lima*).

Todos os exemplares utilizados neste trabalho, com exceção do curimatá, têm origem na bacia Amazônica. Os reprodutores do curimatá originam-se da bacia do Rio Paraguai. Trabalhos com esta espécie mostram que existe uma semelhança entre os curimatás da diferentes bacias.

Obtenção dos ovos e larvas

Os procedimentos de indução da ovulação, extrusão dos gametas, posterior fecundação *in vitro* e incubação foram todos realizados pela equipe de reprodução do Projeto Pacu Aqüicultura.

As desovas foram estimuladas/induzidas com aplicação de hormônios, seguindo técnicas estabelecidas pela equipe de produção do Projeto Pacu Aqüicultura. O processo de aplicação hormonal foi repetido nas situações em que as fêmeas não alcançaram a maturação gonadal desejada na primeira indução.

Após extrusão dos gametas e fecundação *in vitro*, a incubação prosseguiu em incubadoras cônicas de 200 L, com renovação e aeração da água. A manutenção das incubadoras durante o processo de incubação de ovos e larvas até o momento da primeira alimentação envolveu a lavagem das telas e a remoção de cascas de ovos e larvas mortas do sistema.

Os parâmetros oxigênio dissolvido (OD) e temperatura foram monitorados periodicamente nas incubadoras de onde foram retirados os indivíduos para análise. A temperatura variou entre 26,7 e 28 graus Celsius e o OD nas incubadoras variou entre 5,9 e 7,3 mg/L. Os parâmetros físico-químicos da água superficial utilizada nas incubadoras foram medidos antes de começar a análise, mostrando valores de pH = 6,7, dureza = 17 mg/L, temperatura = 27,5 °C, e OD = 6,1 mg/L. Estes parâmetros são

parecidos com os encontrados no rio Madeira, em Porto Velho, durante a época de reprodução (Bernardi *et al.*, 2009), incluindo pH = 6,5, temperatura = 28,0 °C e OD = 5,1 mg/L. A composição iônica da água é fator que influencia a DE e o tamanho dos ovos de peixe (Cowley, 2009).

Informações a respeito de temperatura média, aplicação de hormônios, tempo entre indução hormonal e desovas em horas-grau foram registradas e são apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Resultados das aplicações de hormônios na reprodução

Espécie	Hormônio	Dosagem (mg/kg) 1ª injeção / 2ª injeção	Data da Desova	Temperatura Média da Água (°C)	Horas-Grau
Curimatá <i>Prochilodus lineatus</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	20/12/09	28,1	262
Cachara <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	20/12/09	28,1	222
Tambaqui <i>Colossoma mesopotamicus</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	20/12/09	28,1	241
Matrinxã <i>Brycon orbignyianus</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	22/12/09	28,4	154
Pirarara <i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	22/12/09	28,4	242
Jaú <i>Z. jehu</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	17/01/10	27,7	231
Jurupensem <i>Surubim cf lima</i>	Pituitária de carpa	1 / 4	17/01/10	27,7	235
Jundiá <i>Rhandia sp</i>	LHRH(a) + Domperidona	0,3ug+0,3mg / 3ug+3mg	24/01/10	28,0	233

Medição de Densidade Específica

A estratégia utilizada para definir a DE foi identificar a densidade de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) de concentração equivalente à densidade dos ovos ou larvas avaliados, uma vez que o ovo ou a larva com a mesma densidade da solução salina fica “em equilíbrio”, ou seja, não ascende e não afunda quando nela é imerso. Esta estratégia foi utilizada por outros investigadores na medição de DE de ovos de peixe (Coombs, 1981; Sundnes *et al.*, 1965; Unuma *et al.*, 2005) e larvas (Tu *et al.*, 1998).

A DE foi aferida e o registro fotográfico realizado em ovócitos, ovos fecundados e larvas coletadas durante o processo de extrusão, incubação e desenvolvimento larval, sendo considerados os seguintes momentos do seu desenvolvimento: ovócito, uma hora após a fecundação, 4 horas após a fecundação, 16 horas após a fecundação,

imediatamente após a eclosão, 12 horas após a eclosão e no momento da primeira alimentação exógena.

Para melhor observação das larvas, especialmente daquelas mais ativas nos estágios finais da fase de alimentação endógena, as mesmas foram anestesiadas para permanecerem imóveis durante a análise da DE, procedimento utilizado em análise de DE de girinos vivos (Tu *et al.*, 1998). As larvas foram imersas em cloridrato de lidocaína a 2%, anestésico eficaz para peixes (Carrasco *et al.*, 1984).

A metodologia utilizada na medição da densidade específica foi adaptada pela equipe técnica do Projeto Pacu Aqüicultura depois de analisar a literatura existente e experimentar várias estratégias.

A determinação da DE envolveu quatro etapas:

1) A Preparação das soluções estoques foi realizada pesando cloreto de sódio (produto PA, da marca Dinâmica), em quantidades de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 g para cada litro de água (cuja fonte foi o poço do laboratório do Projeto Pacu Aqüicultura), agitando para dissolver e reservando as soluções nas respectivas concentrações em bolsas de 10 L.

2) A avaliação inicial de fluabilidade de ovos ou larvas foi realizada pela imersão de lotes de aproximadamente 10 ovos/larvas em provetas contendo as soluções estoques (5, 10, 20, 40, 60, 80 ou 100 g/L). Identificaram-se, inicialmente, as duas concentrações nas quais os ovos/larvas afundaram e ascenderam, respectivamente, considerando que entre essas duas concentrações estaria aquela com a mesma densidade do material biológico. A solução de densidade menor faz com que os ovos/larvas afundem, enquanto a solução de densidade maior faz com que os ovos/larvas ascendam até a superfície. Assim, foi possível identificar rapidamente a solução pré-determinada com a DE mais próxima a dos ovos/larvas.

3) Os ajustes fino na densidade das soluções estoques foram efetuados com adição de água pura para diluir, com o auxílio de picetas, ou de solução salina saturada com 350 g/L de NaCl para concentrar a solução, com bureta, tomando cuidado para homogeneizar previamente as novas soluções antes da introdução do material biológico. Essas modificações nas concentrações tiveram continuidade até que os ovos/larvas submersos chegassem ao seu ponto de equilíbrio, permanecendo suspensos, sem afundar ou ascender quando colocados em uma proveta com a solução. Novos lotes de ovos ou larvas eram introduzidos com frequência para eliminar interferências de natureza osmótica que levassem à perda ou ganho de água pelo material biológico. Assim, o ponto de equilíbrio foi definido rapidamente (geralmente em menos de 10 segundos) para evitar este problema.

4) A medição da DE da solução final foi feita com o auxílio de um densímetro ou “hydrometer” (marca INCOTERM, para densidades de 1,000 a 1,100 g/mL, calibração confirmada em 1,000 g/mL usando água de poço do Projeto Pacu Aqüicultura a 28 °C); e uma proveta de 500 mL. O resultado, obtido em g/mL, foi a medida da DE dos ovos ou das larvas.

Os diâmetros/comprimentos das diferentes fases e espécies consideradas na determinação da densidade específica foram estimados *a posteriori* com base em fotografias desse material e numa escala fotografada em microscópio estereoscópico com a mesma câmara e nos mesmos aumentos usados durante os trabalhos.

A documentação fotográfica dos equipamentos e da execução dos trabalhos é mostrada no **Anexo I** e o material utilizado para a obtenção dos ovos e larvas e na determinação de suas DE estão listados no **Anexo II**.

RESULTADOS

Os valores de DE nas diferentes fases de desenvolvimento dos ovos e larvas são apresentados na **Tabela 2**.

A maior densidade específica encontrada nas oito espécies analisadas foi referente aos ovócitos no momento da desova, com valores variando entre 1,044 e 1,065 g/mL. Todos os ovos fecundados afundaram rapidamente no momento que foram colocados nas incubadoras. O processo de hidratação dos ovos ao longo da primeira hora após a fecundação proporcionou uma queda rápida da DE. Todas as espécies chegaram perto da densidade da água, com valores entre 1,0005 para curimatá e 1,017 para cachara. Estes ovos “semi-flutuantes” subiram na coluna de água quando provocados com turbulência mínima. Somente os ovos de cachara ficaram aderentes, colando nas paredes das incubadoras. A DE permaneceu estável para todas as espécies durante esta fase do ovo hidratado até o momento da eclosão. Após este momento, a DE de todas as espécies aumentou, apresentando um valor próximo, mas levemente menor, à dos respectivos ovócitos, com valores entre 1,032 para tambaqui e 1,0473 para jurupensem. Todas as larvas mostraram a tendência de redução das DE ao longo do seu desenvolvimento até estarem preparadas para começar se alimentar.

O período de desenvolvimento observado desde a fecundação até a eclosão dos ovos foi semelhante, sendo de 14 horas para matrinxã a 18 horas para pirarara. Do momento da eclosão até a primeira alimentação exógena, este período foi mais variável entre as espécies, de 24 horas para matrinxã a 96 horas para tambaqui.

Tabela 2: Determinações da densidade específica (g/mL) e tempo de desenvolvimento dos ovócitos, ovos e larvas das espécies estudadas

Fase Espécie	Ovócito	1 hora após a Fecundação (Ovo)	4 horas após a Fecundação (Ovo)	16 horas após a Fecundação (Pré-eclosão)	Pós-Eclosão (horas após Fecundação)	12 horas após a Eclosão	Primeira alimentação exógena (horas após Eclosão)
Jaú <i>Z. jehu</i>	1,047	1,002	1,002	1,002	1,040 (16)	1,0355	1,030 (36)
Cachara <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	1,052	1,017	1,016	1,011	1,040 (16)	1,0275	1,0225 (36)
Curimatá <i>Prochilodus lineatus</i>	1,053	1,0005	1,001	1,0005	1,040 (16)	1,0275	1,026 (52)
Matrinxã <i>Brycon orbignyanus</i>	1,065 ± 0,000	1,005 ± 0,000	1,0053 ± 0,0003	1,006 ± 0,000	1,0413 ± 0,0003 (14)	1,0305 ± 0,000	1,0268 ± 0,0003 (24)
Tambaqui <i>Colossoma mesopotamicus</i>	1,044	1,002	1,001	1,001	1,032 (16)	1,028	1,023 (96)

Pirarara <i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	1,051 ± 0,0005	1,0025 ± 0,0005	1,0022 ± 0,0003	1,0025	1,0457 ± 0,0003 (18)	1,040 ± 0,000	1,032 ± 0,0015 (72)
Jurupensem <i>Surubim cf lima</i>	1,054 ± 0,0015	1,0025 ± 0,0005	1,0018 ± 0,0003	1,0018 ± 0,0003	1,0473 ± 0,0005 (16)	1,0401 ± 0,0016	1,0272 ± 0,0003 (36)
Jundiá <i>Rhandia sp</i>	1,046	1,002	1,0015	1,0015	1,042 (16)	1,040	1,037 (42)

A evolução da DE dos ovos e larvas das oito espécies até o momento da primeira alimentação exógena são apresentados nas **Figuras 1a-h**.

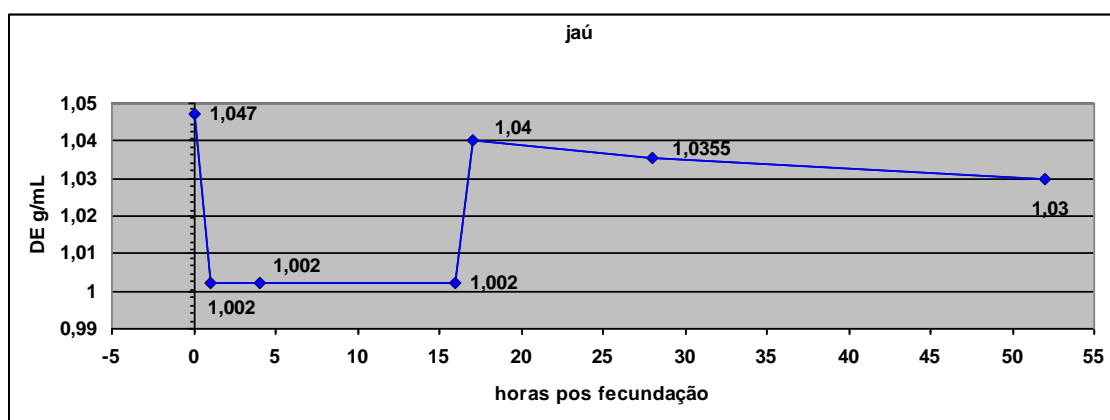


Figura 1a. Evolução de (DE) de ovos e larvas de jaú desde a desova até a primeira alimentação exógena.

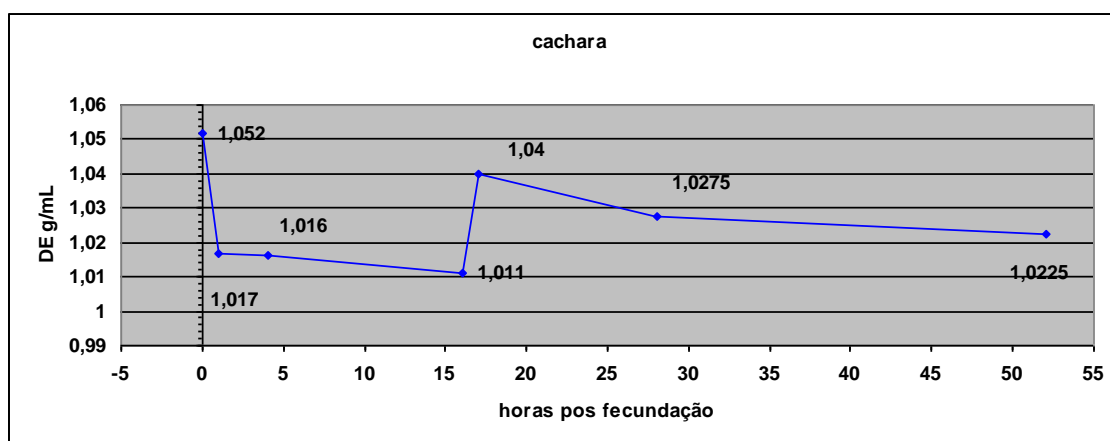


Figura 1b. Evolução de (DE) de ovos e larvas de cachara desde a desova até a primeira alimentação exógena.

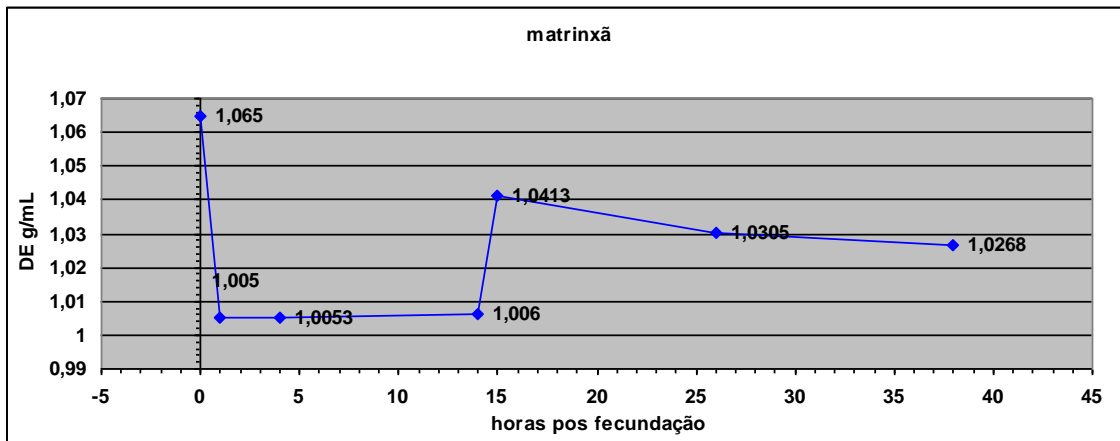


Figura 1c. Evolução de (DE) de ovos e larvas de matrinxã desde a desova até a primeira alimentação exógena.

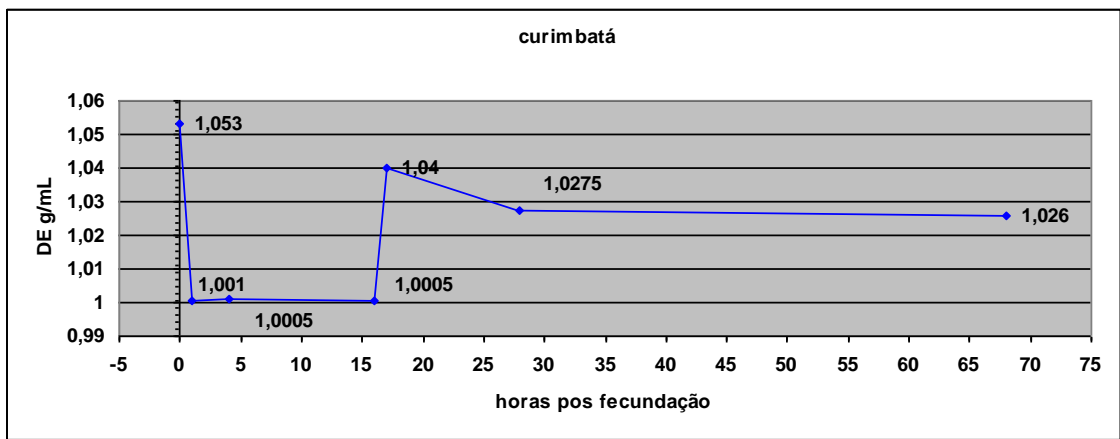


Figura 1d. Evolução de (DE) de ovos e larvas de curimbatá desde a desova até a primeira alimentação exógena.

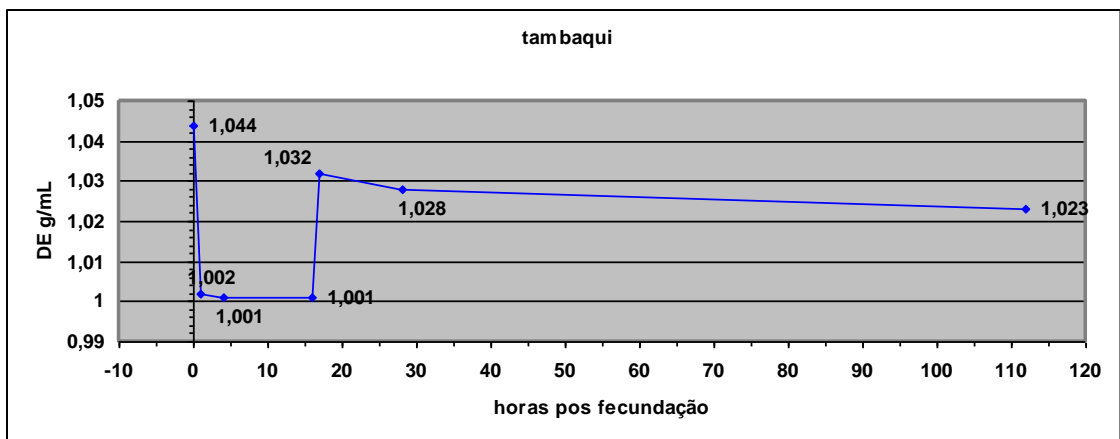


Figura 1e. Evolução de (DE) de ovos e larvas de tambaqui desde a desova até a primeira alimentação exógena.

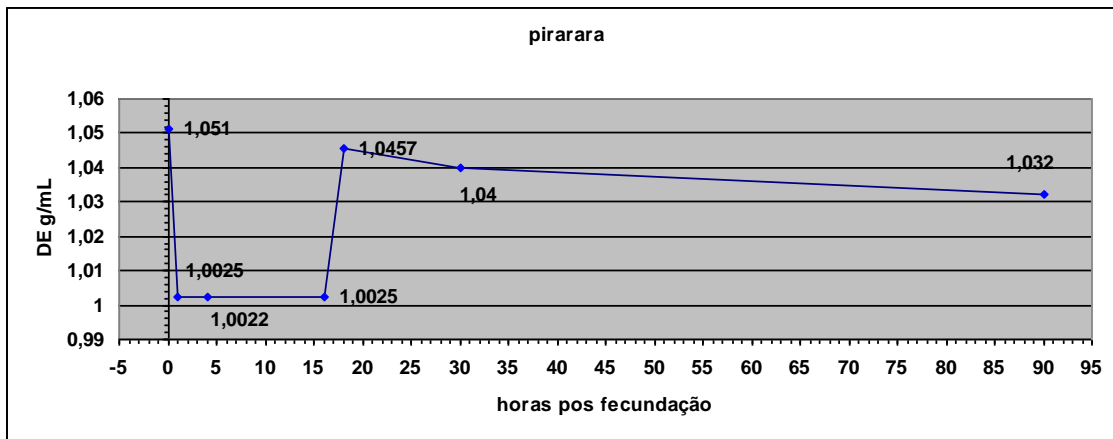


Figura 1f. Evolução de (DE) de ovos e larvas de pirarara desde a desova até a primeira alimentação exógena.

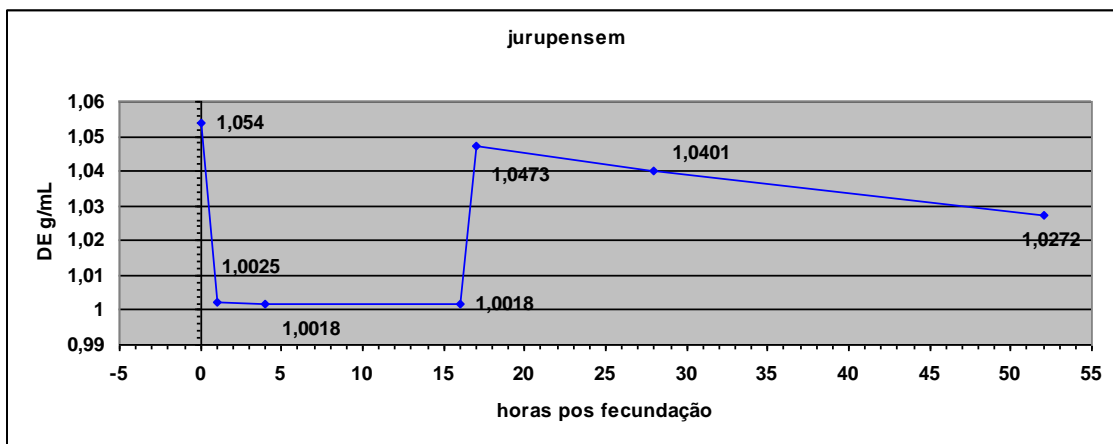


Figura 1g. Evolução de (DE) de ovos e larvas de jurupensem desde a desova até a primeira alimentação exógena.

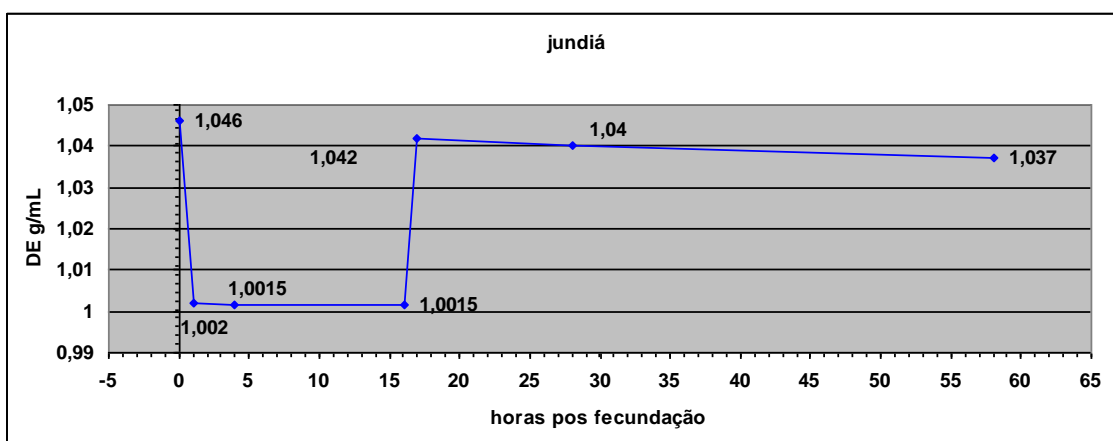


Figura 1h. Evolução de (DE) de ovos e larvas de jundiá desde a desova até a primeira alimentação exógena.

