

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” CENTRO DE AQUICULTURA DA
UNESP – CAUNESP

**PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*
Cuvier, 1816) ALIMENTADOS COM RAÇÃO
ENRIQUECIDA**

Wanessa Inácio de oliveira

Jaboticabal, São Paulo

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” CENTRO DE AQUICULTURA DA
UNESP – CAUNESP

**PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*
Cuvier, 1816) ALIMENTADOS COM
RAÇÃO ENRIQUECIDA**

Wanessa Inácio de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches

Coorientador: Marcondes Agostinho G. Junior

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aquicultura do Centro de
Aquicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.

**Jaboticabal, São Paulo
2024**

O48p Oliveira, Wanessa Inácio
 Produção espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*
 Cuvier, 1816) alimentados com ração enriquecida / Wanessa Inácio
 Oliveira. -- Jaboticabal, 2024
 38 f. : il., tabs.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
 Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal
 Orientador: Eduardo Antônio Sanches
 Coorientador: Marcondes Agostinho Gonzaga Junior

 1. Rações. 2. Gametas. 3. Desova. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816) alimentados com ração enriquecida

AUTORA: WANESSA INÁCIO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: EDUARDO ANTÔNIO SANCHES

COORIENTADOR: MARCONDES AGOSTINHO GONZAGA JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:



Assinado de forma digital por EDUARDO
ANTONIO SANCHES:05482916910
Dados: 2024.02.22 18:27:46 -03'00'

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Presencial)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / FCAVR/Unesp, Registro-SP

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA**
Data: 28/02/2024 10:03:29-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Universidade Estadual Paulista (FEIS-UNESP)

Documento assinado digitalmente
 **DANILO PEDRO STREIT JR**
Data: 23/02/2024 08:09:52-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. DANILO PEDRO STREIT JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2024.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da fertilização para os dois tratamentos (controle e reprodutores) de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT).
..... 21

Figura 2: Volume de sêmen extrusado de *C. macropomum* após indução hormonal. Legendas: REP - alimentados com ração comercial específica para reprodutores; CRT - alimentados com ração comercial controle, ao longo do período reprodutivo; 1ª coleta: outubro 2022, 2ª 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período 21

Figura 3: Produção Relativa de sêmen de *C. macropomum* após indução hormonal. Legendas: REP - alimentados com ração comercial específica para reprodutores; CRT - alimentados com ração comercial controle, ao longo do período reprodutivo; 1ª coleta: Outubro 2022, 2ª coleta: Janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período. 22

Figura 4: Total de espermatozoides de sêmen de *C. macropomum* após indução hormonal. Legendas: REP - alimentados com ração comercial específica para reprodutores; CRT - alimentados com ração comercial controle, ao longo do período reprodutivo; 1ª coleta: Outubro 2022, 2ª coleta: Janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período..... 23

Figura 5: Porcentagem de motilidade Total obtida através por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo após indução hormonal. Legendas: 1ª coleta: Outubro 2022, 2ª coleta: Janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período. 23

Figura 6: Taxa de motilidade de (0 a 35 segundos) obtido através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo..... 24

Figura 7: Velocidade curvilinear (VCL) obtido através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle ao longo do período reprodutivo (CRT). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio/erro padrão. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$), de acordo com o teste não paramétrico de H. 25

Figura 8: Parâmetros espermáticos obtidos através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023; (VAP), (B) Velocidade linear progressiva (VSL), (C) Retilinearidade (STR), (D) Oscilação (WOB). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período..... 26

Figura 9: Resultados de progressividade (PROG) e batimento flagelar cruzado (BCF) obtidos através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle Resultados de progressividade (PROG) e batimento flagelar cruzado (BCF) obtidos através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período. 27

Figura 10: Resultado de espermatozoides íntegros sêmen *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período. 28

Figura 11: Taxa de fertilização de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste não paramétrico de H. 29

Figura 12: Larvas normais de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste não paramétrico de H. 30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Níveis de garantia das rações utilizadas no estudo de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores e ração comercial controle. 15
- Tabela 2:** Resultados dos parâmetros físico-químico da água (média $\pm$ desvio padrão) referente ao experimento de produção e qualidade espermática de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores e ração comercial controle. 17
- Tabela 3:** Ganho de peso dos reprodutores durante as coletas do experimento de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT). 17
- Tabela 4:** Taxa de fertilização de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores e ração comercial controle. 24
- Tabela 5:** Percentual de larvas normais de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT). 25
- Tabela 6:** Valores de produção de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT). 26