Os tamanhos dos ovos durante a primeira hora de hidratação e das larvas do momento da eclosão até a primeira alimentação exógena são apresentados na **Tabela 3**.

Os diâmetros aumentaram de 2,0 a 3,8 vezes durante a primeira hora após a fecundação da matrinxã e do tambaqui, respectivamente. Os ovócitos “secos” tomaram formatos distorcidos devido a sua proximidade. Ovos de cachara, jaú, jurupensem e pirarara apresentaram uma camada gelatinosa extra-chorionico, sem bordas distintas. Esta camada não foi considerada na medição do diâmetro.

As larvas recém eclodidas eram mais compridas do que o diâmetro dos ovos de onde saíram. As larvas de curimatá e tambaqui ficaram levemente dobradas dentro do ovo, sendo a matrinxã a espécie mais apertada. Larvas avançadas começando a se alimentar mostraram variações maiores de tamanho dentro do mesmo lote do que as outras fases. As larvas não foram alimentadas, mas algumas delas apresentaram conteúdo estomacal, sugerindo consumo de pedaços de ovos ou de alimentos exógenos que podem ter entrado nas incubadoras com a água de abastecimento. No caso da matrinxã, o crescimento rápido foi observado devido ao canibalismo.

Tabela 3: Medidas dos tamanhos de ovócitos, ovos e larvas das espécies estudadas.

Espécie	Fase	Diâmetro ou Comprimento (mm)
Tambaqui <i>Colossoma mesopotamicus</i>	Ovócito	1,0 ± 0,3
	Ovo fecundação + 1 hora	3,8 ± 0,2
	Larva recém eclodida	4,0 ± 0,2
	Larva Boca Aberta	5,6 ± 0,5
Curimatá <i>Prochilodus lineatus</i>	Ovócito	1,2 ± 0,3
	Ovo fecundação + 1 hora	3,6 ± 0,3
	Larva recém eclodida	3,8 ± 0,4
	Larva Boca Aberta	6,1 ± 0,4
Matrinxã <i>Brycon orbignyanus</i>	Ovócito	0,9 ± 0,1
	Ovo fecundação + 1 hora	1,8 ± 0,3
	Larva recém eclodida	4,3 ± 0,3
	Larva Boca Aberta	6,8 ± 1,5
Cachara <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Ovócito	0,9 ± 0,1
	Ovo fecundação + 1 hora	1,8 ± 0,2
	Larva recém eclodida	3,5 ± 0,3
	Larva Boca Aberta	5,4 ± 1,0
Pirarara <i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	Ovócito	1,0 ± 0,2
	Ovo fecundação + 1 hora	2,2 ± 0,4
	Larva recém eclodida	3,6 ± 0,4
	Larva Boca Aberta	5,5 ± 0,9
Jaú	Ovócito	1,2 ± 0,4

<i>Z. jehu</i>	Ovo fecundação + 1 hora	2,3 ± 0,2
	Larva recém eclodida	3,3 ± 0,3
	Larva Boca Aberta	6,0 ± 0,8
Jurupensem <i>Surubim cf lima</i>	Ovócito	0,8 ± 0,3
	Ovo fecundação + 1 hora	2,4 ± 0,3
	Larva recém eclodida	3,6 ± 0,4
	Larva Boca Aberta	5,2 ± 1,2
Jundiá <i>Rhandia sp</i>	Ovócito	0,6 ± 0,1
	Ovo fecundação + 1 hora	1,4 ± 0,1
	Larva recém eclodida	2,8 ± 0,4
	Larva Boca Aberta	3,4 ± 0,5

As relações entre tamanho e DE são apresentadas nas **Figuras 2a-h**. O aumento de diâmetro dos ovos durante a primeira hora pós-fecundação (período de hidratação dos ovos), foi inversamente proporcional às DE dos mesmos. Durante o período de alimentação endógena do saco vitelino, as larvas aumentaram de comprimento enquanto sua DE diminuiu.

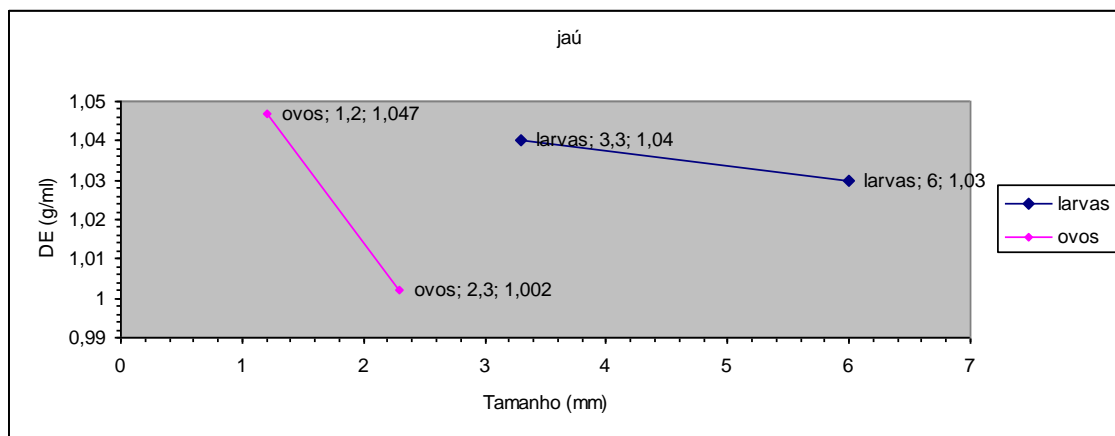


Fig 2a. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de jaú.

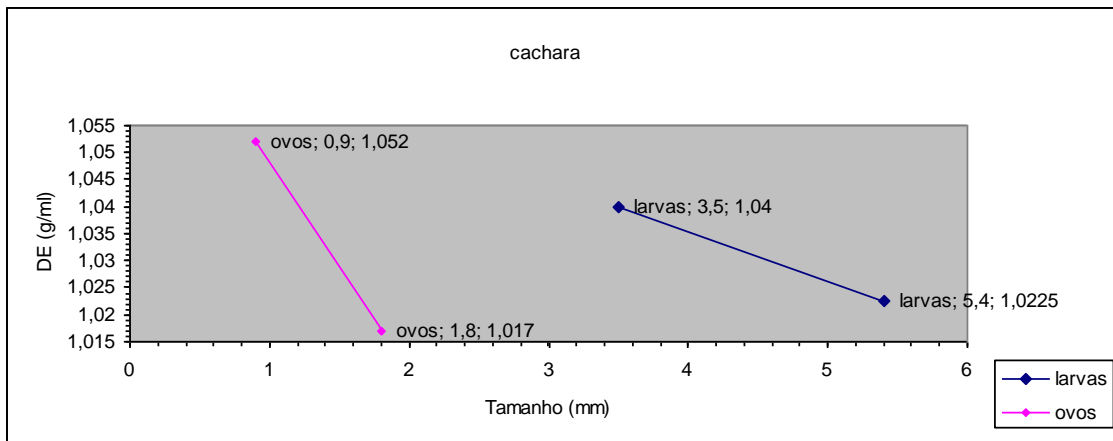


Fig 2b. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de cachara.

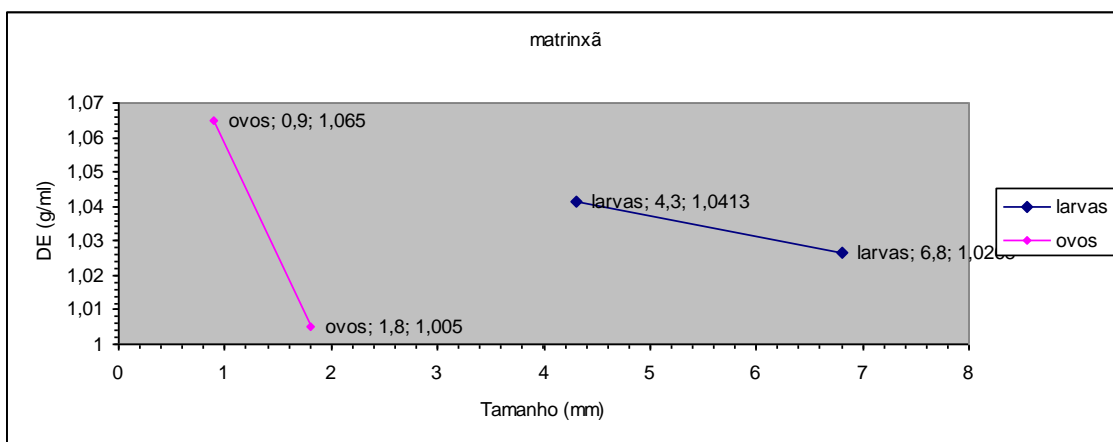


Fig 2c. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de matrinxã.

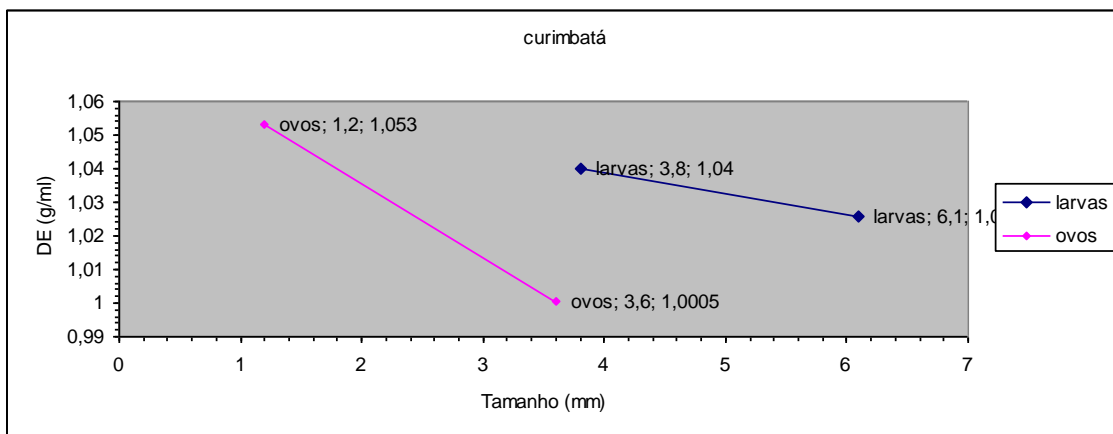


Fig 2d. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de curimatã.

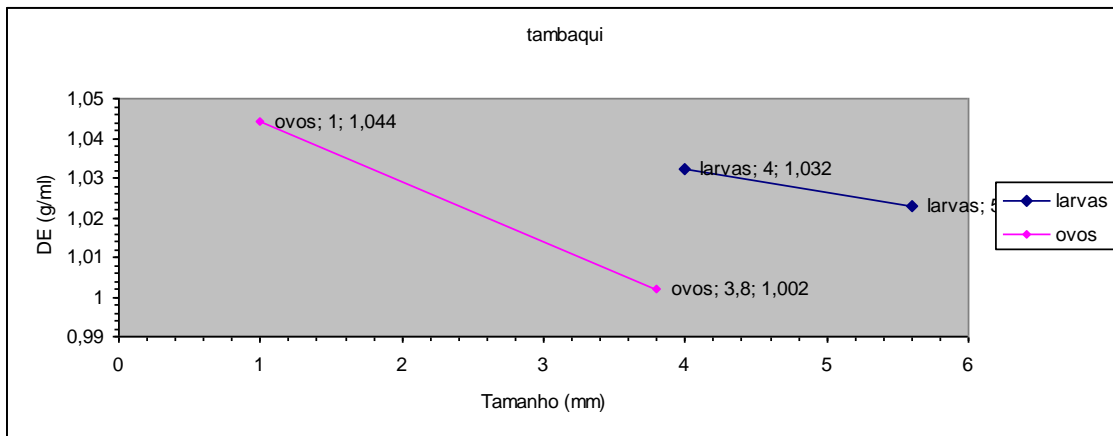


Fig 2e. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de tambaqui.

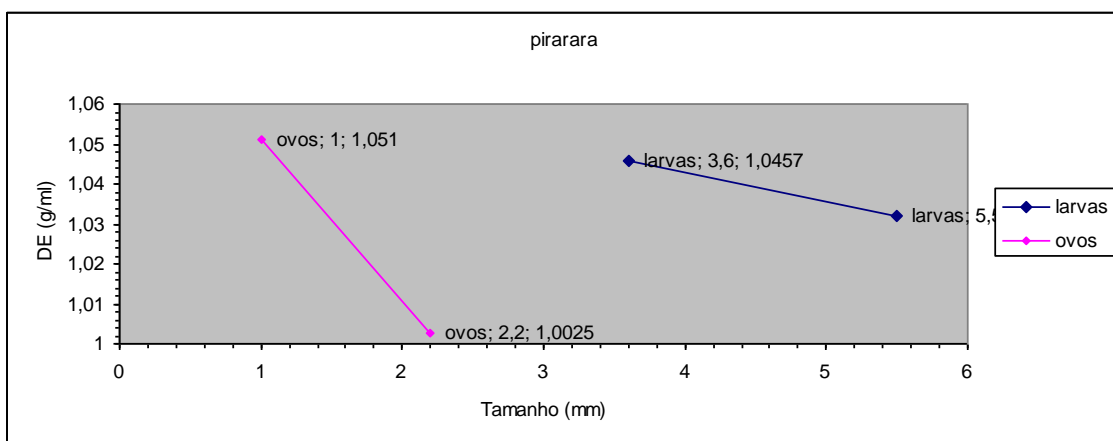


Fig 2f. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de pirarara.

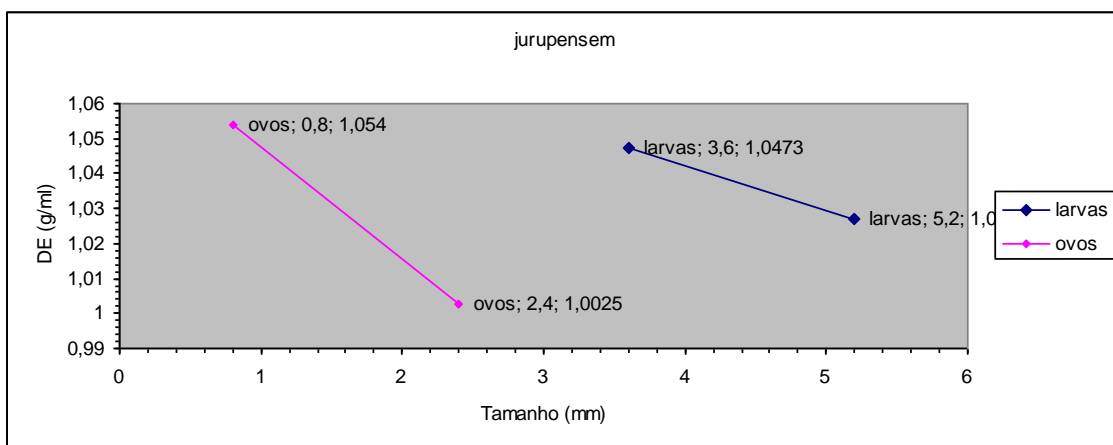


Fig 2g. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de jurupensem.

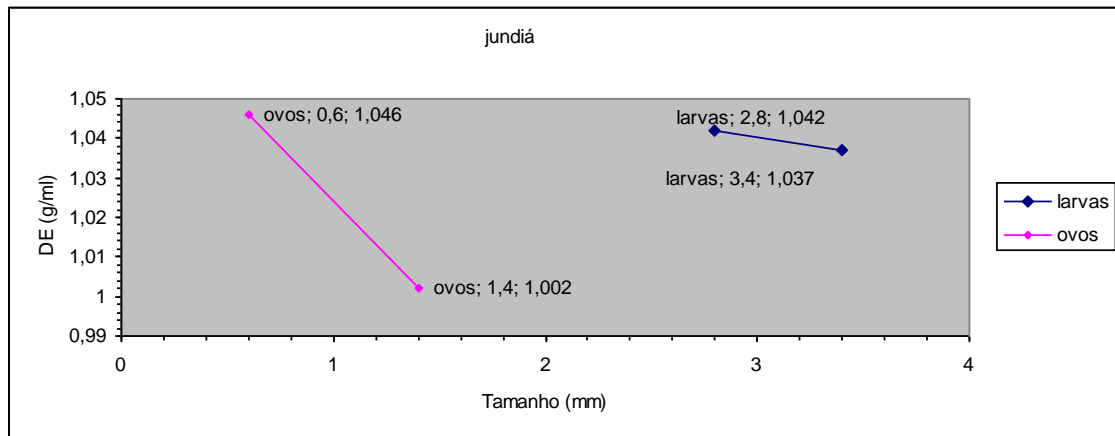


Fig 2h. Relação entre tamanho em mm e DE para ovos e larvas de jundiá.

DISCUSSÃO

Não foram encontradas na literatura referências sobre medição de DE em espécies de água doce que acompanharam ovos e larvas desde o momento da desova até o momento da alimentação exógena.

No momento da desova de todas as espécies estudadas, ovócitos apresentaram uma maior DE, afundando rapidamente na água. Possivelmente esta característica facilita a fecundação, uma vez que o fundo delimita a área, concentrando espermatozóides e ovos juntos durante o curto período crítico da abertura do micropile dos ovócitos e da motilidade dos espermatozóides. A hidratação dos ovos fez com que os mesmos ficassem menos densos imediatamente após a fecundação, tornando-os “semi-flutuantes”. Esta condição deve facilitar o movimento para jusante e a dispersão conforme a correnteza do rio. Uma exceção ocorreu com cachara, que apresentou ovos aderentes, podendo se fixar no substrato.

Após eclodir, as larvas de todas as espécies se tornaram bem mais densas do que os ovos hidratados, novamente afundando. Todas as larvas recém eclodidas exibiram um movimento vertical e repetitivo, subindo até a superfície da água, descendo sem se mexer até o fundo, e imediatamente subindo novamente. Este movimento deve ser considerado em qualquer modelagem de movimentos e deslocamento de larvas em ambientes lóticos. Estas larvas devem continuar acompanhando o movimento para jusante das águas dos rios onde se encontram. Larvas mais avançadas, chegando a fase da primeira alimentação mostraram inflação das bexigas natatórias, posicionamento e natação horizontal, e reações fugitivas. Certamente estes desenvolvimentos facilitam a procura de alimentos e movimentos autônomos.

A metodologia empregada para medir DE foi semelhante a de um estudo realizado em *Anguilla japonica* (Unuma, 2005), e adaptada neste trabalho com objetivo de melhorar a velocidade da medição e sua precisão. A metodologia de Unuma também avaliou grupos de ovos colocados em soluções salinas de várias concentrações, com o objetivo de identificar a solução mais próxima da DE do grupo de ovos, mas não empregou a última etapa do presente trabalho, onde as soluções foram ajustadas para definir mais precisamente as DE. No trabalho realizado por Unuma os ovos ficaram mais tempo imersos nas soluções, sendo expostos a alterações ocorridas por mudanças osmóticas observadas por outros investigadores (Coombs, 2001; Cowley, 2009).

Uma das técnicas mais utilizadas nos últimos anos para definir DE de ovos de peixe envolve utilização do “Density-Gradient Column” (Coombs 1981), que é uma proveta com soluções de densidades diferentes que se separam. Assim, forma-se um gradiente de concentrações diferentes dentro do mesmo recipiente, onde cada ovo introduzido pára em um ponto da coluna onde fica em equilíbrio com a solução. Também são introduzidos “glass beads” (bolinhas de vidro) especificamente fabricadas para medição de DE de líquidos, cada uma parando na coluna onde encontra sua DE. Aparentemente o sistema funciona bem, desde que informação prévia indique a DE aproximada do material a ser avaliado. Os “glass beads” são caros e a abrangência e a precisão de medição exigem uma grande quantidade dos mesmos para avaliar todas as possibilidades de DE. Além de que existem várias críticas ao sistema, como: 1) a introdução de material biológico acaba misturando as soluções, destruindo o gradiente; 2) uma quantidade insuficiente de “glass beads” resulta na falta de precisão quando os ovos param no espaço entre as bolinhas. Em um estudo de DE com o North American minnow, não foi possível medir DE de ovos recém desovados por faltar “glass beads” de DE adequada (Cowley 2009); 3) uma grande parte dos ovos introduzidos não serve para medição, devido a bolhas de ar ou a outros “artefatos” que aderem aos ovos (Adlandsvik *et al.* 2001); 4) as coleções completas de “glass beads” não são encontradas a pronta entrega no mercado, sendo fabricadas somente sob encomenda, que deve ser feita com bastante antecedência da data a serem utilizadas. Por todos estes motivos, optou-se por não empregar esta metodologia.

Diferenças individuais de DE foram observadas entre ovos ou larvas do mesmo lote. Durante avaliação de flutuabilidade de ovos e larvas, foi possível identificar vários motivos para as diferenças de DE:

1. Ovos e larvas do mesmo lote apresentam taxas de desenvolvimento diferentes. O fato de demorar algumas horas para eclodir todos os ovos de uma desova demonstra esta diferença.
2. Muitos ovos e larvas sofrem de deformidades.
3. Rompimento do chorion faz com que a DE aumente, pois ovos sem chorion afundaram enquanto os outros permaneceram em equilíbrio. Como o chorion é transparente, fica difícil observar se um ovo está com chorion rompido sem auxílio do microscópico. Foi necessário cortar as pontas das pipetas de Pasteur descartáveis aumentando seu diâmetro, para que não rompessem o chorion de ovos maiores.

Como no caso do estudo do Adlandsvik, observou-se pequenas bolhas de ar aderidas a alguns ovos e larvas. No caso do presente trabalho foi fácil liberar estas bolhas com agitação dos ovos dentro das soluções com um bastonete. Assim, foi possível observar a flutuabilidade de grupos de ovos ou larvas, a maioria mostrando o mesmo comportamento dentro de uma solução. Perto de 80% dos ovos no estudo do Adlandsvik foram descartados devido a este problema.

O sistema utilizado é adequado, com flexibilidade e agilidade para medir qualquer DE sem empregar equipamentos caros, mostrando ainda a possibilidade de repetir as medições quando necessário sem prejudicar o andamento das mesmas.

Foram realizadas desovas viáveis de mais de uma fêmea somente em três das oito espécies analisadas, sendo pirarara, jurupensem e matrinxã. Estas repetições mostraram valores de DE muito parecidos, com desvio máximo de 0,0016, confirmando a precisão do sistema de medição. Avaliação de mais desovas seria interessante para aumentar a

confiabilidade dos resultados e fundamental para execução de pesquisas avaliando estatisticamente possíveis fatores que influenciam a DE de ovos e larvas de peixes.

A medição de ovos e larvas individualmente pode ser feita para obter uma distribuição maior de resultados. A análise de fotos para medir o tamanho dos ovos e larvas foi eficaz, mas trabalhosa comparada com medição direta utilizando dispositivo próprio para medição milimétrica.

Sugestões para futuras investigações de DE, incluem: utilizar o sistema proposto para avaliação rápida da DE de lotes/desovas, seguida de medição de DE de ovos ou larvas individualmente e realizar a avaliação visual com estereoscópio equipado com escala milimétrica e máquina fotográfica digital. Esse equipamento é útil para medir tamanho, fotografar e analisar a condição física de cada exemplar, trazendo mais precisão ao trabalho, esclarecendo a natureza das diferenças individuais e fornecendo repetições necessárias para análise estatística.

Campo Grande/MS, 07 de março de 2010.

Martin Halverson
Mestre em Aqüicultura

Maristela Halverson
Médica Veterinária
CRMV-MS 1357

ANEXO I – FOTOS



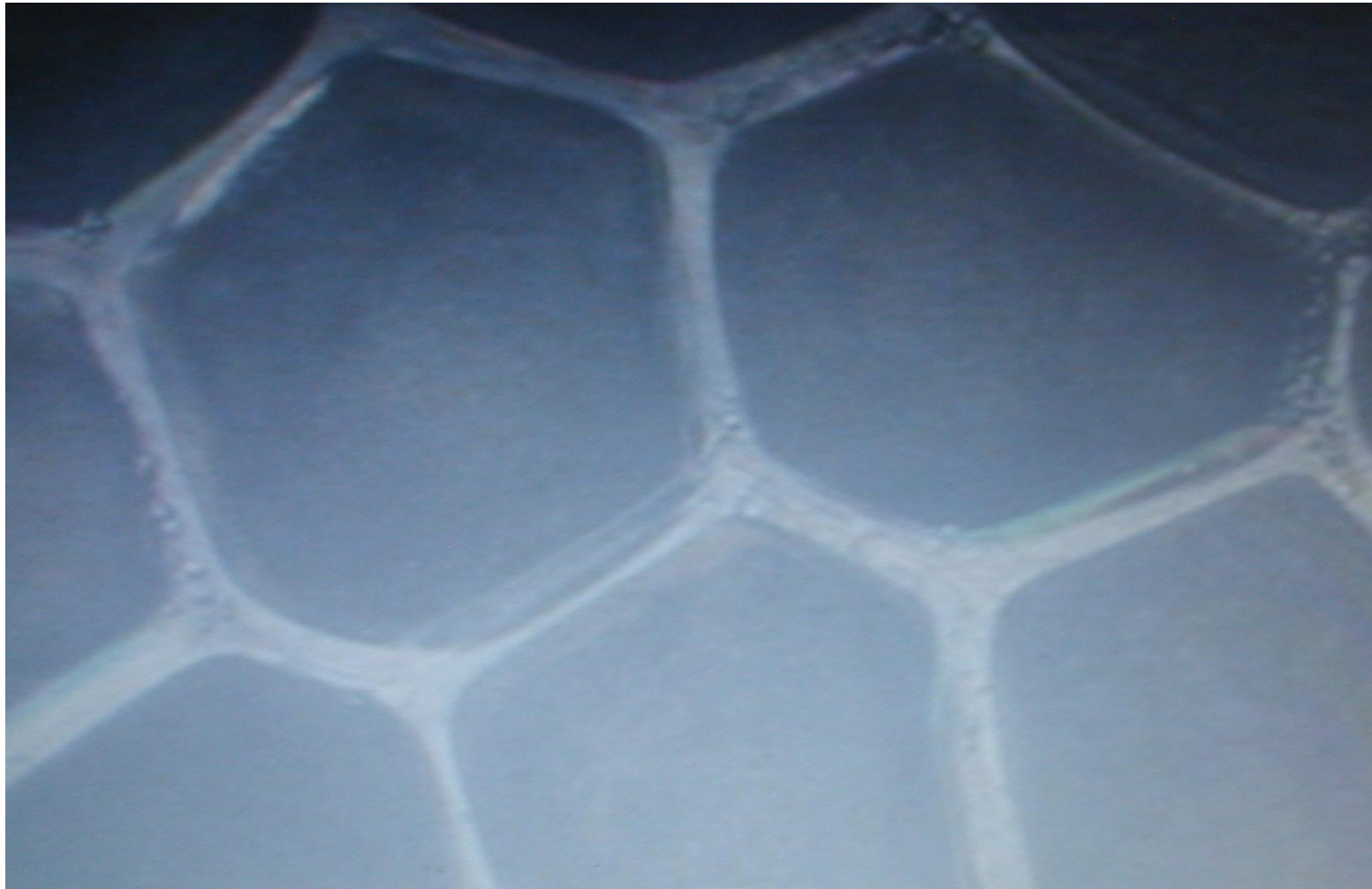
Curimbatá



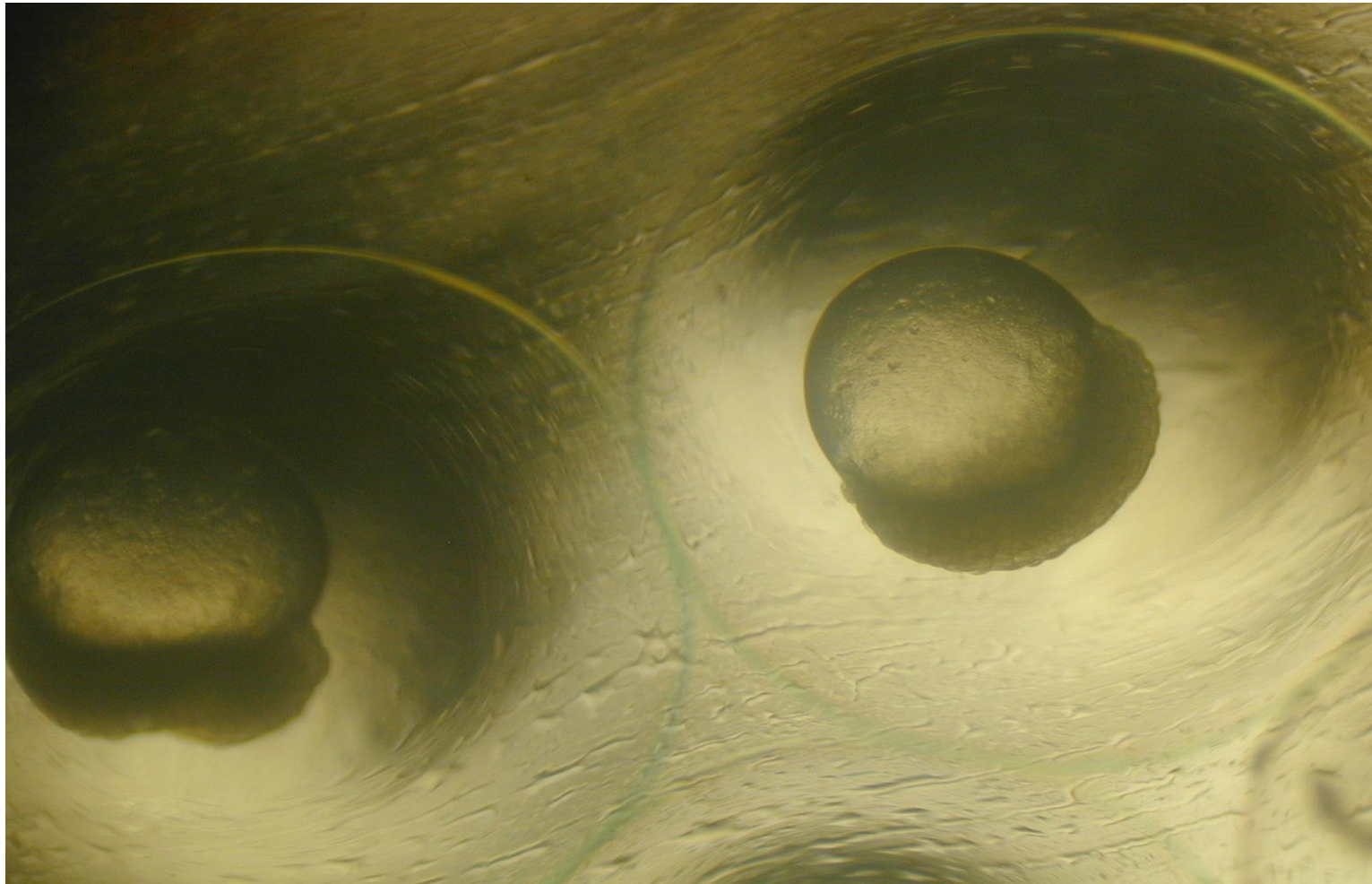
Desova curimbatá



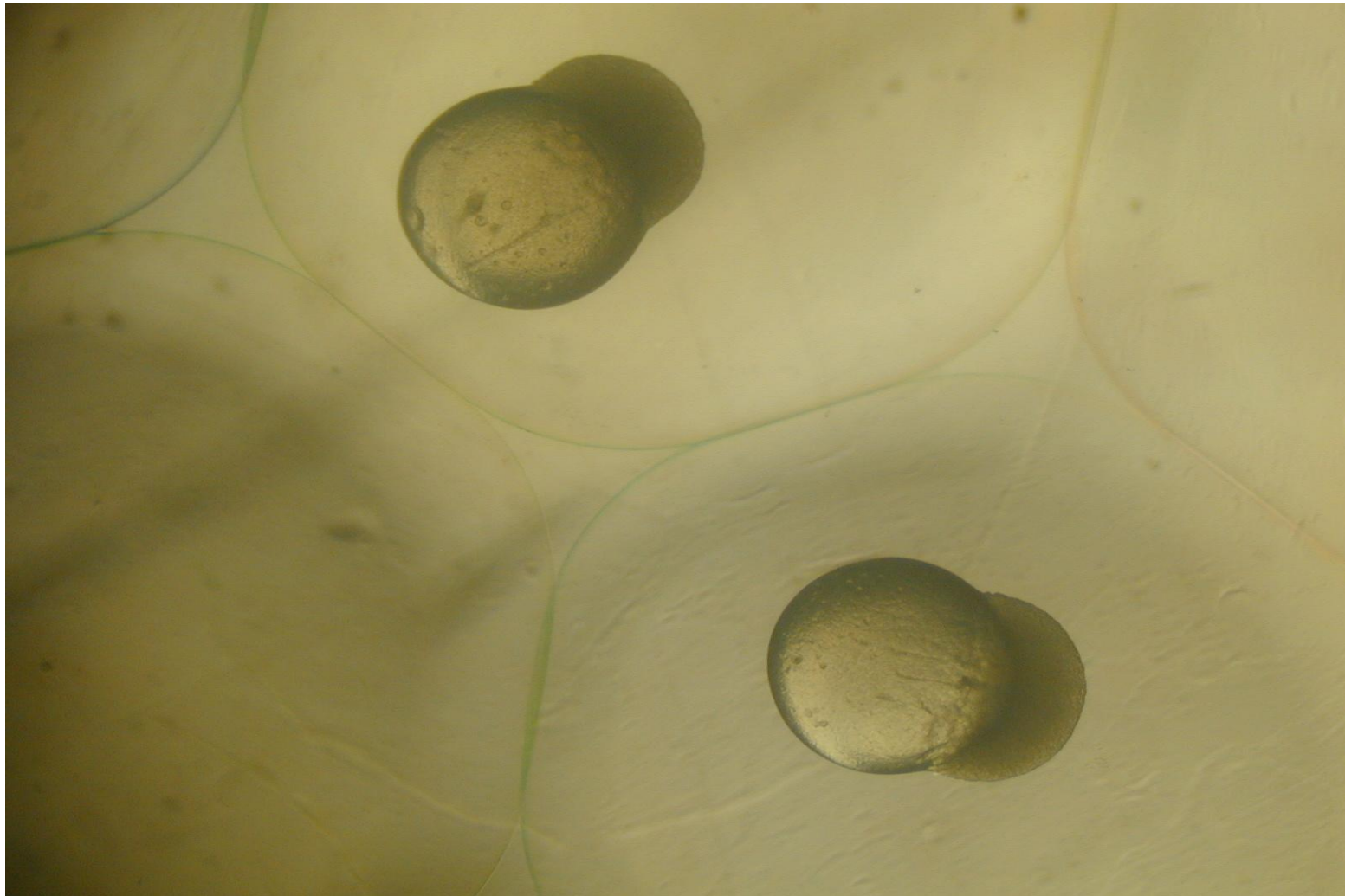
Fecundação curimatá



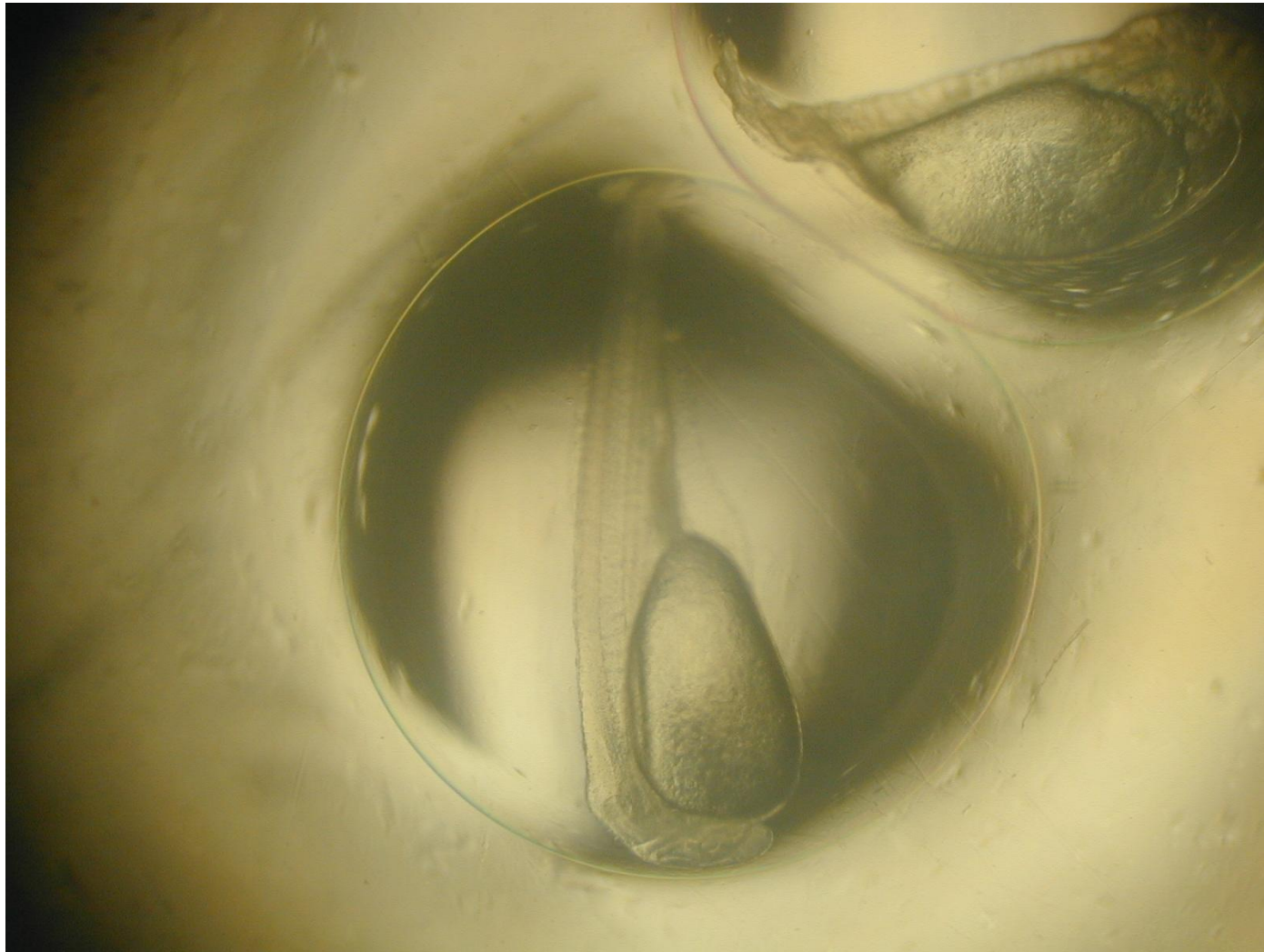
Ovócitos curimbatá



Curimatá fecundação + 1 hora



Curimbatá fecundação + 4 horas



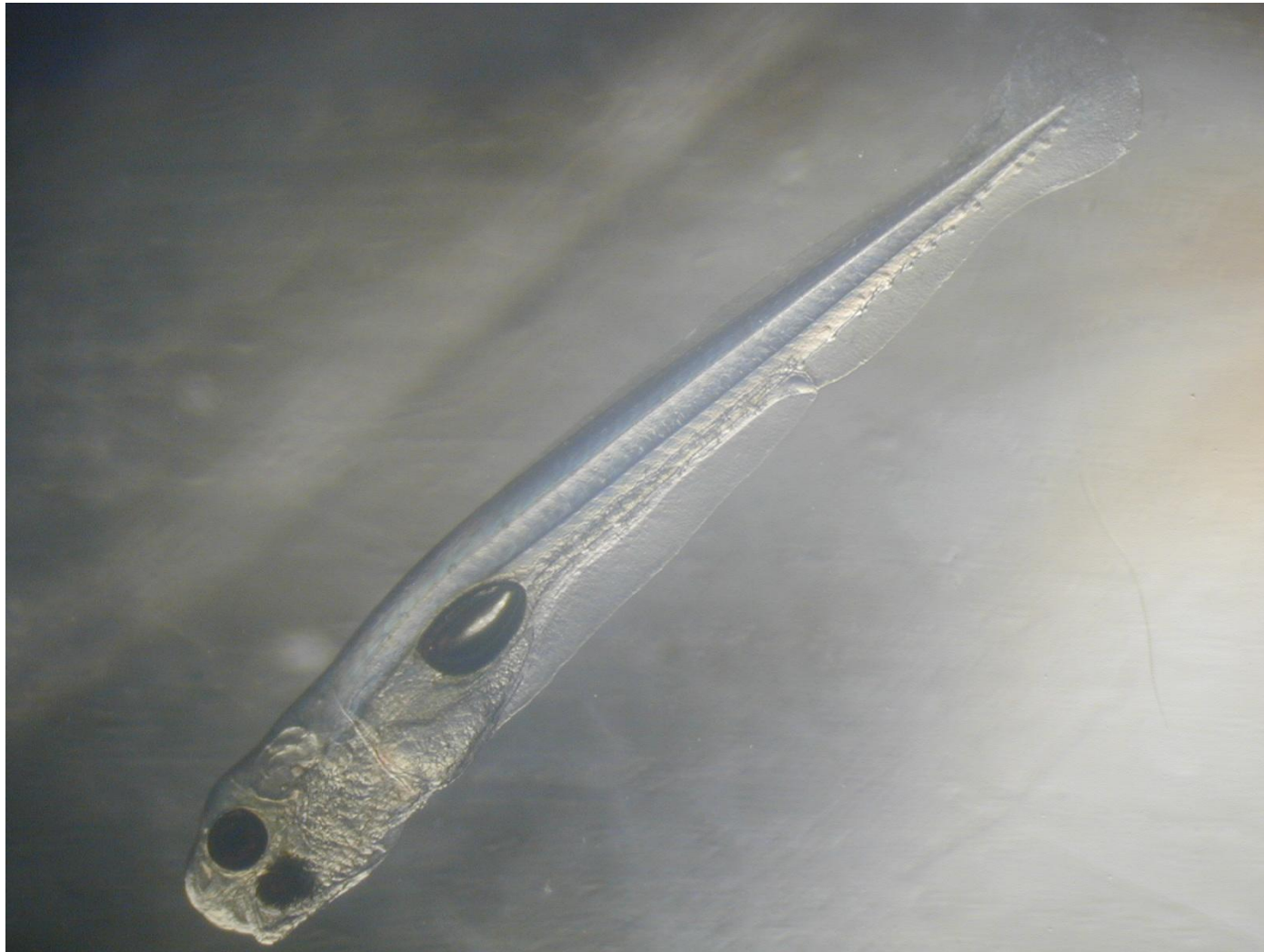
Curimbatá fecundação + 16 horas



Curimbatá recém eclodido



Curimatá eclosão + 12 horas



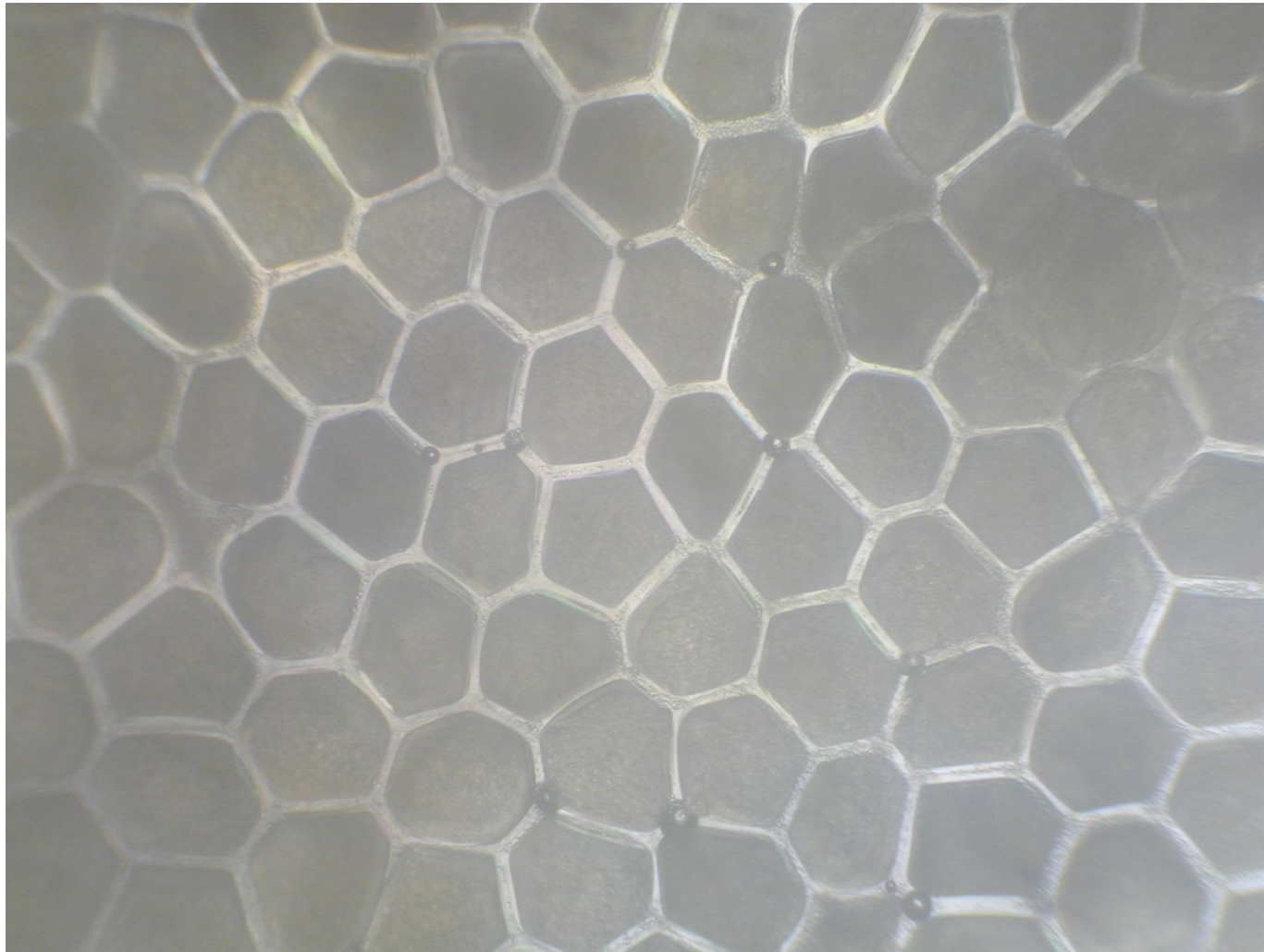
Curimatá eclosão + 52 horas se alimentando