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	9
APOIO FINANCEIRO.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1-Introdução	11
2-Objetivo Geral	13
2.1 Objetivos Específicos.....	13
3-Material e Métodos.....	14
3.1 Local do Estudo	14
3.2 Delineamento Experimental	14
3.3 Alimentação e Qualidade de água	14
3.4 Indução Hormonal.....	15
3.2-Coleta e Avaliação de Características Seminais.....	16
3.5- Coleta e Avaliação dos Ovócitos	18
3.6 -Análise Econômica	19
3.7-Análises Estatísticas.....	20
4-Resultados	20
5-Discussão	31
6-Conclusões	35
7-Referências	35

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais essa conquista e por sempre me guiar e iluminar no caminho certo.

A minha família por sempre estarem ao meu lado em especial aos meus pais, Silveira Martins e Maria Aparecida Inácio por nunca me desamparar e sempre me ajudar e dar forças nos momentos em que mais precisei. A minha irmã e amiga Naiane Inácio de Oliveira que sempre esteve ao meu lado.

Ao meu esposo, Nycolas Gabriel Martins de Holanda que sempre me apoiou e esteve ao meu lado.

Ao Professor orientador Dr. Eduardo Antônio Sanches por todo conhecimento, incentivo, dedicação e principalmente esforço em sempre estar disponível e se deslocar até Rondônia para nos orientar nas coletas.

A Érica Eloy da Silva pela amizade e companheirismo durante essa caminhada de graduação e mestrado.

Ao Edson Inácio, Edequir Cuevas, Weder tomicha, por toda ajuda durante as coletas.

Ao grupo *Fish Reproduction Research Group* da UNESP de Registro/SP, em especial a Janaína Valandro, Ana Regina, Julia Pohl.

A GUABI- saúde animal pela ração fornecida durante o período experimental.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado.

A Universidade Federal de Rondônia por todos o amparo durante as coletas e pesquisa.

A piscicultura Vale do Rio machado por toda estrutura e animais cedida para a realização do experimento.

Ao coorientador Prof. Dr. Marcondes Agostinho Gonzaga Júnior por todo suporte.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 – processo nº 88887.675044/2022-00, em parceria com a GUABI- Nutrição Animal e Piscicultura Vale do Rio Machado.

RESUMO

A nutrição está totalmente ligada ao processo reprodutivo, podendo interferir diretamente na qualidade dos gametas, no entanto, são poucos os estudos relacionados a nutrição de reprodutores de *Colossoma macropomum*, e rações específicas a fim de atender as necessidades de cada reprodutor são escassas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção e qualidade espermática de *C. macropomum* alimentados com ração comercial enriquecida e específica para reprodutores ao longo do ciclo reprodutivo. Para tanto, o experimento foi conduzido na Piscicultura Vale do Rio Machado, localizada em Presidente-Médici/RO. Foram utilizados dois viveiros, contendo 10 reprodutores machos ($7,3 \pm 1,6$ kg) e 10 fêmeas ($10,4 \pm 1,8$ kg) em cada, identificados por microchip e alimentados com dois tipos de dietas diferentes, sendo o controle (CTR) ração comercial onívoros contendo 28% PB e 40g/Kg de EE e ração comercial enriquecida específica para reprodutores (REP) contendo 36% PB e 80g/kg de EE. Com intuito de ter o acompanhamento completo do ciclo reprodutivo, as coletas de sêmen foram realizadas com intervalo 90 dias entre elas em outubro/2022, janeiro/2023, abril/2023 e julho/2023,. Realizou-se as análises espermáticas computadorizadas utilizando o CASA/IMAGEJ. Para cada coleta, utilizou-se duas fêmeas para a fertilização, sendo uma recebendo a alimentação CTR e a outra ração específica para REP. Os parâmetros espermáticos foram avaliados separadamente por coleta, onde, os resultados obtidos das análises espermáticas, e os parâmetros cinéticos, qualidade e produção espermática o tratamento CTR obteve médias superiores comparado ao tratamento REP. Portanto, os reprodutores alimentados com ração comercial CTR destinada a engorda apresentaram produção seminal e qualidade espermática superiores ao tratamento com ração específica para reprodutores, obtendo ainda maior viabilidade na produção espermática de *C. macropomum*.