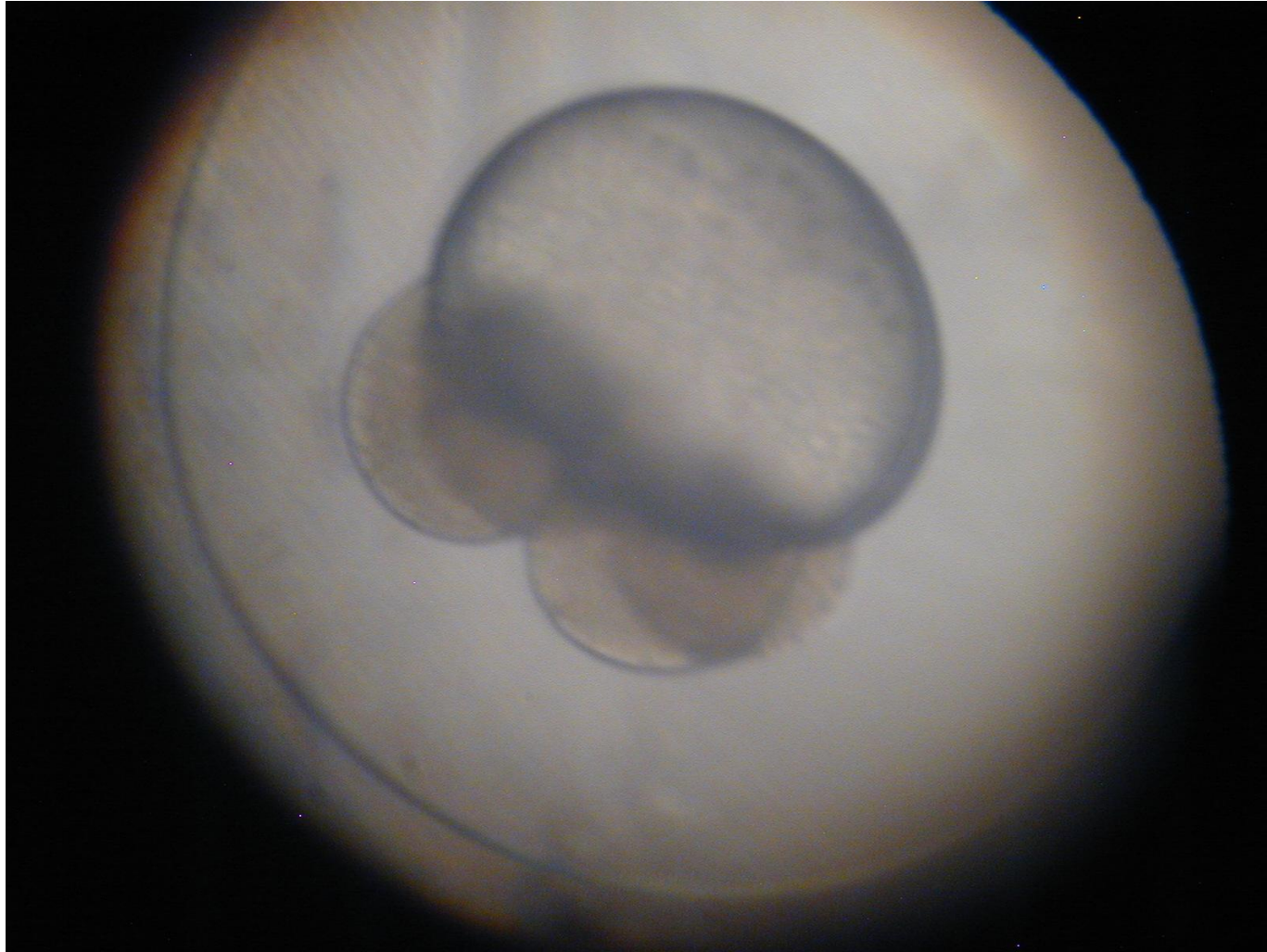
Jundiá antes de desovar



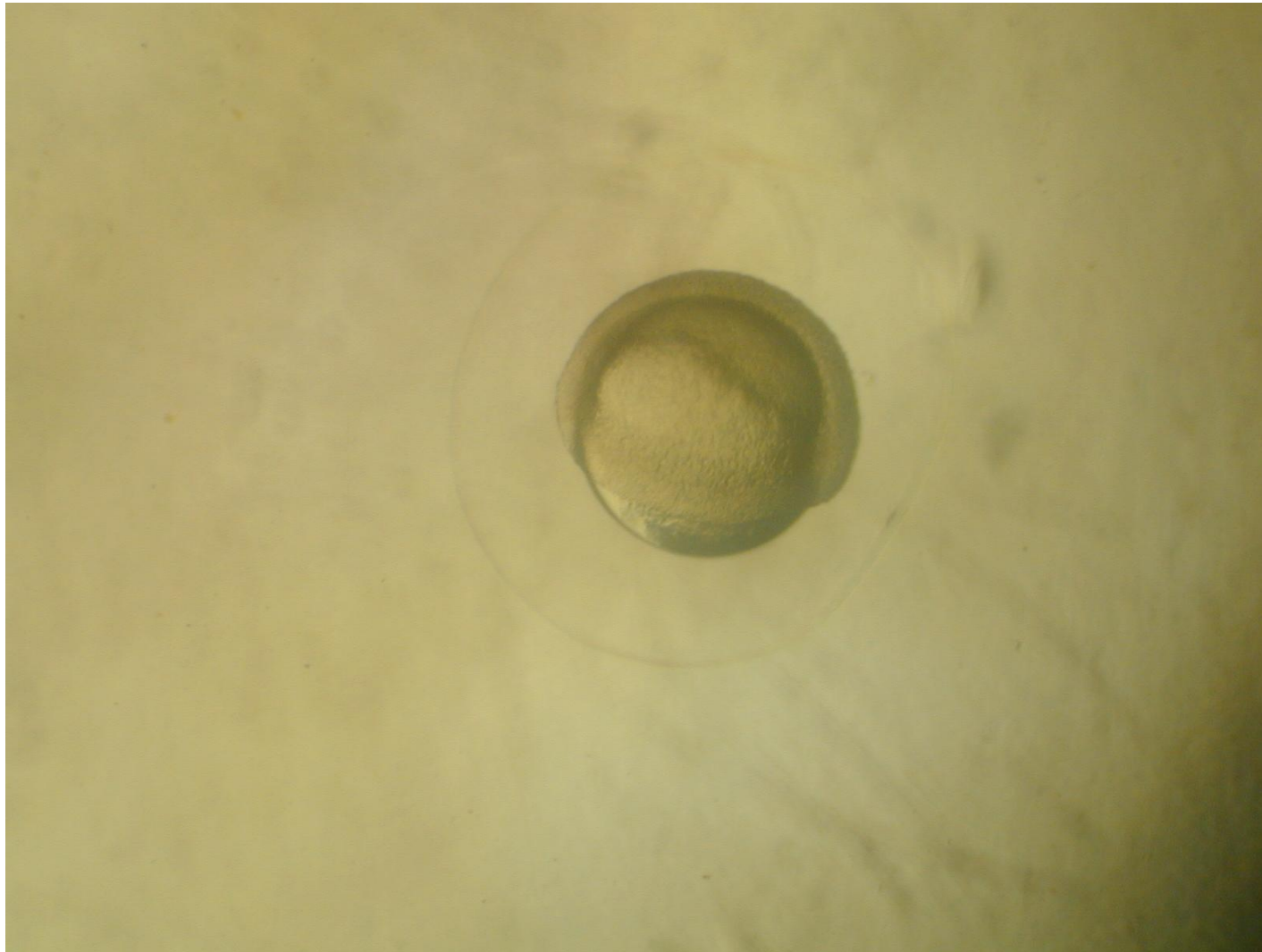
Desova jundiá



Jundiá ovócitos



Jundiá fecundação + 1 hora



Jundiá fecundação + 4 horas



Jundiá fecundação + 16 horas



Jundiá recém eclodida



Jundiá eclosão + 12 horas



Jundiá se alimentando



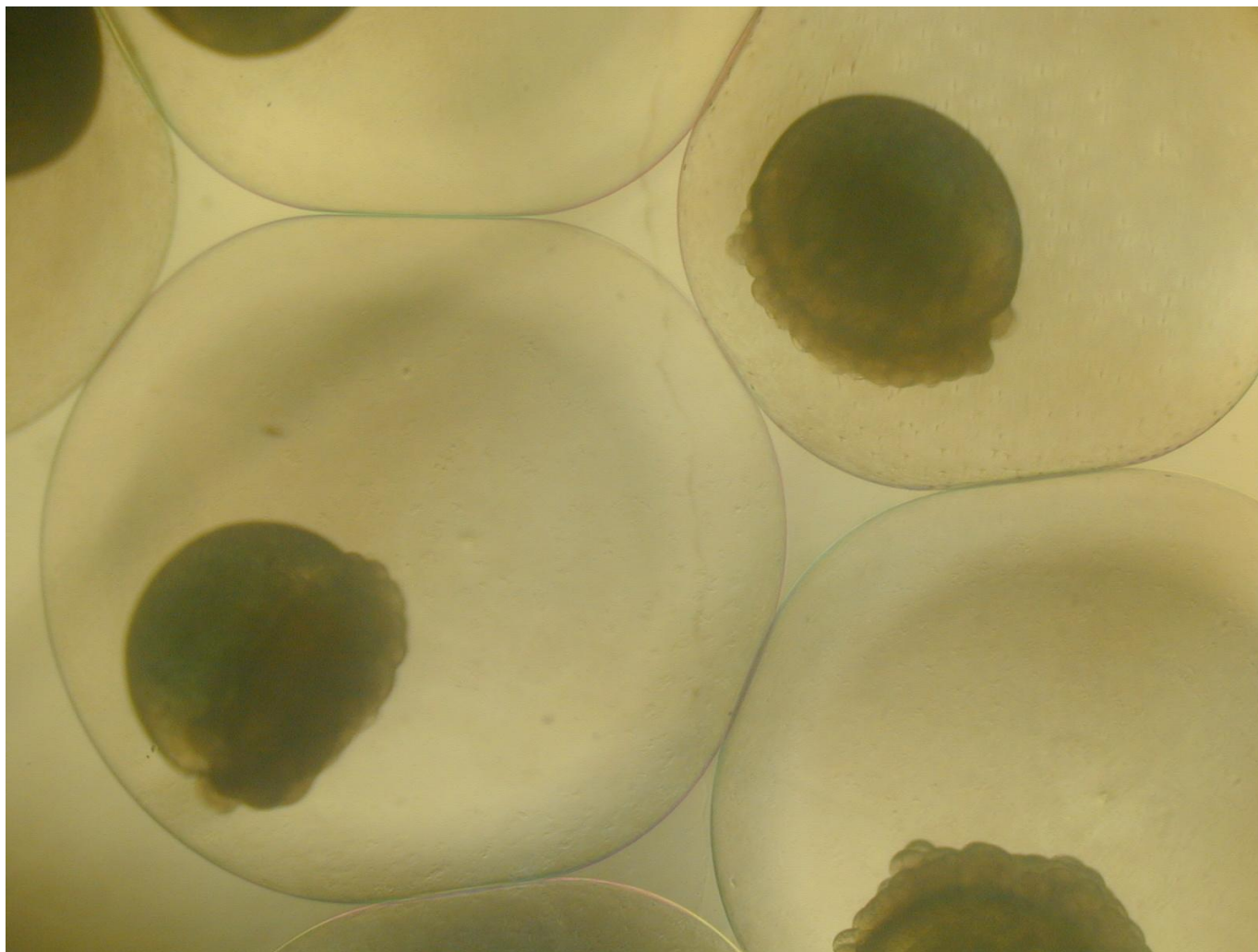
Matrinxã



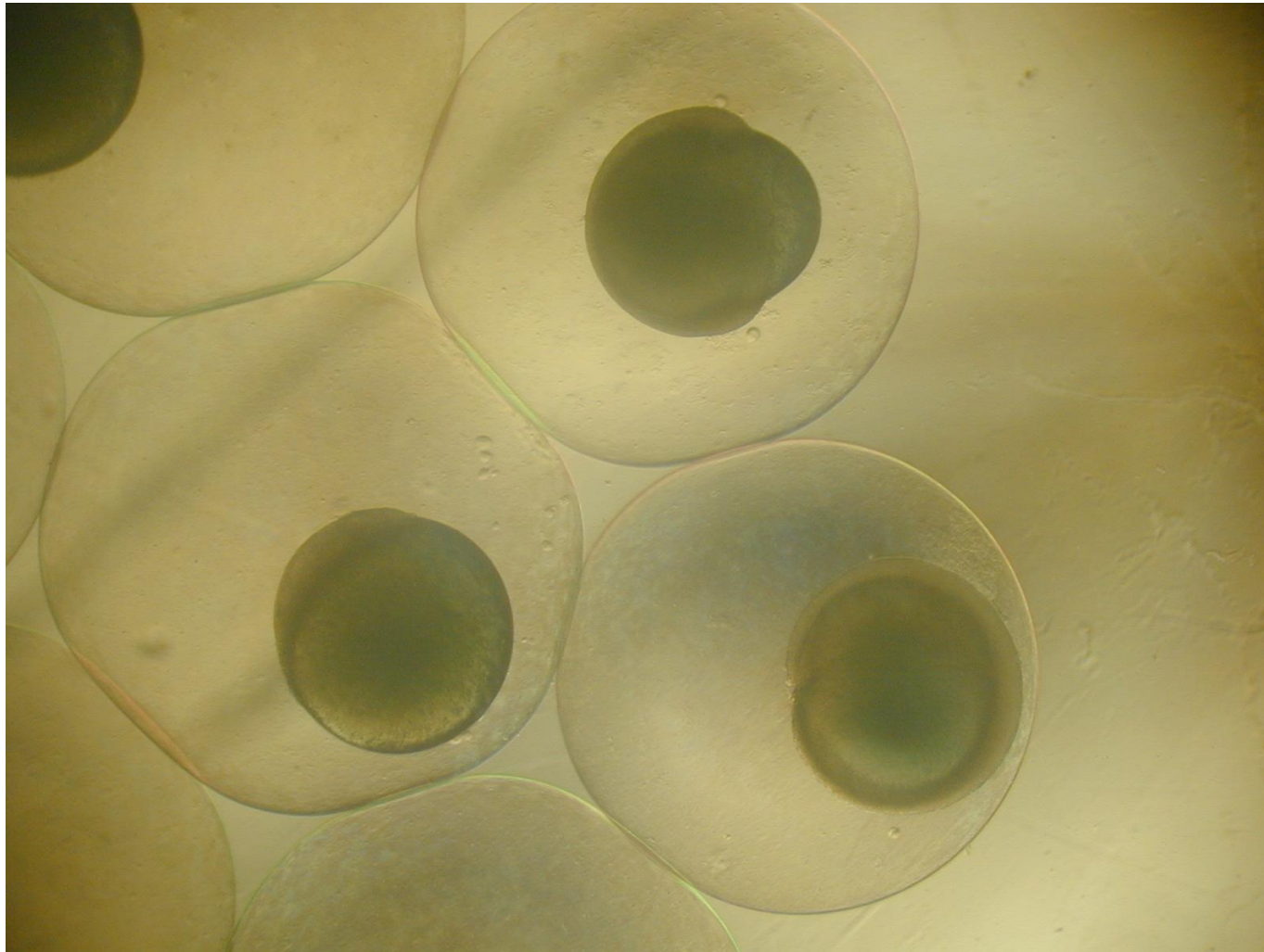
Matrinxã aplicação de hormônio



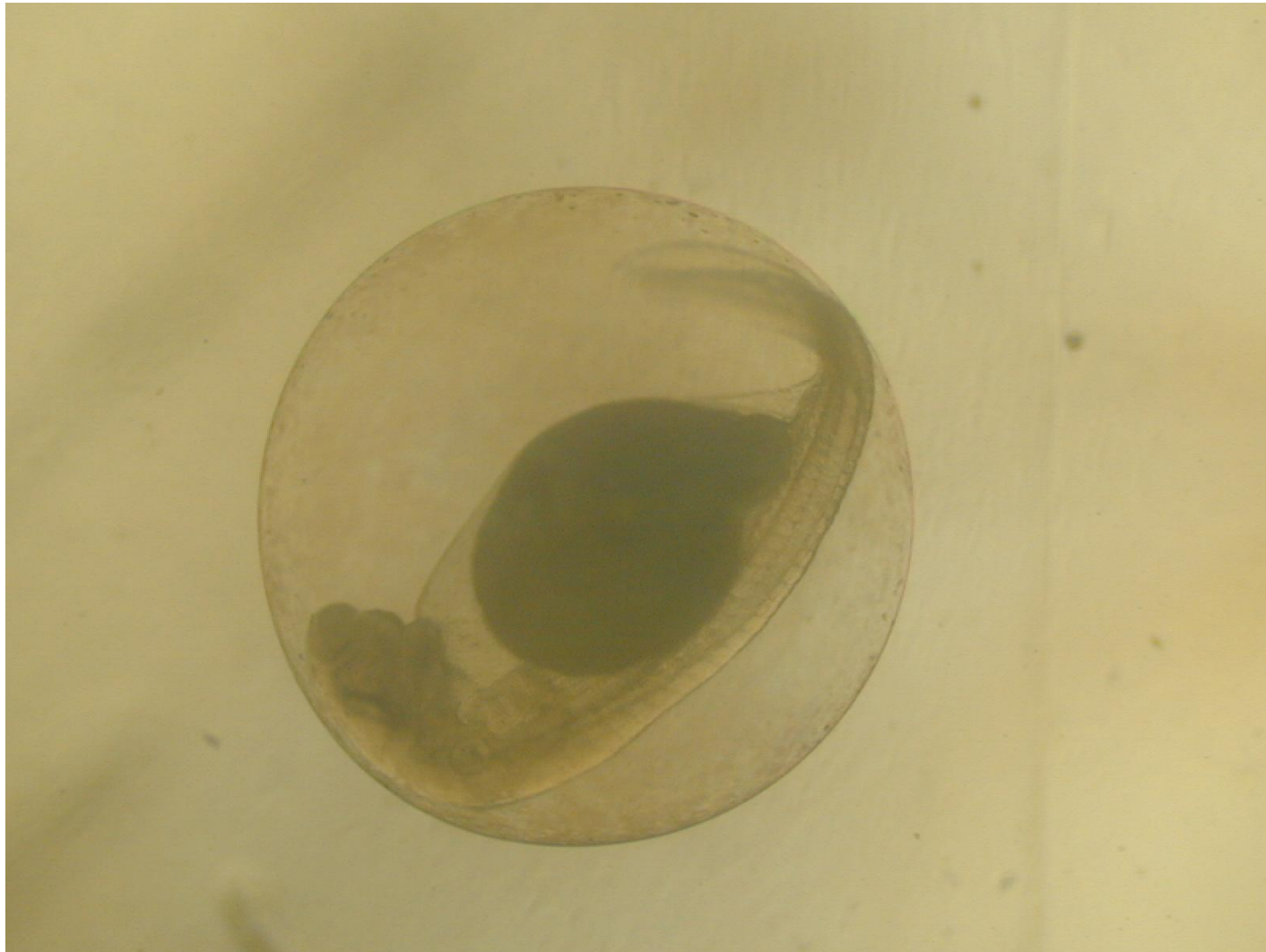
Desova matrinxã



Matrinxã fecundação + 1 hora



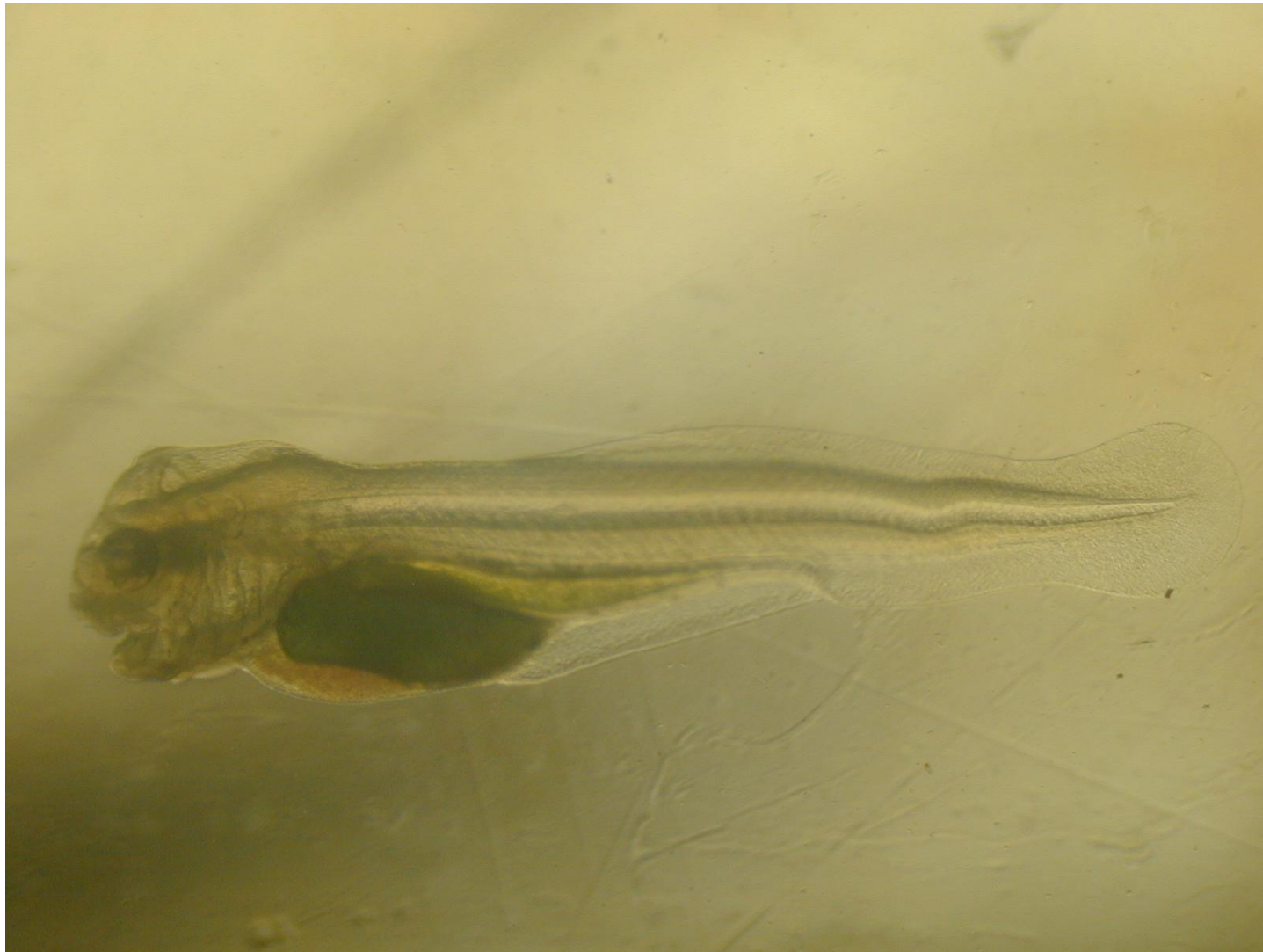
Matrinxã fecundação + 4 horas



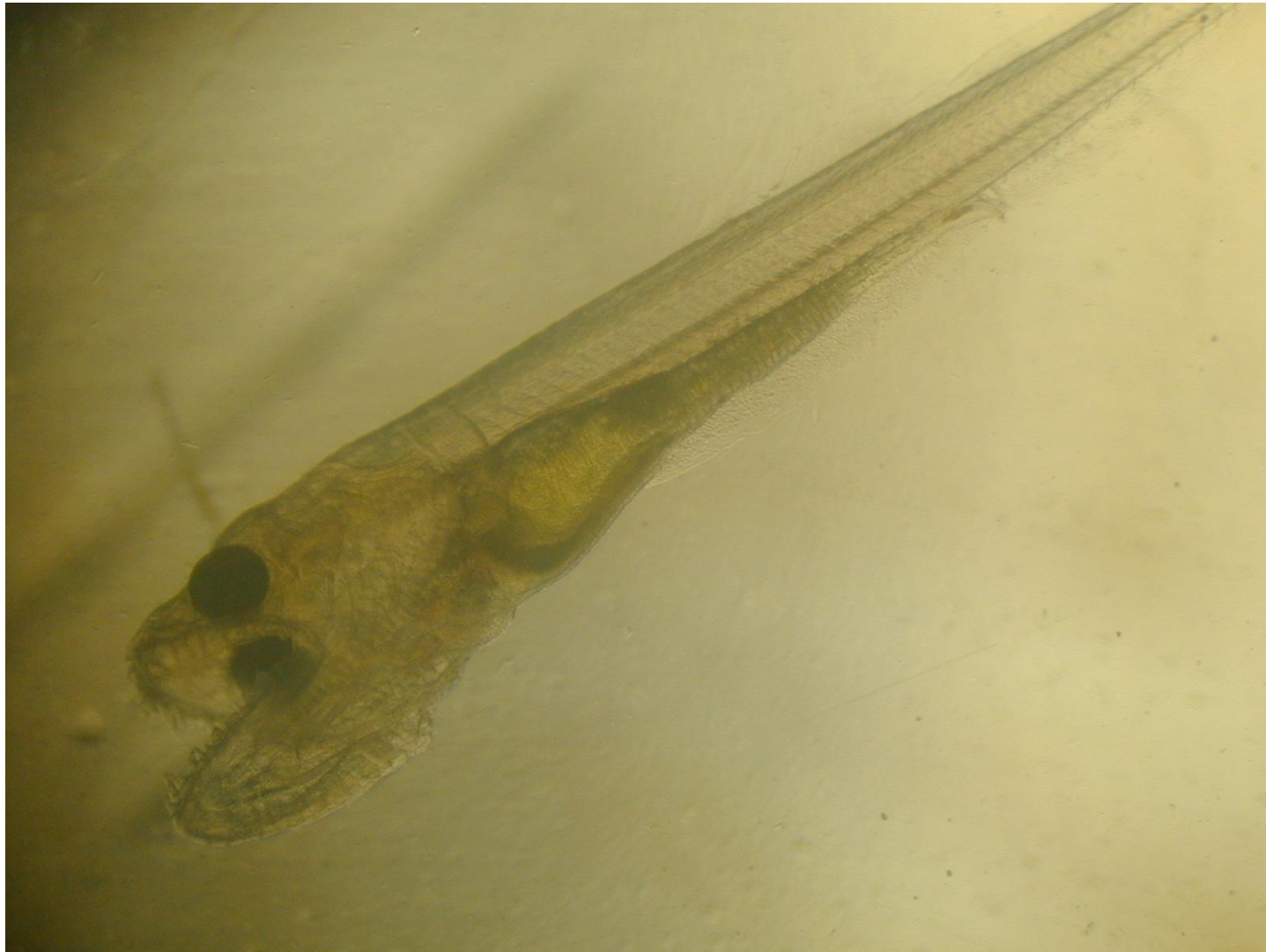
Matrinxã antes eclosão



Matrinxã pos eclosão



Matrinxã eclosão + 12 horas



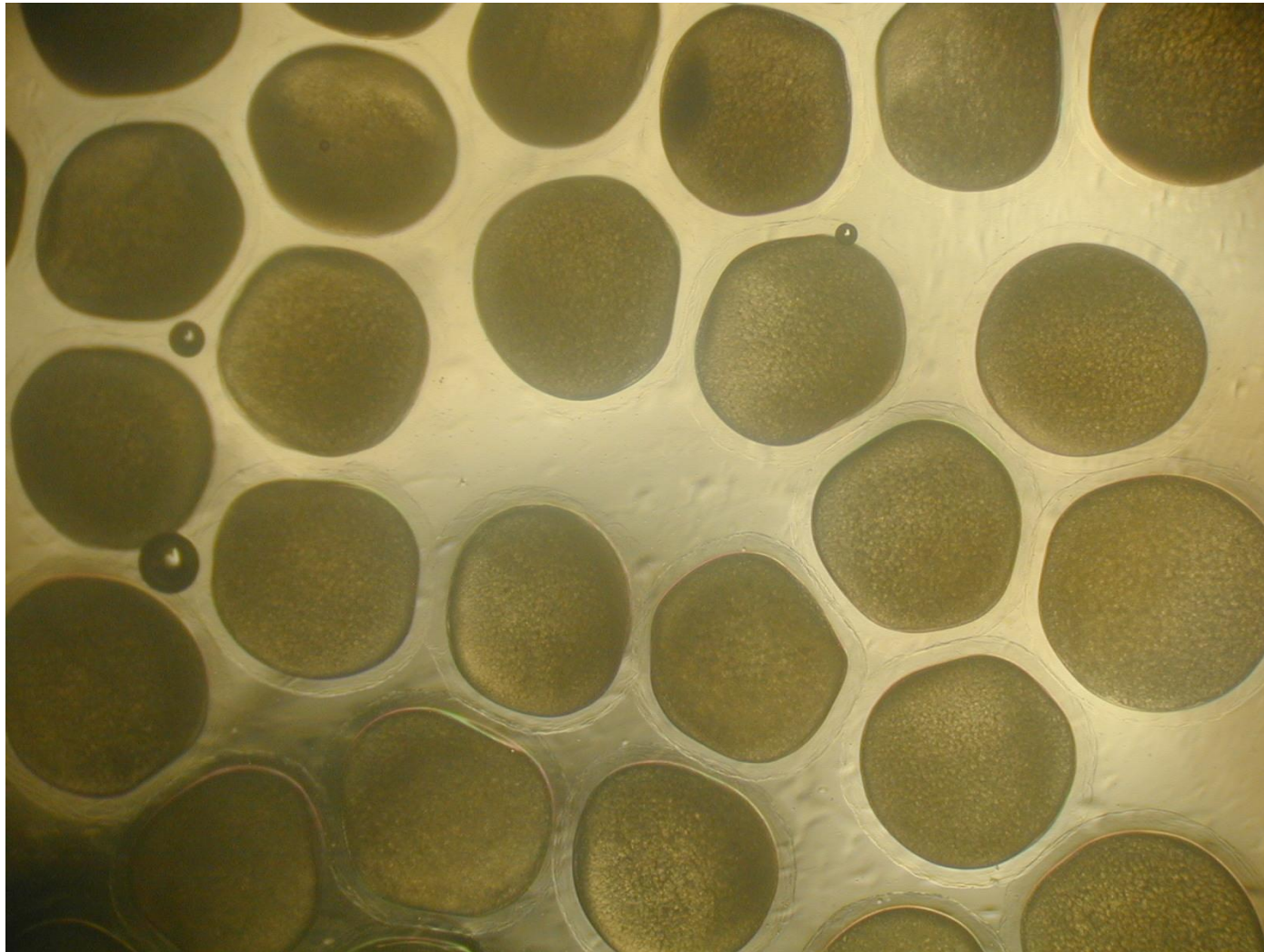
Matrinxã eclosão + 24 horas



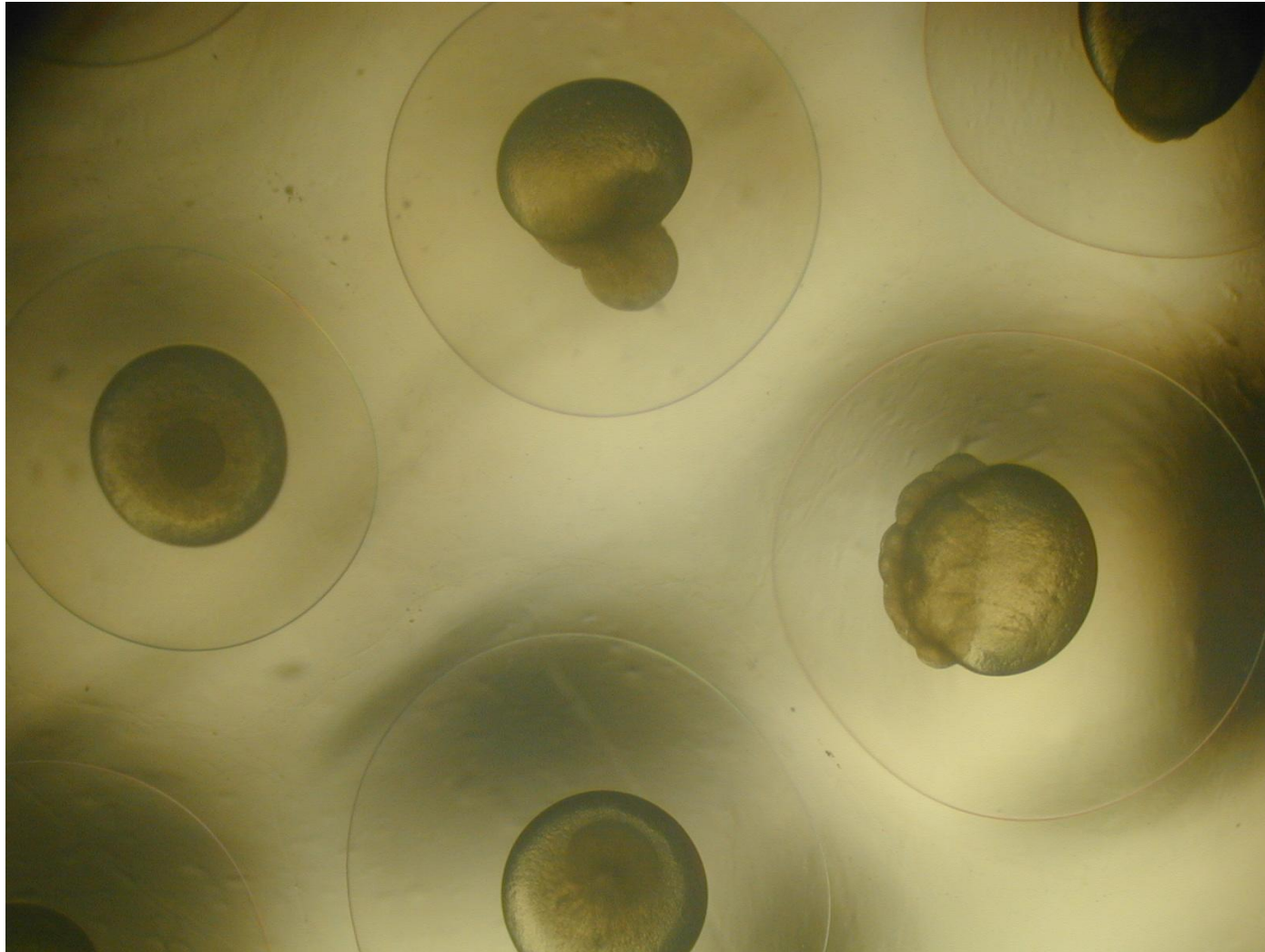
Matrinã eclosão + 24 horas praticando canibalismo- uma comendo outra que já comeu outra



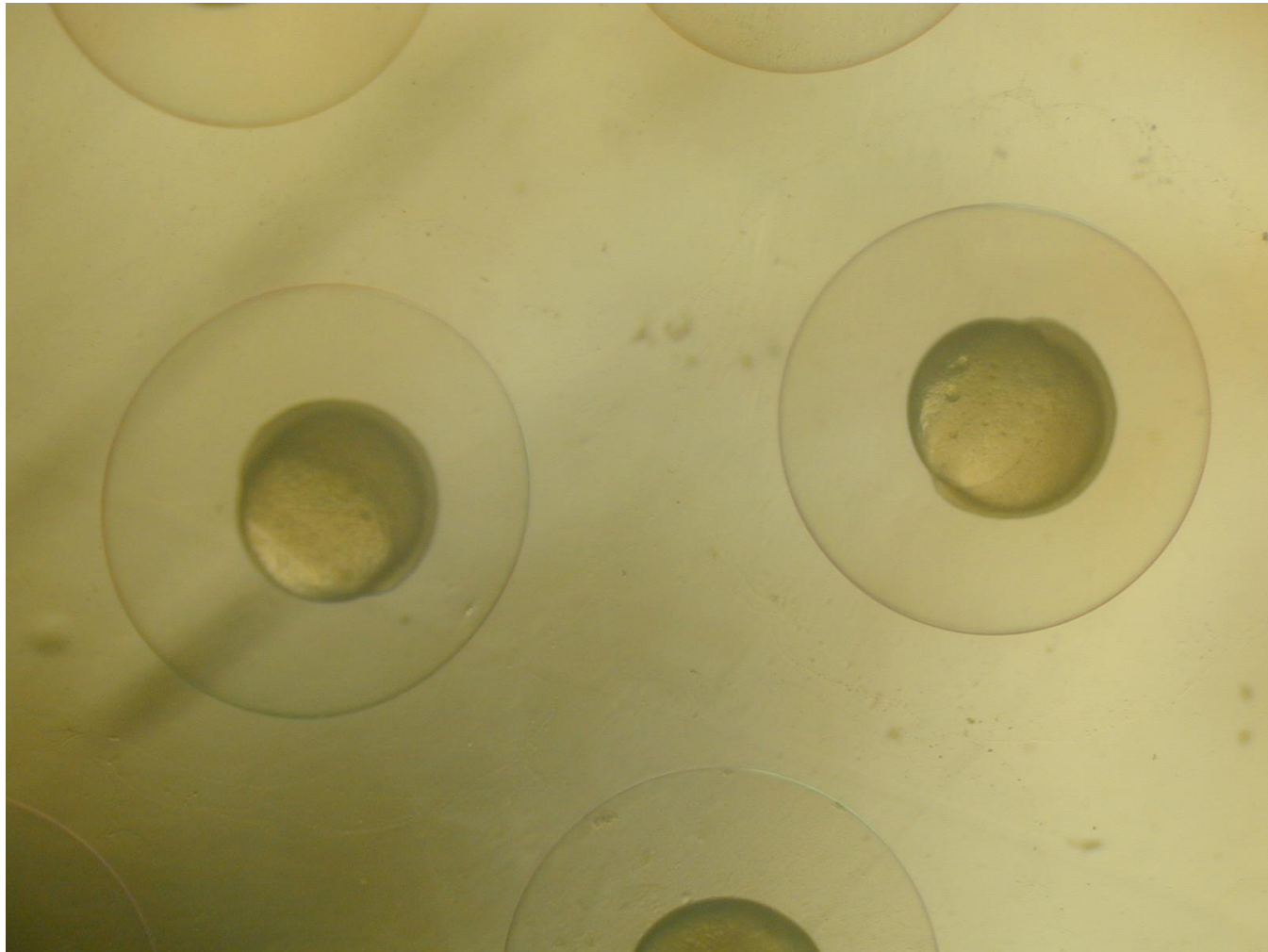
Pirarara sendo canalizada



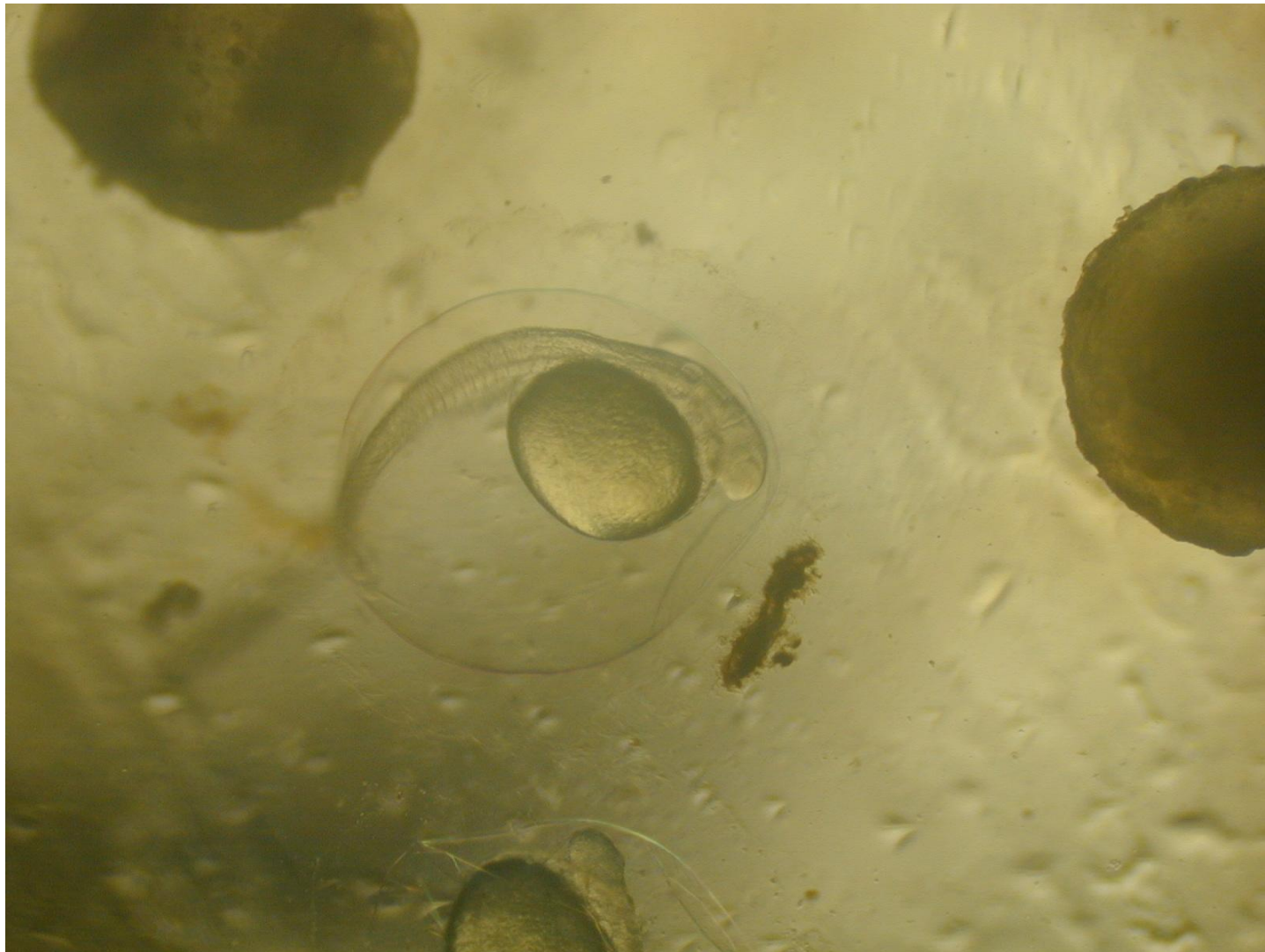
Pirarara ovócitos



Pirarara fecundação + 1 hora



Pirarara fecundação + 4 horas



Pirarara fecundação + 16 horas



Pirarara recém eclodido



Pirarara eclosão + 12 horas



Pirarara eclosão +48 horas boca formada



Jaú fêmea



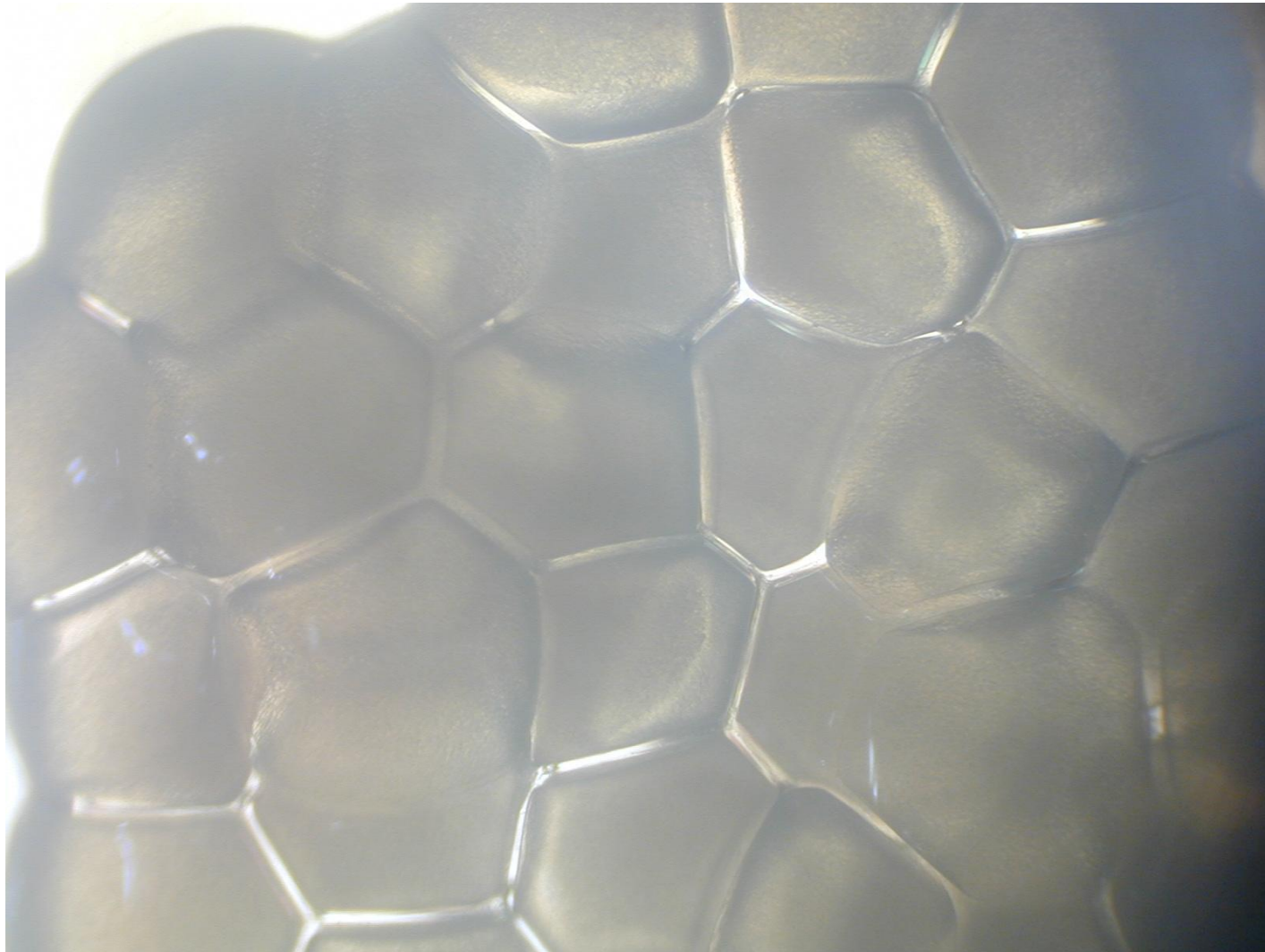
Jaú macho



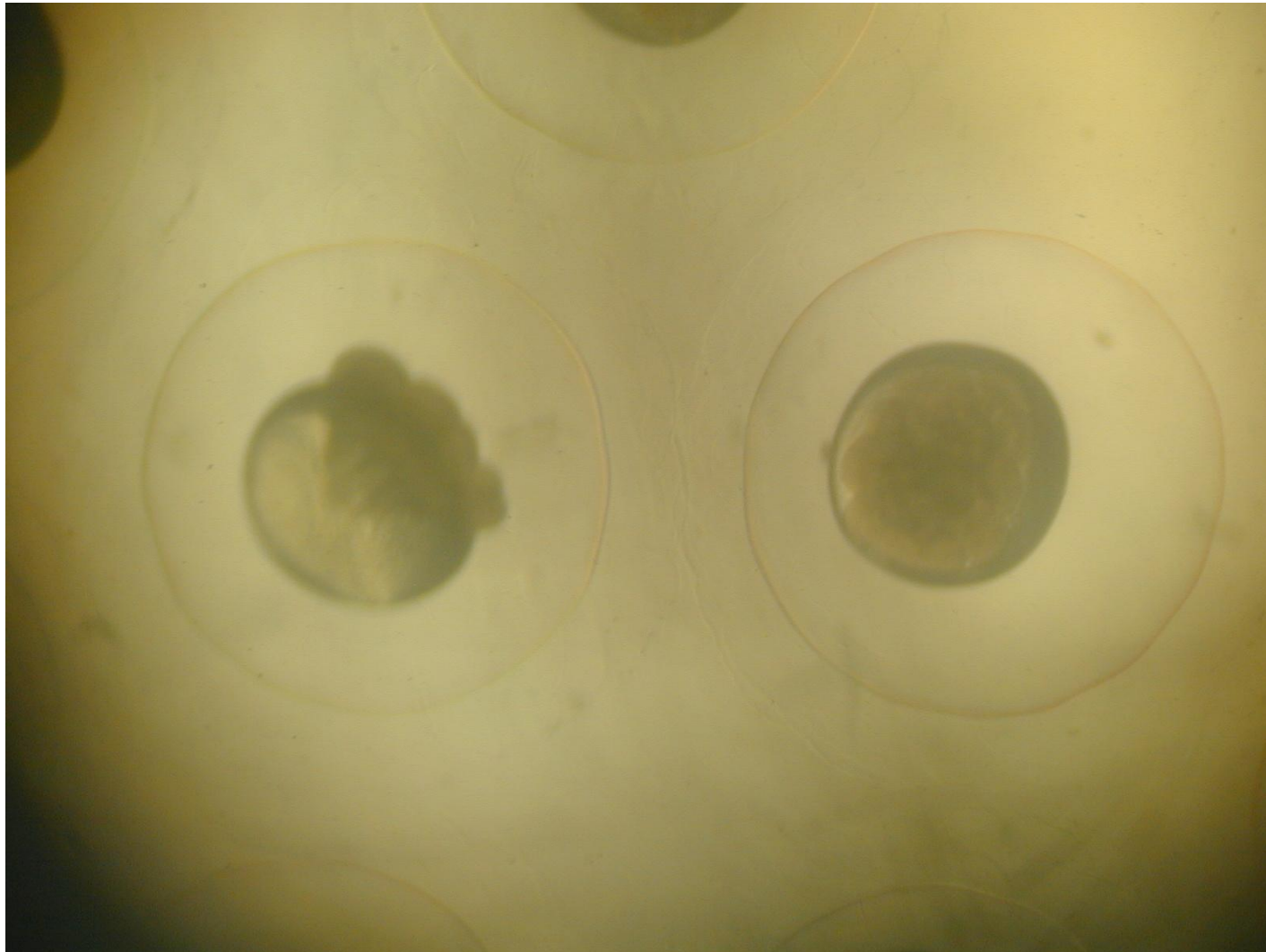
Desova jaú



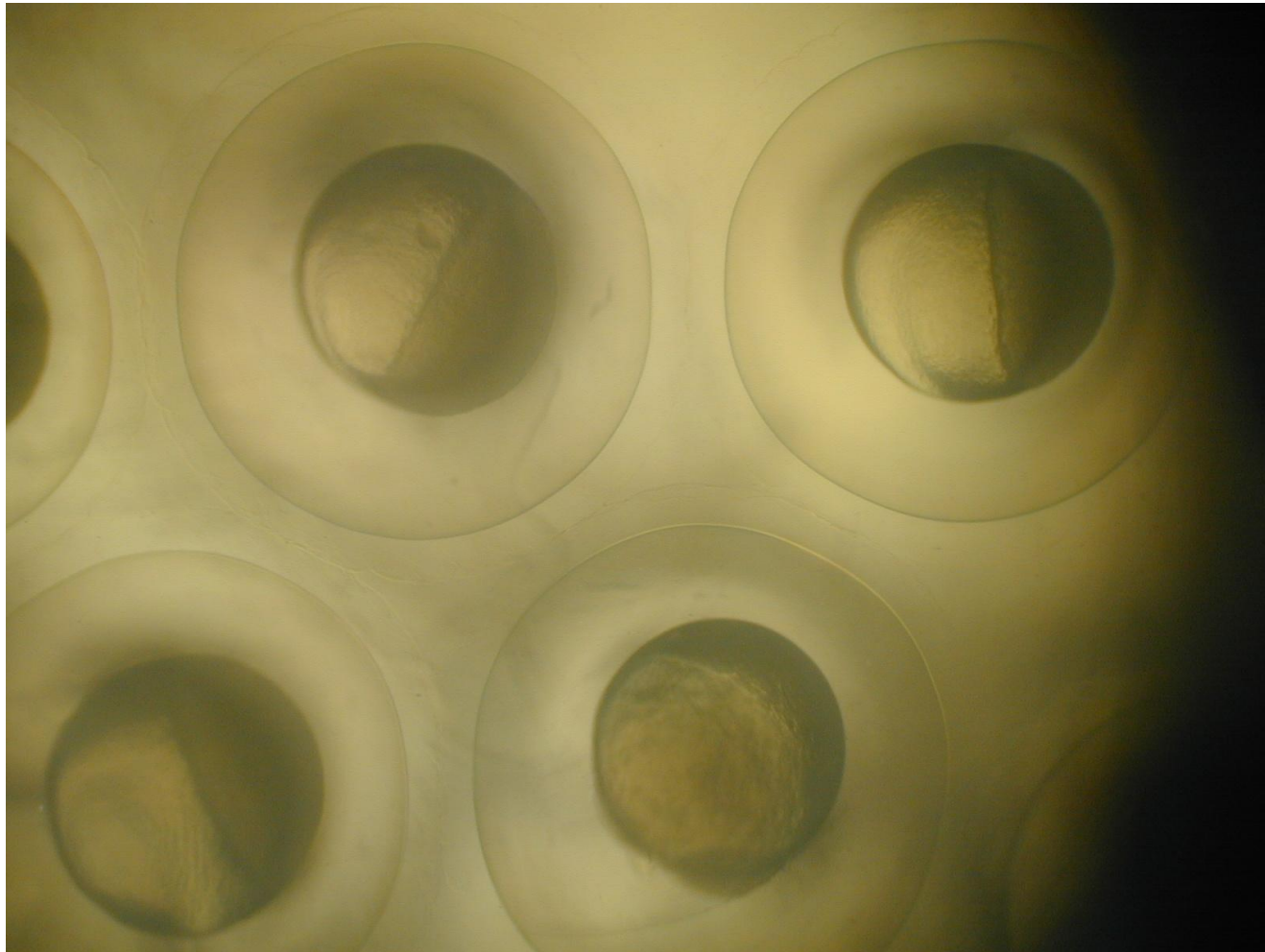
Extraindo testículo macho jaú



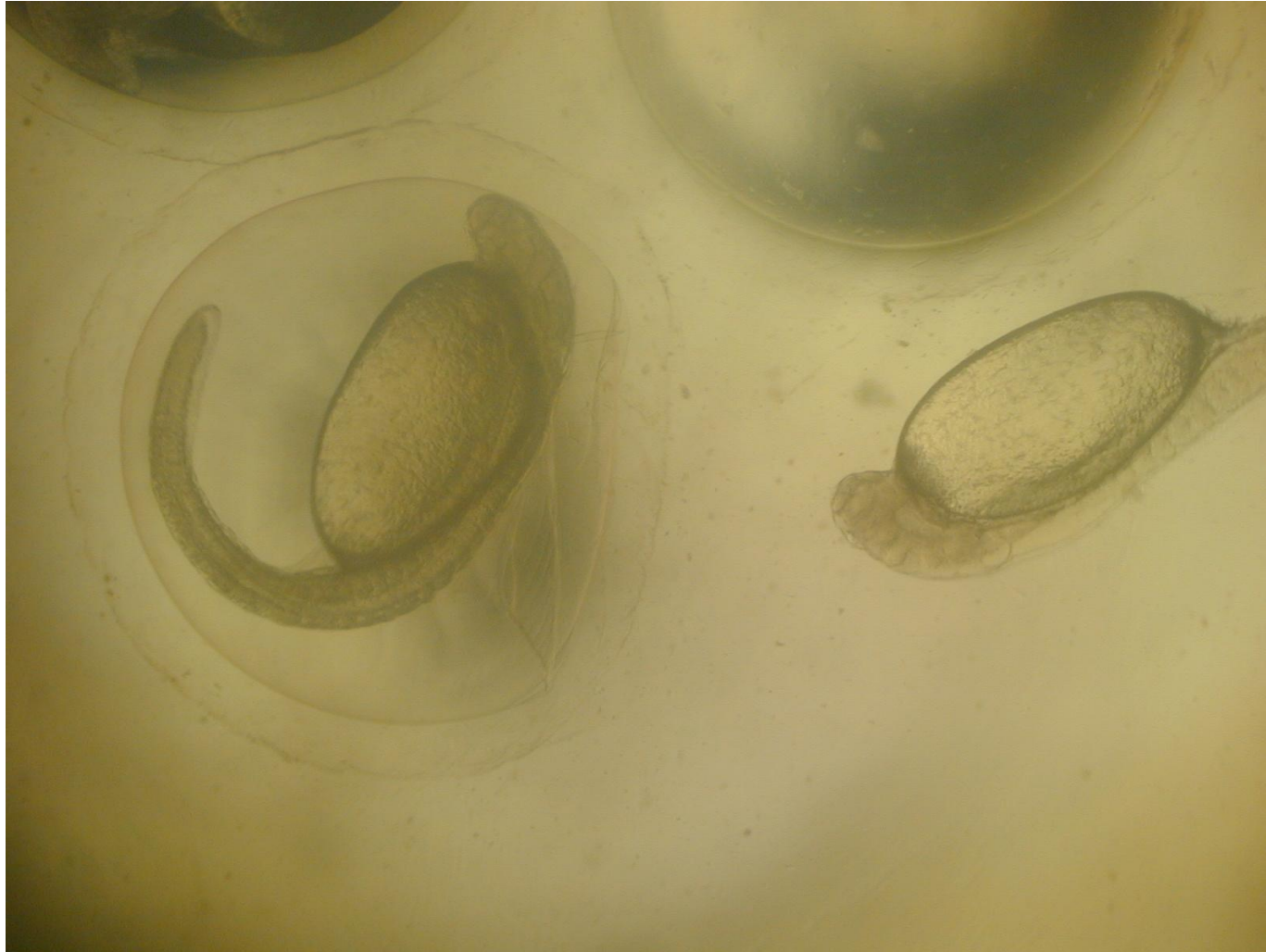
Jaú ovócitos



Jaú fecundação + 1 hora



Jaú fecundação + 4 horas



Jaú eclodindo F + 16 horas



Jaú eclosão + 12 horas



Jaú eclosão + 36 horas boca aberta



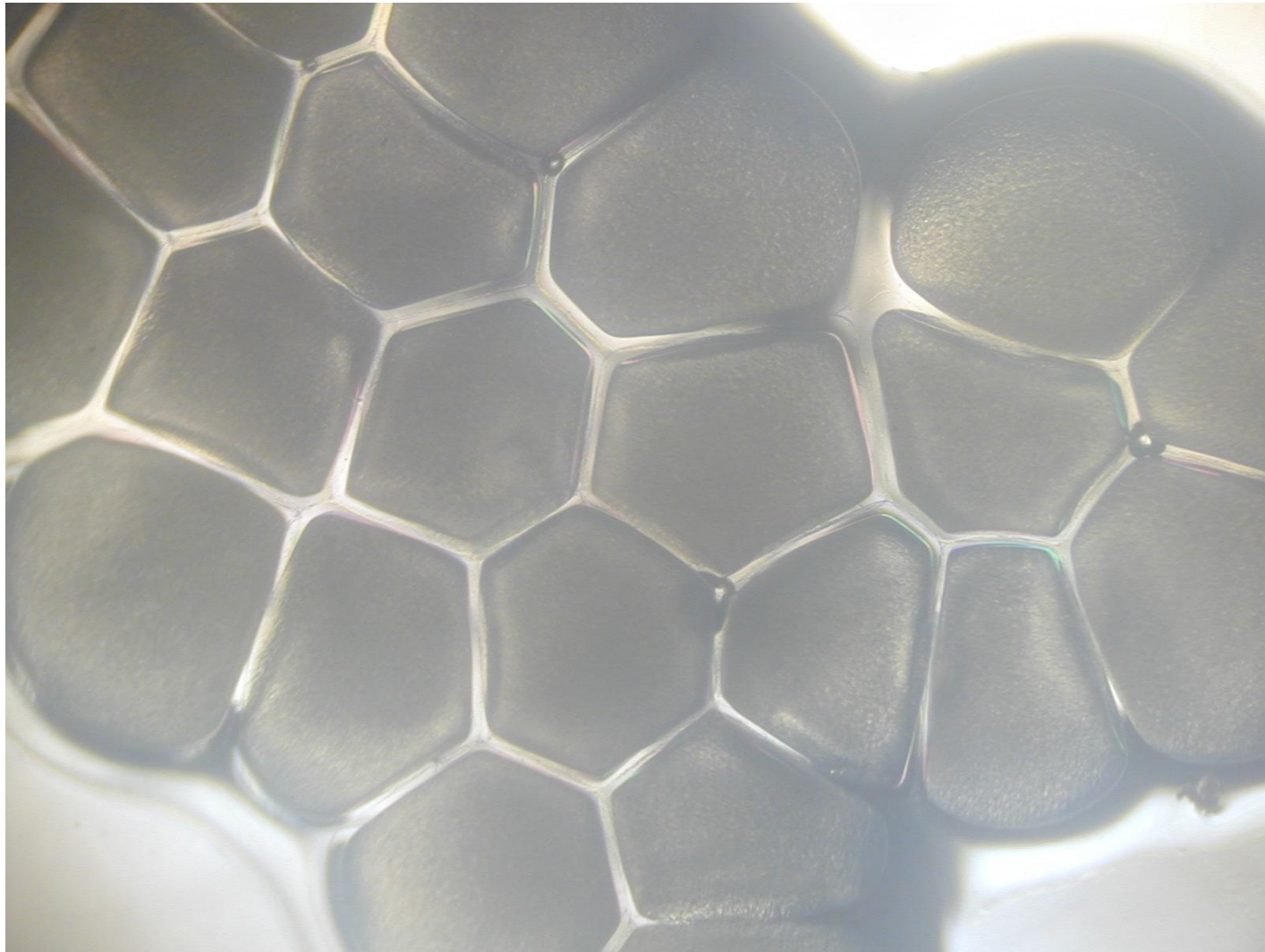
Jurupensem fêmea



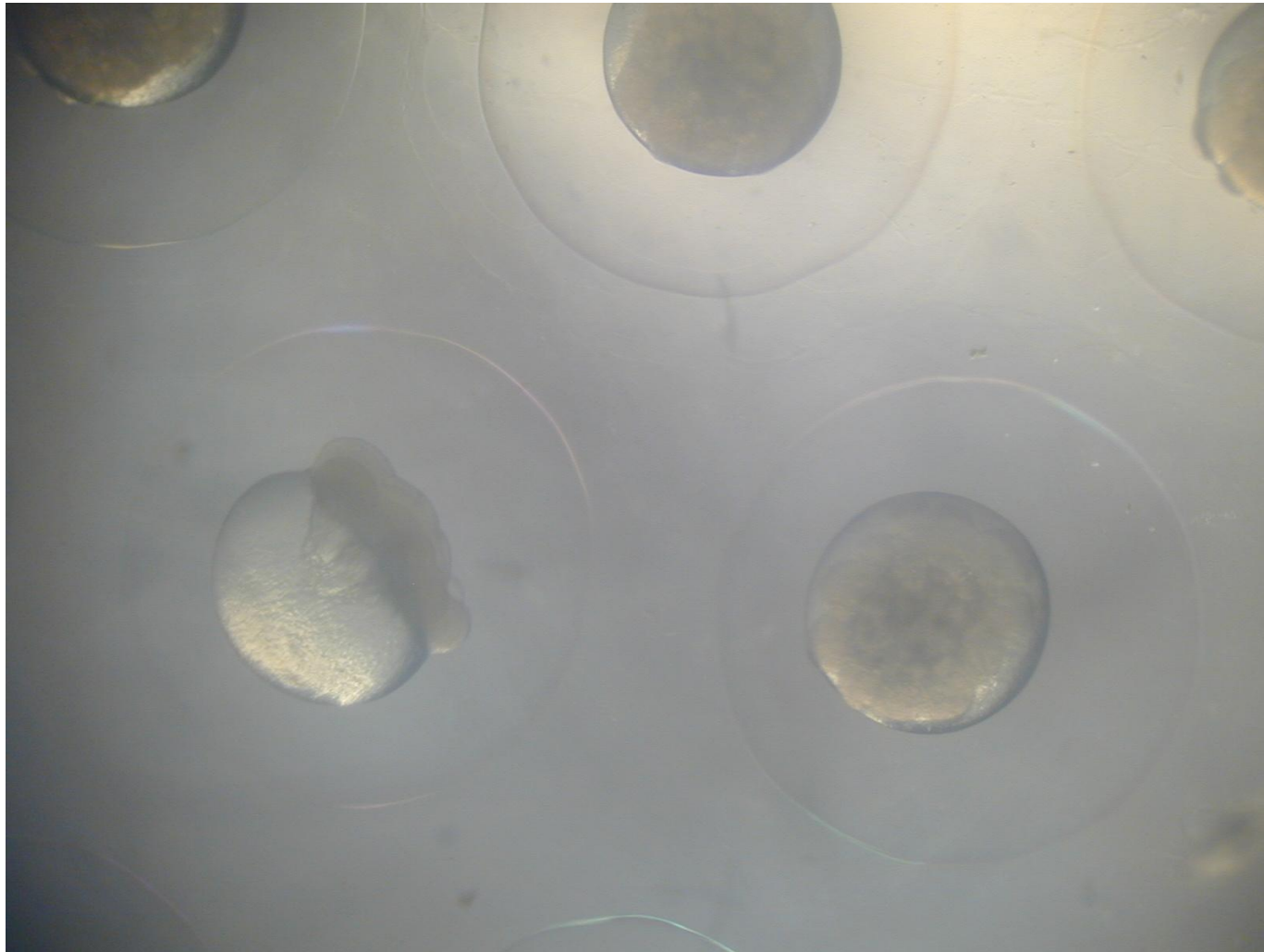
Jurupensem macho



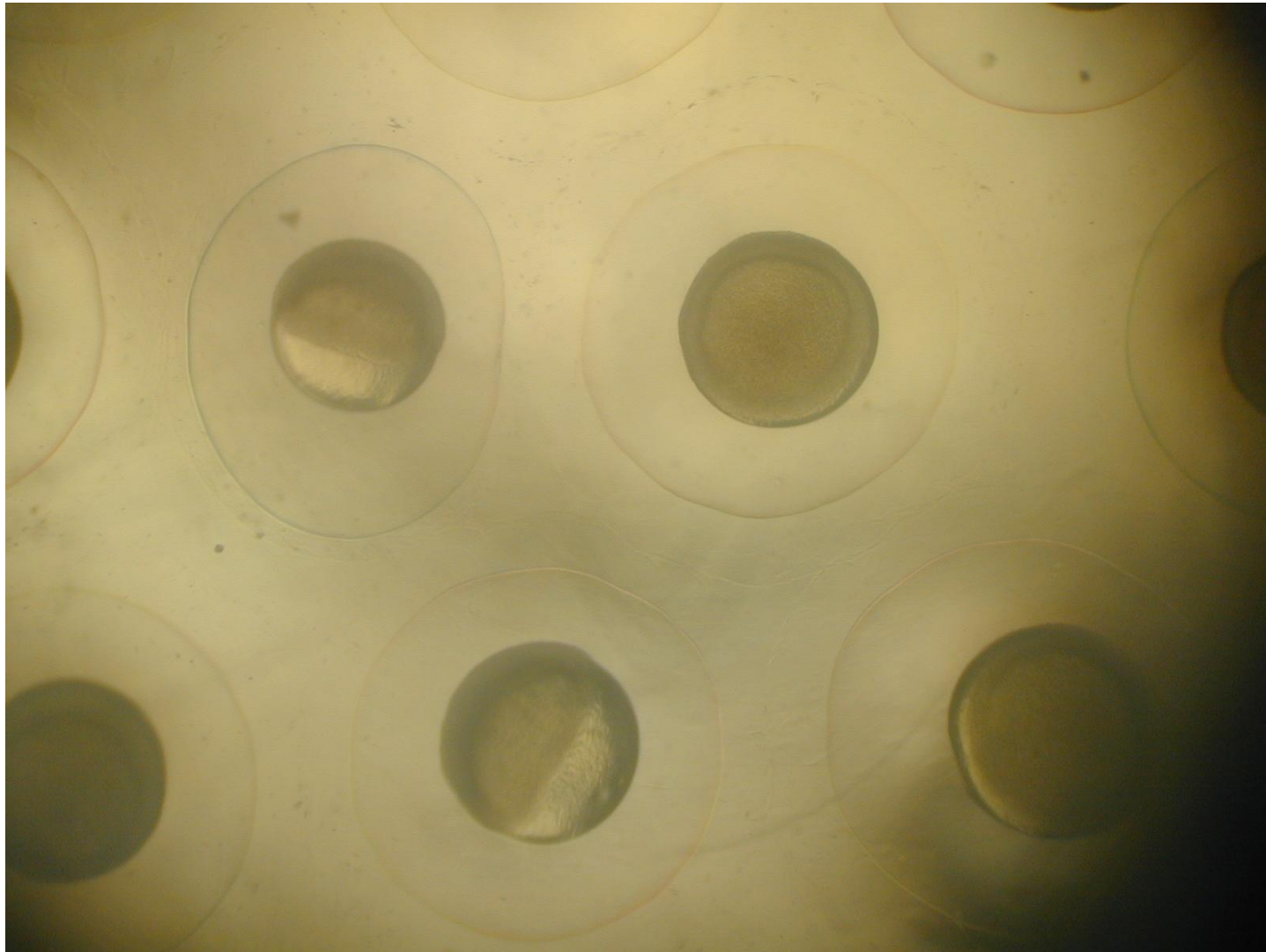
Jurupensem desova



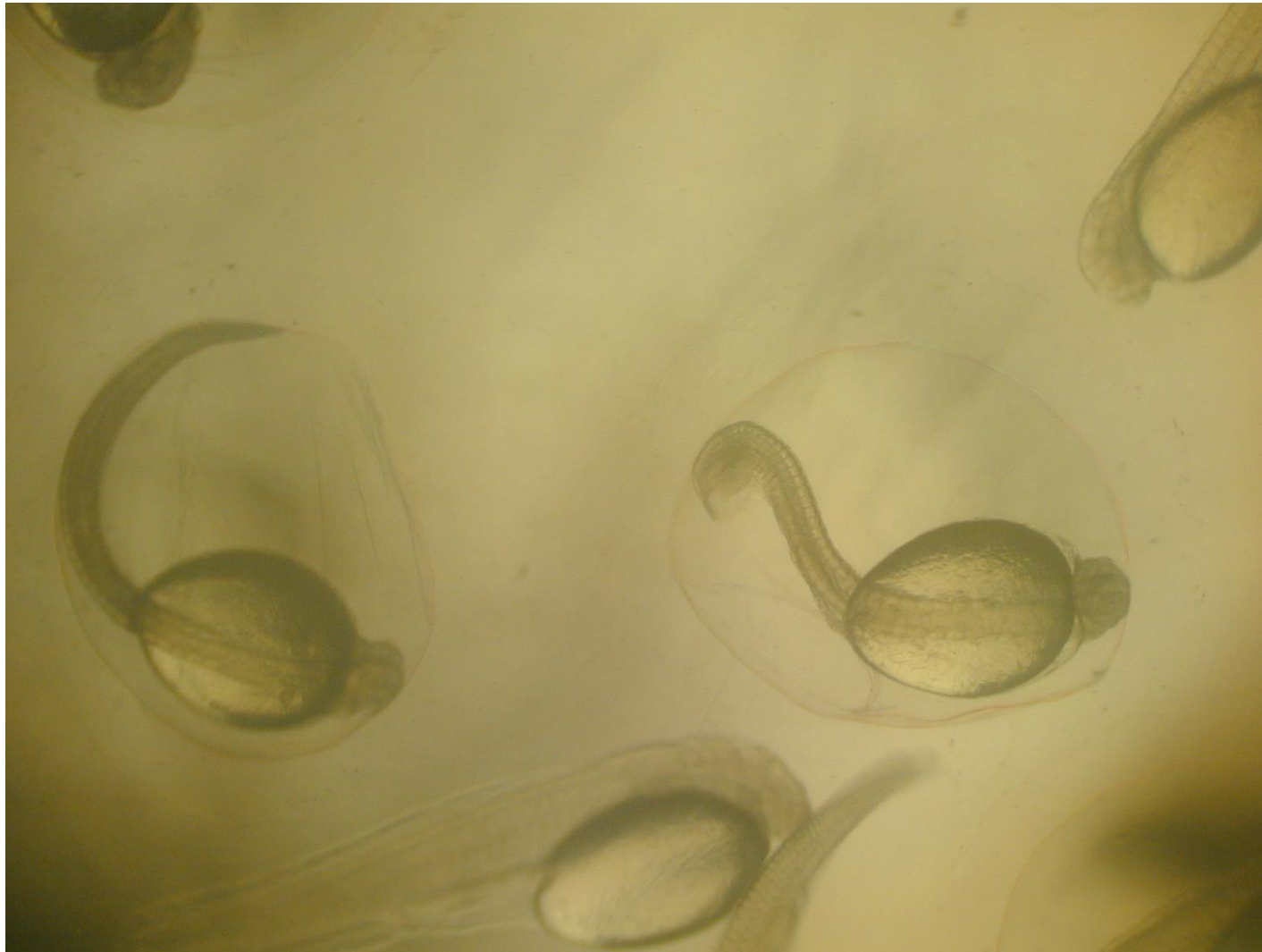
Jurupense ovócitos



Jurupensem fecundação + 1 hora



Jurupensem fecundação + 4 horas



Jurupensem fecundação +16 horas eclodindo



Jurupensem eclosão + 12 horas



Jurupensem eclosão + 36 horas- cauda mordida



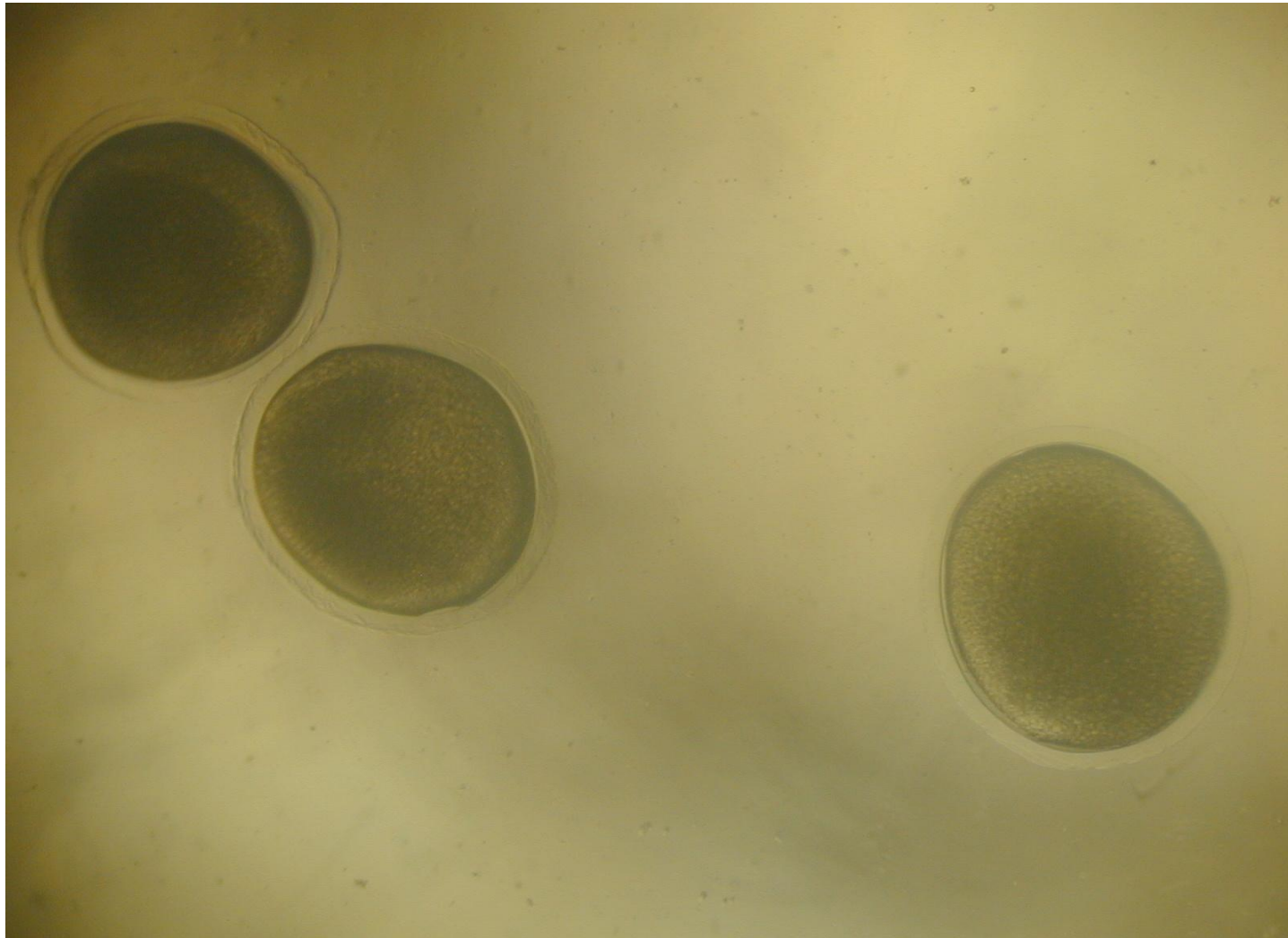
Cachara



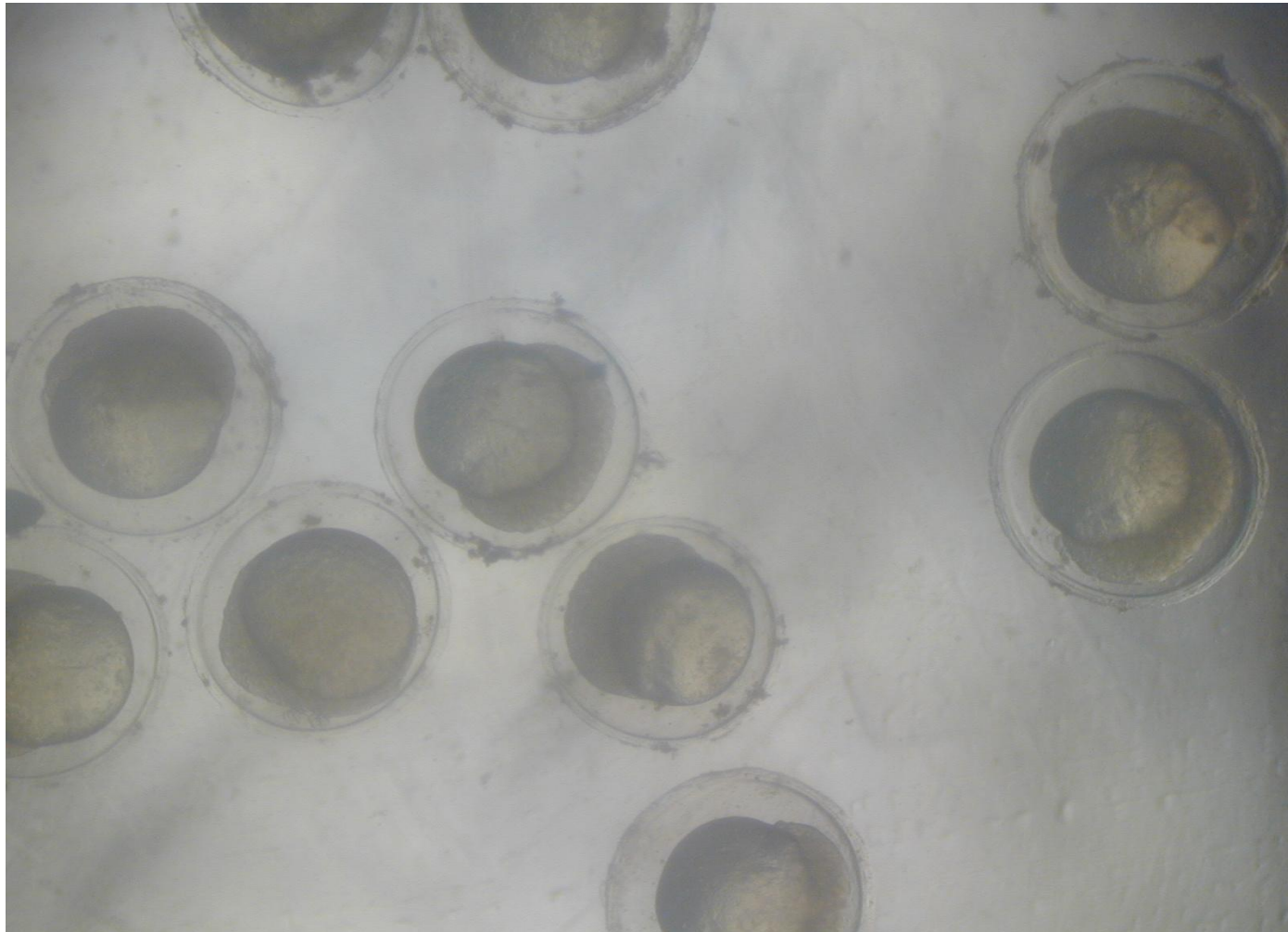
Cachara desova