Palavras-chave: Rações, gametas, desova

ABSTRACT

The nutrition is completely linked to the reproductive process and can directly interfere with the quality of the gametes, however, there are few studies related to the nutrition of *Colossoma macropomum* breeders, and specific feeds to meet the needs of each breeder are scarce. Therefore, the objective of this work was to evaluate the sperm production and quality of *C. macropomum* fed with specific enriched commercial feed for breeders throughout the reproductive cycle. To this end, the experiment was conducted at *Fish farming Vale do Rio Machado* located in Presidente-Médici/RO, Brazil. Two ponds were used, containing 10 male breeders (7.3 ± 1.6 kg) and 10 females (10.4 ± 1.8 kg) in each, identified by microchip and fed with two types of different diets, the control (CTR) being feed commercial omnivores containing 28% CP and 40g/kg EE and specific commercial feed for breeders (REP) containing 36% CP and 80g/kg EE. To monitoring the reproductive cycle of season, the sperm collect were performed each 90 days apart in the months of October 2022, January 2023, April 2023 and July 2023. Sperm analyzes computerized were performed using CASA/IMAGEJ. For each collection, two females were used to fertilization, one receiving CTR food and the other specific food for REP. Sperm parameters were evaluated separately by collection, where the results obtained from sperm analysis, and the kinetic parameters, quality and sperm production, the CTR treatment obtained higher averages compared to the treatment REP. Therefore, breeders fed with commercial CTR feed intended for fattening showed superior seminal production and sperm quality compared to treatment with specific feed for breeders, achieving even greater viability in the sperm production of *C. macropomum*.

Keywords: Feed, gametes, spawning

1-Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) espécie nativa da bacia Amazônica é amplamente cultivado nos países da América do Sul (Brasil, Equador, Panamá, Peru, Venezuela e Colômbia). Dentre as suas características biológicas e econômicas favoráveis, estão o seu potencial zootécnico e rusticidade, podendo ser cultivados nos mais diferentes sistemas de cultivo, em função das suas adaptações fisiológicas e anatômicas às condições de manejo e de resistência a alterações ambientais e a doenças (Gomes et al. 2013). Devido essas características, vem ganhando espaço, sendo a segunda espécie mais cultivada no Brasil, liderando o ranking em Rondônia como maior produtor de peixes nativos do Brasil com 57.200 toneladas (PEIXE BR 2022).

Neste sentido, é indispensável o investimento em pesquisas direcionadas para o desenvolvimento da espécie, principalmente na produção de larvas e juvenis que está diretamente ligado ao processo de reprodução. Para tanto, um dos maiores fatores que influenciam no sucesso dos reprodutores é a nutrição adequada, e pode interferir direta ou indiretamente em vários aspectos da reprodução de peixes, incluindo o desenvolvimento gonadal, o desempenho reprodutivo, a taxa de desova, a fecundidade, a qualidade e quantidade de espermatozoides, bem como a qualidade da progênie (VOLKOFF, & LONDON 2018). A redução, indisponibilidade de alimentos ou dietas deficientes em nutrientes nos peixes, geralmente causam regressão das gônadas, diminuição da desova e do número de ovos, e para os machos redução da concentração espermática e volume seminal. Em contraste, o aumento da disponibilidade de alimentos promove o crescimento e tamanhos corporais causando maturação precoce e maior produtividade (VOLKOFF, & LONDON 2018).

Dessa forma, uma nutrição adequada é crucial para o desempenho reprodutivo. Uma reprodução bem-sucedida requer recursos adequados para sustentar as demandas de alta energia para a produção de gametas e comportamentos reprodutivos. Geralmente, o balanço energético negativo e o baixo consumo alimentar inibem o eixo reprodutivo (VOLKOFF et al. 2018). Os animais frequentemente modulam sua fisiologia reprodutiva de acordo com os estoques de energia disponíveis. Por exemplo, a limitação alimentar, diminuiu os estoques de energia, a fim de poupar fornecimentos para funções vitais, dessa

forma, o peixe quando não está nutrido de forma que supra suas necessidades vitais e reprodutivas, suas funções endócrinas automaticamente reduz os gastos energéticos. Além disso, Izquierdo et al. (2001) destacam que a composição lipídica e de ácidos graxos da dieta dos reprodutores são os principais fatores dietéticos que determinam a reprodução bem-sucedida e a sobrevivência da prole.