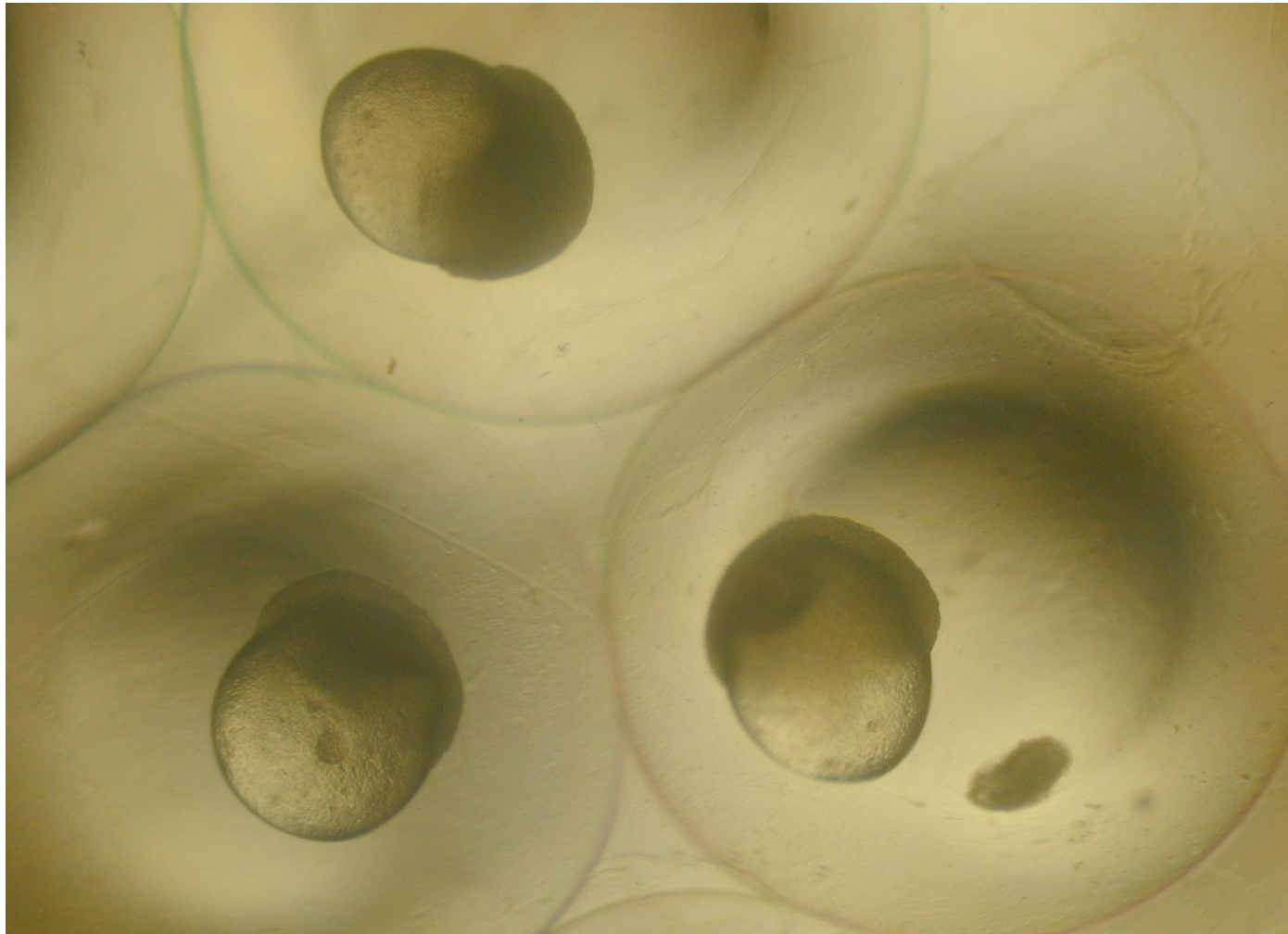
Cachara fecundação



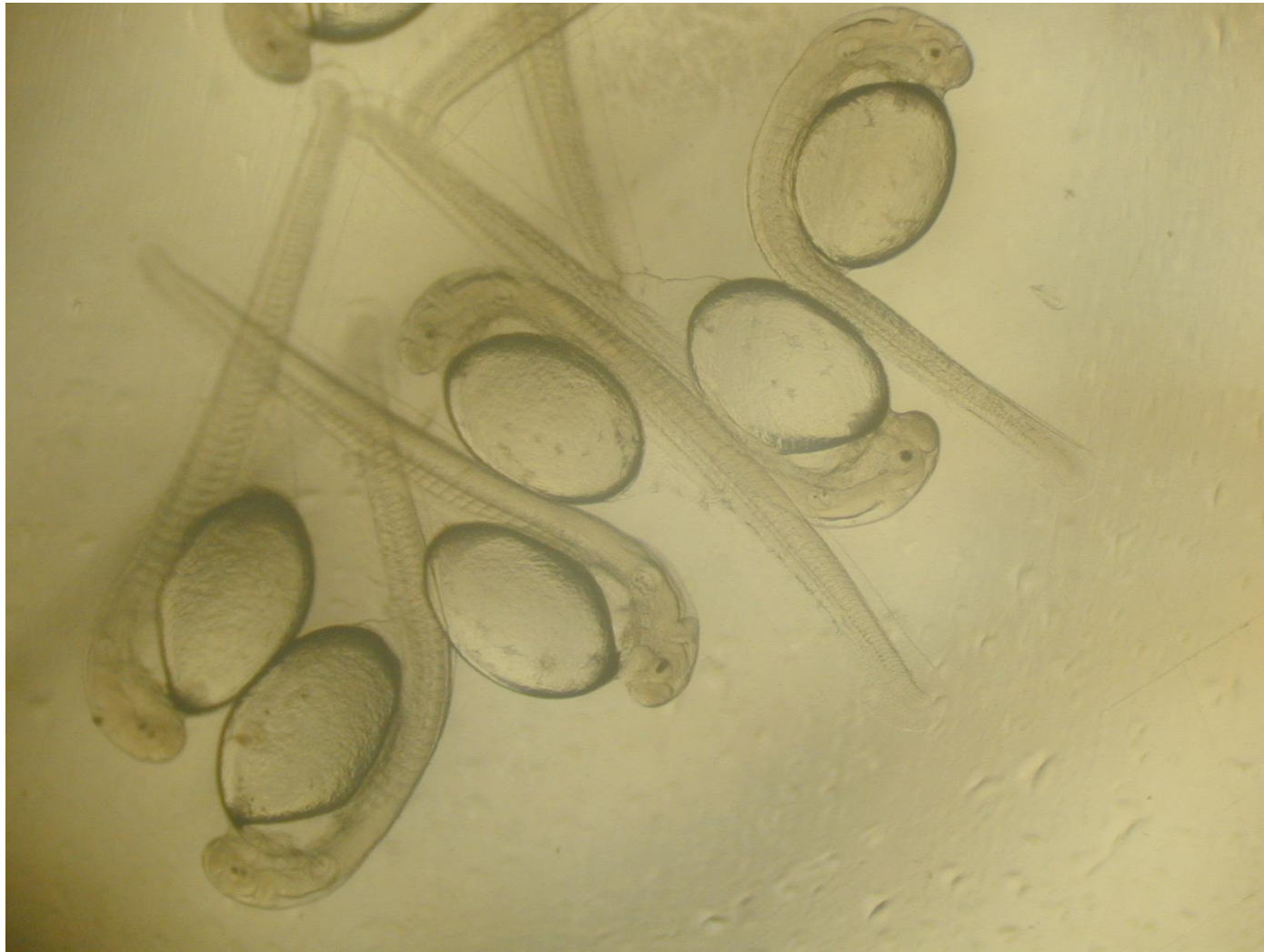
Cachara ovócitos



Cachara fecundação + 1 hora



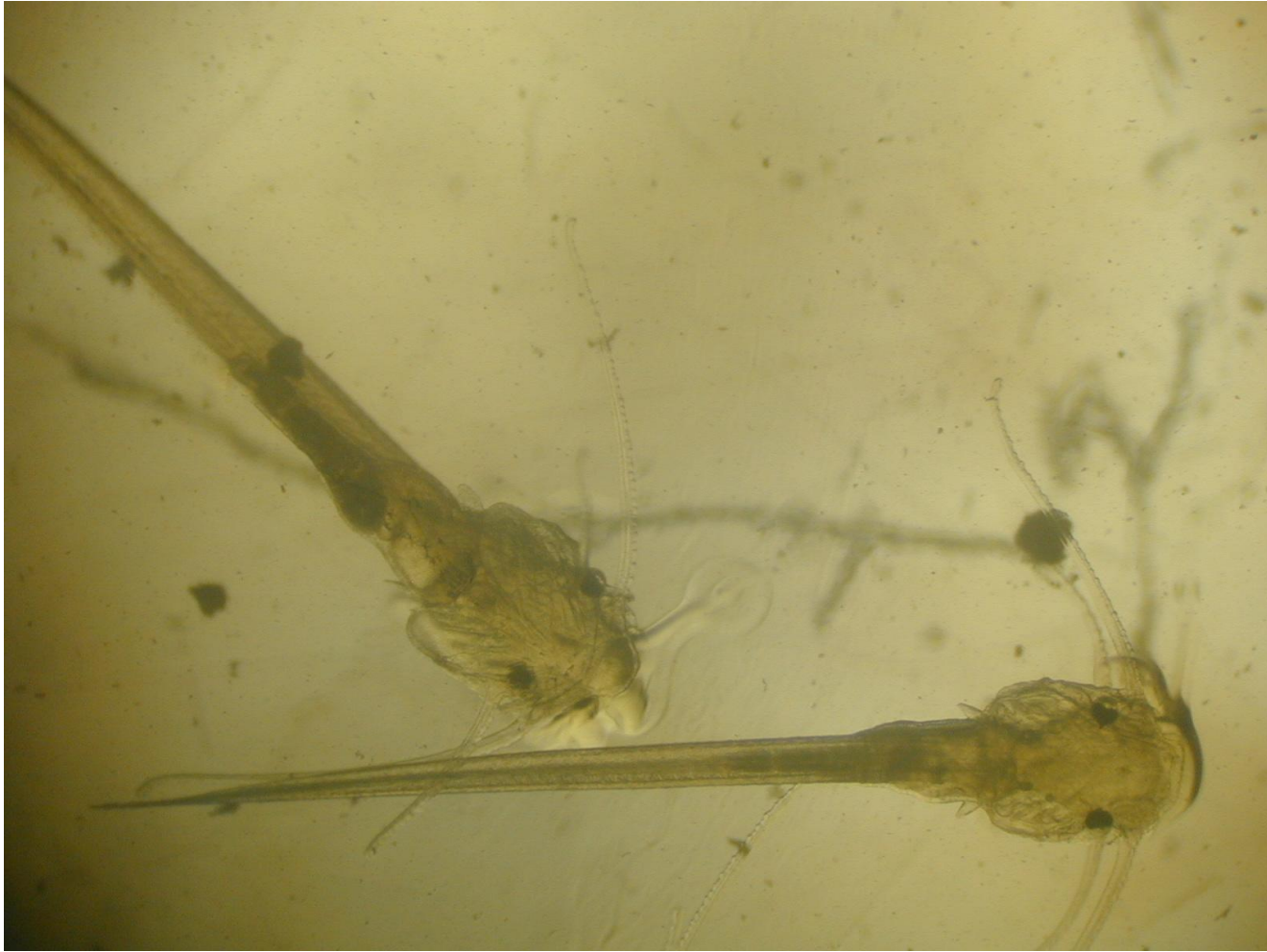
Cachara fecundação + 4 horas



Cachara recém eclodido



Cachara eclosão + 12 horas



Cachara eclosão + 72 horas se alimentando



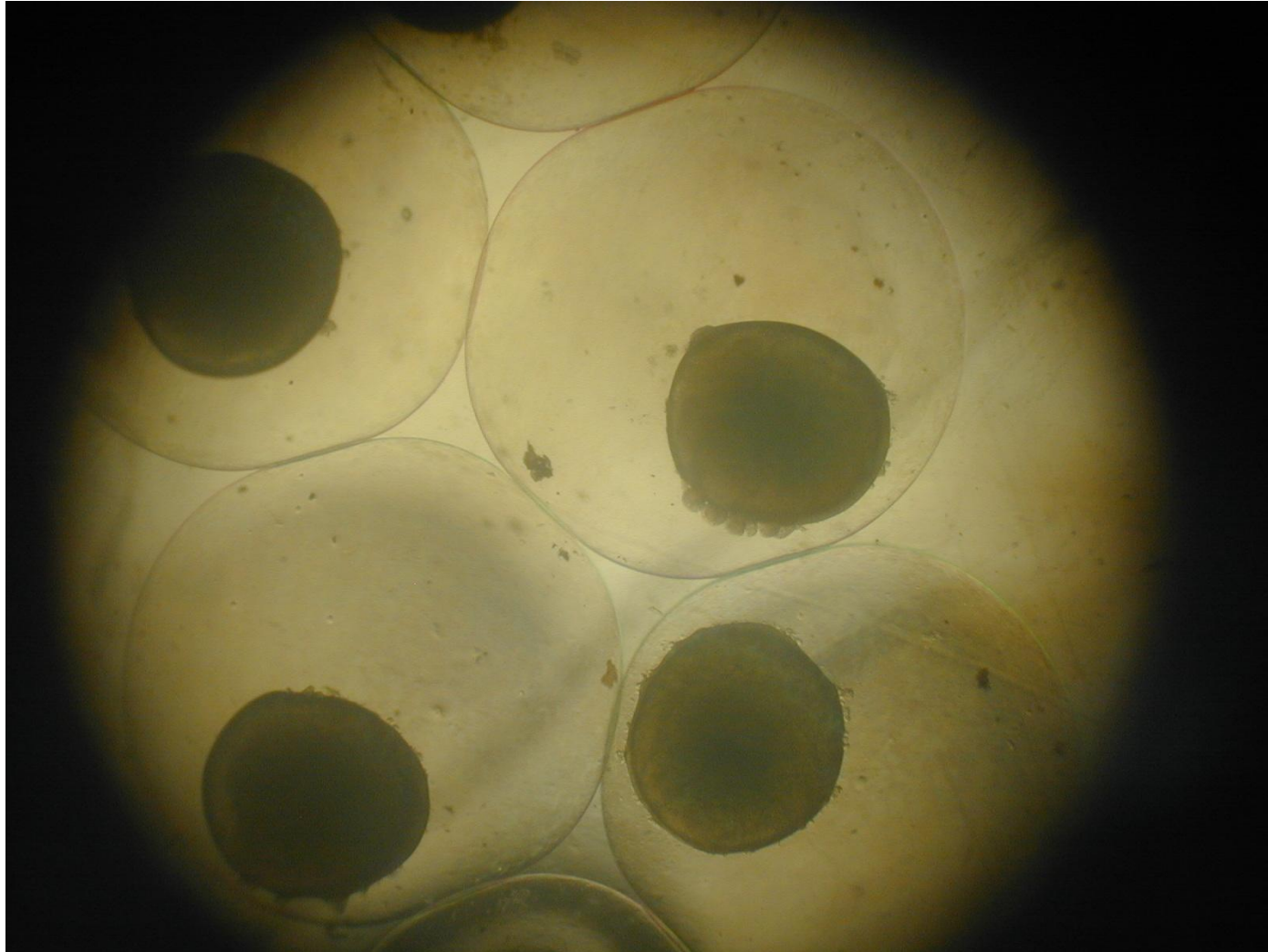
Tambaqui



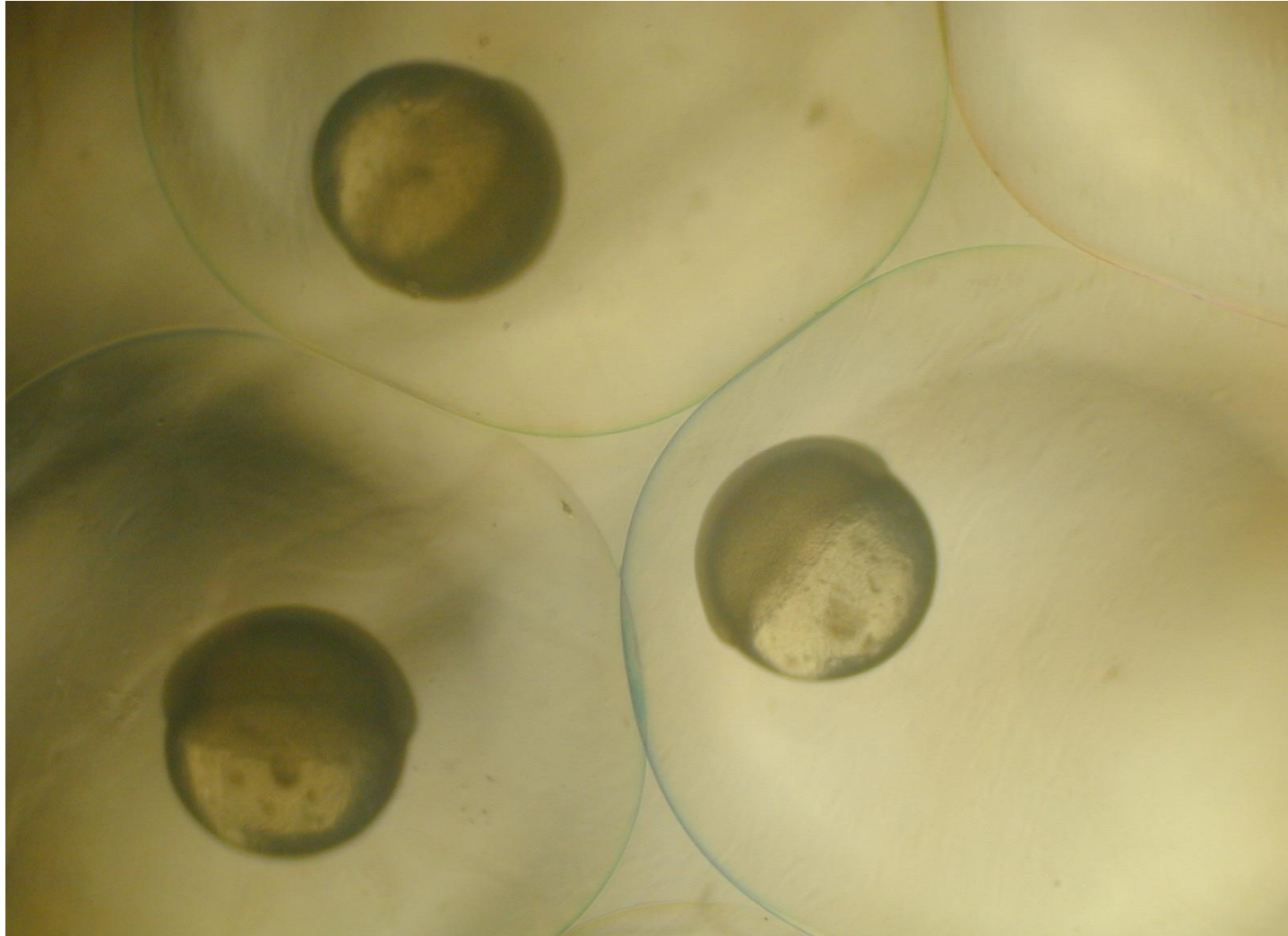
Desova tambaqui



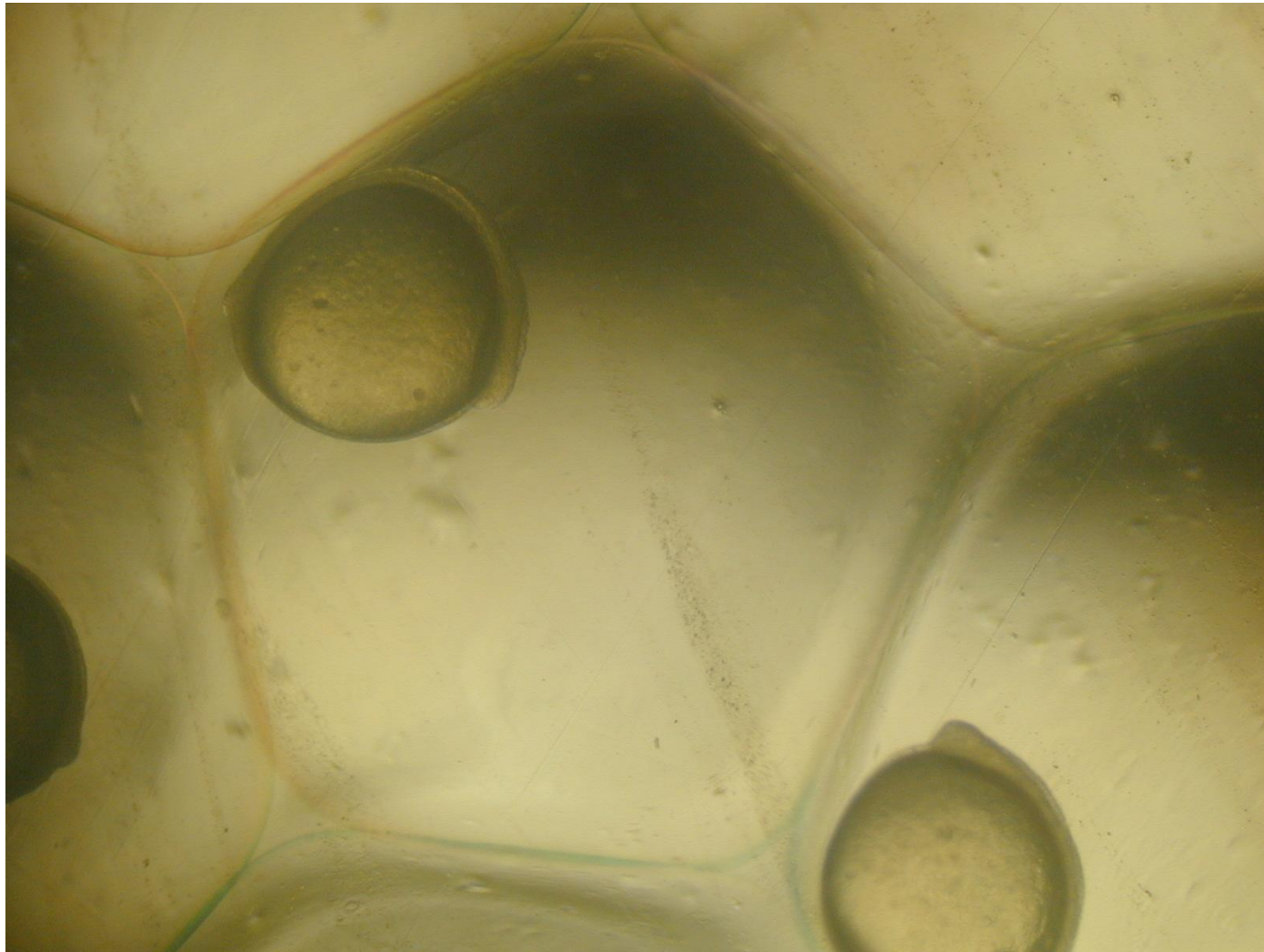
Fecundação tambaqui



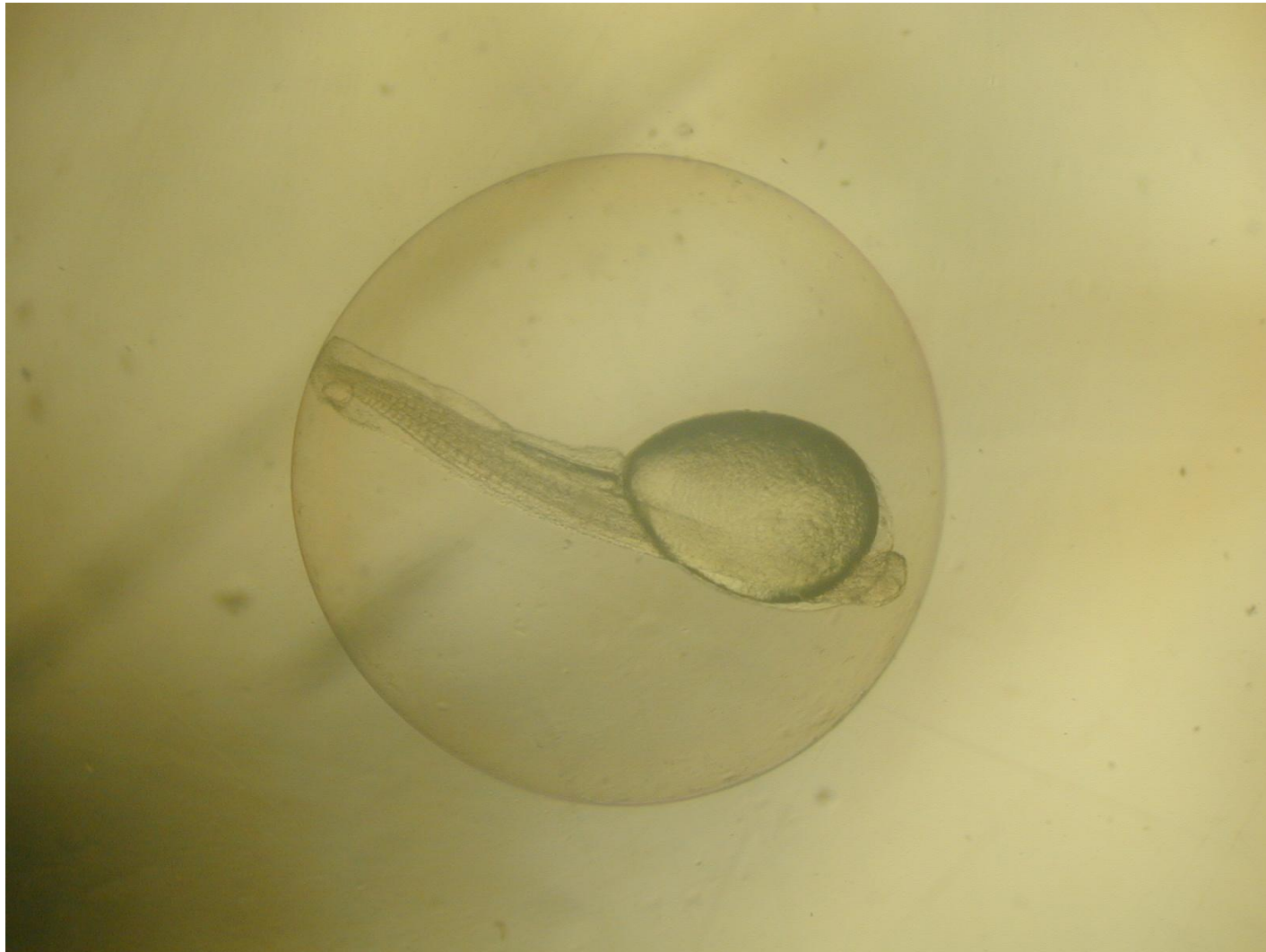
Tabaqui fecundação + 1 hora



Tabaqui fecundação + 4 horas



Tabaqui fecundação + 7 horas



Tabaqui fecundaço + 16 horas



Tabaqui recém eclodida



Tambaqui eclosão + 24 horas



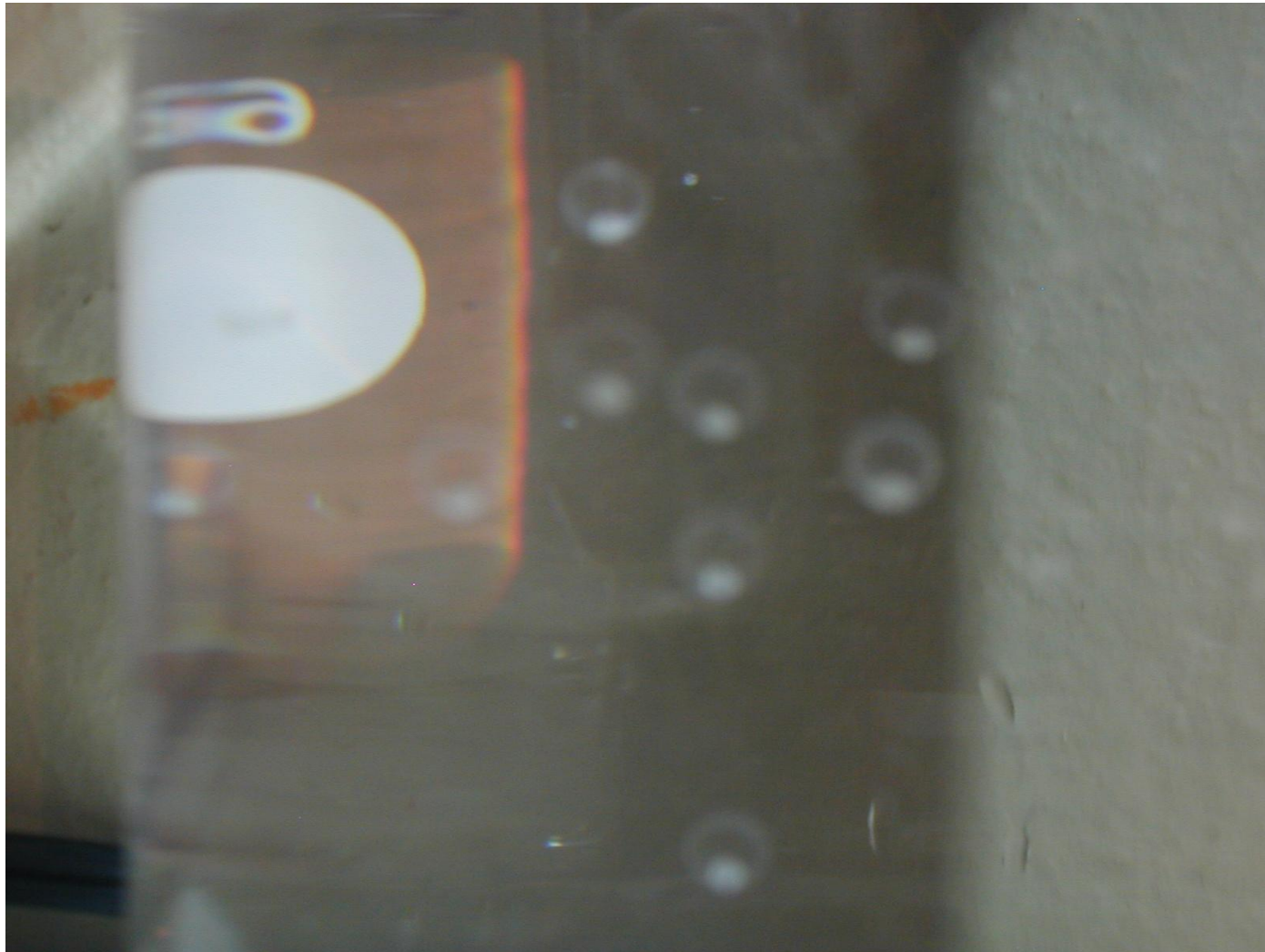
Tambaqui eclosão + 96 horas



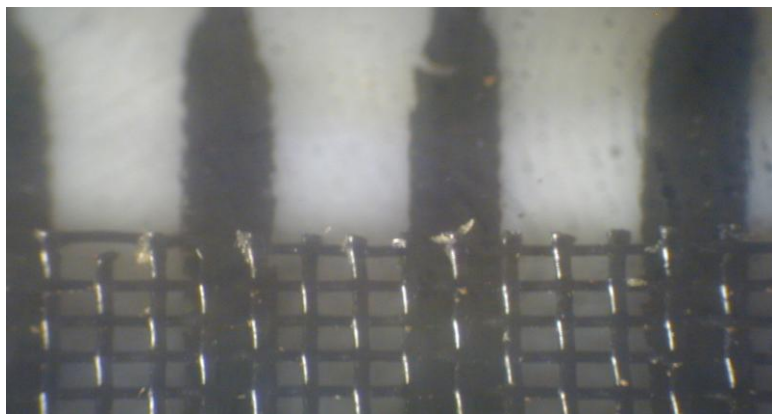
Colhendo amostra de ovócitos



Equipamentos utilizados na medição



Ovos de tampaqui em suspensão



Campo Fotográfico de 40X = 3,2 mm



Campo Fotográfico de 20X = 6,4 mm



Medição de Gravidade Específica

ANEXO II - MATERIAIS UTILIZADOS

Para a determinação da densidade específica das espécies analisadas, foram utilizados os seguintes materiais:

- Densímetro de massa específica (fabricante INCOTERM) para densidades de 1,000 a 1,100, leitura em g/mL (calibrado em 1,000 g/mL usando água de poço do Projeto Pacu Aqüicultura a 28 °C);
- Balança semi-analítica;
- Becker de 300 mL e 500 mL;
- Bureta de 25 mL;
- Provetas de 50 mL, 500 mL e 1.000 mL;
- Cloreto de sódio (NaCl);
- Bolsas plásticas de 10L
- Água (fonte poço artesiano);
- Anestésico (cloridrato de lidocaína 2%);
- Pipetas descartáveis;
- Microscópio Estereoscópio de 20x a 40x;
- Máquina fotográfica digital.

Para a realização da reprodução induzida e larvicultura das espécies de peixes nativos do rio Madeira, contou-se com a seguinte infra-estrutura e materiais:

- Laboratório de Reprodução do Projeto Pacu Aqüicultura;
- Plantel de Peixes reprodutores;
- Incubadoras cônicas de 200 L;
- Mesa de desova;
- Hormônios: Glândula Pituitária de carpa, LHRH(a) e Domperidona;
- Solução fisiológica;
- Seringas de 1 mL e 10 mL;
- Bacias plásticas;
- Peneiras;
- Espátula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bernardi, J.V.E., Lacerda, L.D., Dórea, J.G., Candim, P.M.B., Gomes, J.P.O., Almeida, R., Manzatlo, A.G., Bastos, W.R. Aplicação da análise das componentes principais na ordenação dos parâmetros físico-químicos no alto Rio Madeira e afluentes. Amazônia Ocidental. Geochimica Brasiliensis, 23 (1) 079-090, 2009