No caso de espécies nativas sul-Americanas, são poucos trabalhos voltados para a nutrição de reprodutores, em especial para o *C. macropomum*, em que níveis ideais de proteína, lipídios, carboidratos, aminoácidos, energia digestíveis, vitaminas e minerais são ainda desconhecidos. Outros componentes descritos por Izquierdo et al. (2001) como importantes são, os minerais, o fósforo, a qualidade das proteínas utilizadas, as vitaminas, tais como, vitamina A, vitamina B6 e ácido fólico. A deficiência destes nutrientes pode causar redução da concentração espermáticas e da fluidez do sêmen, o que pode afetar negativamente o sucesso da fertilização (IZQUIERDO et al. 2001). Ou seja, é evidente que os reprodutores possuem uma exigência nutricional diferente de peixes de engorda e rações específicas para os reprodutores podem contribuir para melhorar o desempenho reprodutivo dos peixes (ROMAGOSA et al. 2016). No mercado existem algumas rações comerciais específicas para reprodutores, no entanto, uma ração específica para reprodutores consequentemente exige um custo maior quando comparados com uma ração comercial sem ainda existir estudos avaliando a eficácia dessas rações em propriedades comerciais, verificando a qualidade, custo e a viabilidade de produção para machos e fêmeas.

2-Objetivo Geral

Avaliar a produção e a qualidade espermática de *C. macropomum* alimentados com ração comercial enriquecida e específica para reprodutores ao longo do ciclo reprodutivo.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar a produção seminal e concentração espermática de *C. macropomum* alimentados com ração comercial enriquecida;

Avaliar a qualidade espermática por meio de parâmetros computadorizados utilizando o software de código aberto CASA/ImageJ de *C. macropomum* alimentados com ração comercial enriquecida;

Avaliar a integridade de membrana e as alterações morfológicas espermáticas de *C. macropomum* alimentados com ração comercial enriquecida;

Avaliar a fertilização e percentual de larvas defeituosas de *C. macropomum* alimentados com ração comercial enriquecida;

Analisar economicamente a viabilidade das rações, comercial específica para reprodutores e ração comercial controle.

3-Material e Métodos

3.1 Local do Estudo

O experimento foi conduzido na Piscicultura Vale do Rio Machado, localizada no município de Presidente-Médici (11°03'46" S; 61°53'53" W), Rondônia. A metodologia para uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 20/2023 – CEUA/FCAVR-Unesp), estando conforme as normas preconizadas pelo CEUA.

3.2 Delineamento Experimental

Foram utilizados dois viveiros, na proporção de 1740 m² e 1360 m², contendo 10 reprodutores machos e 10 fêmeas de *C. macropomum* cada, com peso médio aproximado de (7,318±1,614) e (10,422±1,796) kg respectivamente, identificados por microchip. Visto que o viveiro não tem a mesma área, os animais foram previamente pesados e para controle da biomassa, de modo que ambos os viveiros ficassem com 0,226kg/m².

3.3 Alimentação e Qualidade de água

Para alimentação dos animais foram testadas dois tipos de dietas diferentes, sendo considerada como controle uma ração comercial para peixes onívoros com 28% PB (CRT) e outra específica para reprodutores 36%PB (REP) (Tabela 1). O início do arraçoamento foi em julho/2022, os animais foram alimentados uma vez ao dia na proporção de 1,1% da biomassa, passaram por um tempo de adaptação (15 dias) para controlar a quantidade de ração que seria ofertado. Para o controle de qualidade de água, foram mensurados semanalmente com o kit colorimétrico (Alfakit) aferindo os parâmetros de pH, alcalinidade e amônia. Os parâmetros de oxigênio e temperatura foram mensurados com uma sonda multiparâmetro Water Quality Meter Akso AK88, com precisão de ± 0,1 de margem de erro.

Tabela 1: Níveis de garantia das rações utilizadas no estudo de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT).

Níveis Nutricionais**		
Níveis de Garantia	REP	CRT
Umidade (máx.) g/kg	100	130
Proteína Bruta (mín.) g/kg	360	280
Extrato Etéreo (mín.) g/kg	80	40
Fibra Bruta (máx.) g/kg	60	100
Matéria Mineral (máx.) g/kg	120	140
Cálcio (mín.) g/kg	15	10
Cálcio (máx.) g/kg	30	30
Fósforo (mín.) mg/kg	8.000	2.000
Sódio (mín.) mg/kg	1.850	2.000
Vitamina A (mín.) U.I	12.000	3.000
Vitamina C (mín.) mg/kg	1.000	150
Vitamina E (mín.) U.I	400	12,50
Vitamina K3 (mín.) mg/kg	22,5	1,23
Vitamina B1 (mín.) mg/kg	24	2,5
Vitamina B2 (mín.) mg/kg	24	5
Vitamina B3 (mín.) mg/kg	-	25
Vitamina B5 (mín.) mg/kg	60	-
vitamina B6 (mín.) mg/kg	24	2,5
Vitamina B12 (mín.) mcg/kg	10	24
Vitamina D3 (mín.) UI/kg	-	600
Lisina (mín.) g	20	-
Metionina (mín.) mg/kg	6.800	-
Colina (mín.) mg/kg	2.000	-

3.4 Indução Hormonal

Os animais foram submetidos a indução hormonal por meio da aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), sendo duas doses para fêmeas, com a primeira de 0,5 mg de EBHC * kg⁻¹ e a segunda de 5,0 mg de EBHC * kg⁻¹ em um intervalo de 12 horas, diluídas em soro fisiológico (0,9% NaCl) conforme Pires et al. (2018). Aos machos foram administradas dose única de 2,5 mg de EBHC * kg⁻¹ peso vivo simultaneamente à segunda aplicação das fêmeas, conforme Pires et al. (2017). As aplicações foram feitas na base da nadadeira peitoral.

3.5 Coleta e Avaliação de Características Seminais

As coletas de sêmen ocorreram com intervalo 90 dias, sendo estas nos meses de outubro 2022, janeiro 2023, abril 2023 e julho 2023, a fim de ter o acompanhamento completo do ciclo reprodutivo. Para cada coleta, os animais foram capturados dos viveiros com o auxílio de uma rede de arrasto, identificados e levados até o laboratório de reprodução, onde então foram alocados em caixas circulares identificadas, com capacidade de água de 2000L dotados de um sistema de recirculação de água constante (9800L) temperatura controlada (28°C). Devido o número de incubadoras disponíveis no laboratório, na semana de coleta os animais eram divididos em dois grupos, a primeira coleta com cinco animais da ração comercial controle (CRT) e cinco animais da ração comercial específica para reprodutores (REP), totalizando 10 animais por coleta, três dias após o segundo grupo foi submetido ao mesmo procedimento.

A coleta das gametas ocorreu após 220 horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo), a somatória deu-se início a partir da segunda aplicação de hormônio das fêmeas. Para a coleta de sêmen, os peixes foram contidos, secos (panos e papel toalha) e submetidos a pressão abdominal no sentido céfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada a fim de evitar contaminações com urina (Poupard et al., 1998). O sêmen liberado foi coletado em tubo falcon graduado 15 mL para mensuração do volume total liberado e estimativa da produção relativa de sêmen (mL kg^{-1} de reprodutor). Após a coleta as amostras foram alocadas em caixa com gelo para análises posteriores, conforme Pires et al (2019).

Para a mensuração da concentração espermática, utilizou-se uma amostra 2 μL de sêmen diluído em 2000 μL de fixador formol salino tamponado (4,6%) (STREIT JR et al., 2004). A contagem em câmara Hematimétrica de microscópio de luz, sob objetiva de 40x, seguindo de a estimativa conforme Wirtz & Steinmann (2006).