Carrasco, S., Sumano, H., Navohro-Fierro, R. The use of lidocaine-sodium bicarbonate as an anesthetic in fish. Aquaculture 41:161-163 (1984).

Coombs, S.H., A density gradient column for determining the specific gravity of fish eggs, with particular reference to eggs of mackerel *Scomber scombras*. Marine Biology 63, 101-106 (1981).

Dudley, R.K., Platania, S.P. Imitating the physical properties of drifting semi buoyant fish (Cyprinidae) eggs with artificial eggs. Journal of Freshwater Ecology, Volume 14, Number 4, December (1999).

Cowley, D.E., Alleman, J.C., Sallenave, R., McShane, R.R., Shirey, P.D. Effects of salinity on specific gravity and viability of eggs of a North American minnow (Cyprinidae). Scientia Marina 7351, Act 2009, 47-58.

Sundnes, G., Leivestad, H., Iversen, O. Buoyancy determination of eggs from the cod (*Gadus morhua L*) Journal Const. Int. Explorer. Mer 29: 249-252 (1965).

Stira, R.J., Reed, R.J., Middleman, S. A method for making artificial fish egg. Trans. Amer. Fish. Soc., 105:349-350.

Tu, M.C., Chu, C-W., Lue, K-Y. Specific gravity and mechanisms for its control in tadpoles of three anuran species from different water strata. Zoological Studies 38 (1): 76-81 (1999).

Unuma, T., Shigenorik, K., Tanaka, H., Kagawa, H., Nomura, K., Ohta, H. Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 24: 493-500 (2005).