A análise de Integridade de membrana foi realizada pelo método de coloração eosina-nigrosina (adaptado de BLOM 1950), Utilizando {30 μL de sêmen, 90 μL de eosina e 90 μL de nigrosina}, em seguida as lâminas foram

analisadas sob microscópio de luz em objetiva de 60x, contando 600 espermatozoides por amostra em três campos de contagem de 200 células cada. Foram considerados rosados os mortos por absorverem a coloração dos corantes e branco os vivos por serem impermeáveis aos corantes (SANCHES et al. 2016).

A taxa de alterações morfológicas realizou-se a partir do sêmen fixado em formol salino tamponado coletando uma amostra de 5 μ L colocando em microtubos de 1,5mL, sendo adicionado 10 μ L de corante rosa de bengala. Em seguida foi realizado a confecção da lâmina, que consistiu em pingar uma gota do material e deixar escorrer. As lâminas foram secas a sombra e examinadas sob microscópio de luz trinocular em objetiva de 60x, avaliando e classificando os espermatozoides em normais e defeituosos (calda solta, calda dobrada, cabeça solta e calda quebrada)

As avaliações da motilidade espermática pelo método computadorizado, foram realizadas conforme descrito por Wilson-Leedy & Ingermann (2007) utilizando-se software livre ImageJ/*plugin* CASA editados no software VIRTUALDUB-1.10.4, por meio do software ImageJ, conforme Pires et al. (2017). A ativação do sêmen foi realizada em microtubos 1,5ml, sendo utilizado 1 μ L de sêmen e 600 μ L de água destilada, as imagens foram obtidas através de um microscópio de luz trinocular (SolaristBel) focado na objetiva de 10x e uma câmera Basler acA640-120gc (<http://www.baslerweb.com>), conectada ao microscópio e no computador (intel® core i5®- 8265U, Ram 8Gb) Sistema operacional Microsoft Windows 10®. Os vídeos foram capturados pelo software livre ImageJ/*plugin* CASA Editados no software VIRTUALDUB-1.10.4, e exportados como sequência de imagens no formato *.jpg, para cada pasta previamente identificada, em seguida as imagens foram abertas e editadas no IMAGEJ e posteriormente analisadas por meio do plugin CASA.

Os parâmetros avaliados foram taxa de motilidade (%) (MOT), velocidade curvilínea (μ m s⁻¹) (VCL), velocidade média da trajetória (μ m s⁻¹) (VAP), Velocidade em linha reta (μ m s⁻¹) (VSL), retilinearidade (%) (STR), oscilação (%) (WOB), progressividade (μ m) (PROG) e frequência de batimento cruzado (Hz) (BCF). As configurações utilizadas no plugin CASA foram a=1, b=60, c=25, d=12, e=9, f=12, g=25, h=5, i=1, j=12, k=12, l=25, m=80, n=80, o=50, p=60, q=100,

$r=561.7978$, $s=0$, $t=0$.

3.5- Coleta e Fertilização

Para a escolha das fêmeas observaram-se as características externas, aspecto edemaciado da papila urogenital e abdome protuberante, papila urogenital avermelhada e saliente (ZANIBONI FILHO & WEINGARTNER, 2007). Realizou-se também o processo de canulação, que consiste na retirada de uma pequena parcela de ovócito com o auxílio de cânula (2mm) e uma seringa, após esse processo os ovócitos foram colocados em uma placa de Petri e submerso em solução de serra (60 mL de álcool 90%; 30 mL de formalina; 10 mL de ácido acético glacial) conforme Lemanova & Sakun, (1975), a fim de verificar a posição da vesícula germinativa, foram consideradas aptas a reprodução as fêmeas que apresentavam $\geq 60\%$ de seus núcleos periféricos.

A fim de verificar a capacidade de fertilização dos espermatozóides submetidos aos dois tratamentos, utilizou-se duas fêmeas, sendo uma recebendo a ração comercial controle e a outra recebendo ração comercial enriquecida específica para reprodutores, dessa forma, os machos fertilizavam ambos tratamentos (Figura 1). Os ovócitos foram coletados após 220 horas-graus (somatória da temperatura em função do tempo) somadas a partir da segunda aplicação de hormônio. O processo de extrusão ocorreu a seco, sendo realizada uma massagem sentido encéfalo-caudal, os ovócitos foram coletados em uma bacia com peso conhecido a fim de saber a quantidade de ovócito produzido por fêmea. Após o processo de extrusão os ovócitos foram pesados e para a fertilização foi pesado e contado em triplicata 0,1g. Em seguida foi realizada a pesagem de 100g de ovócito para a fertilização de cada macho.

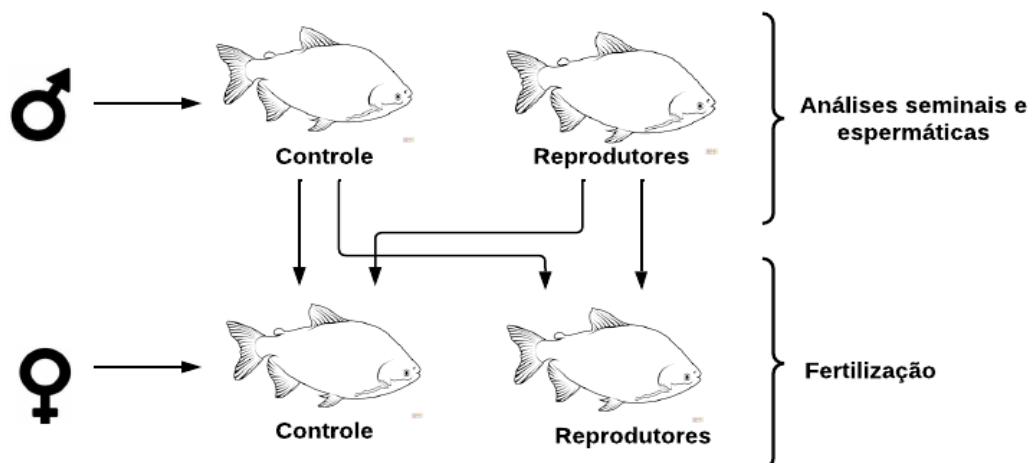


Figura 1: Representação esquemática da fertilização para os dois tratamentos (controle e reprodutores) de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT).

Pelas características, tratamento e resultados obtidos nas análises espermáticas aplicada, o volume de sêmen utilizado para fertilização foi diferente para cada macho. Após a pesagem de 100g de ovócitos foi realizada a fertilização utilizando a dose inseminante de 100.000 espermatozoides móveis ovócito⁻¹ adaptado de Leite et al. (2013). A homogeneização dos ovócitos com o sêmen foi realizada com auxílio de uma espátula. A ativação e hidratação dos gametas ocorreu por meio da inserção de 100 ml de água, e misturadas levemente por um minuto e em seguida levado as incubadoras previamente identificadas, com capacidade de 220L (vazão 5,4L/min), em um sistema de recirculação (9.800L) com temperatura e vazão controlada.

Após o fechamento do blastóporo (oito horas pós fertilização) foi estimado com o auxílio de um estereomicroscópio o percentual de ovos fertilizados a partir da contagem de três amostras (200 ovos) de cada incubadora. Foram considerados como ovos fertilizados, aqueles que apresentaram translúcidos e com desenvolvimento embrionário aparentemente normal e os não-fertilizados ou gorados, os que se apresentavam opacos ou brancos. Após a eclosão, estimada por meio de contagem de três amostras homogêneas de 100mL para a classificação das larvas normais e defeituosas, para a estimativa do percentual de larvas defeituosas.

3.6 -Análise Econômica

Para a análise econômica foi considerado a quantidade de ração fornecida

durante todo o período experimental e multiplicada pelo valor comercial de cada dieta. A fim de obter a quantidade total de espermatozoide (spz) produzido em cada tratamento, foi realizado a soma do número de spz de todas as coletas e dividido pelo valor da dieta gasta em cada tratamento.

3.7-Análises Estatísticas

Para as diferentes coletas, aplicou-se separadamente para cada grupo alimentados com rações diferentes a análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) a 5% de significância e em caso de efeito aplicou-se o teste de comparação de médias no mesmo nível de significância. Dados considerados não paramétricos, foram submetidos a teste de *kruskal-wallis*. Para cada coleta, aplicou-se o teste *t-student* entre os reprodutores alimentados com ração específica para reprodutores e com controle a 5% de significância. Para os dados de taxas de motilidade coletados ao longo do tempo pós ativação, realizou-se uma análise não linear com modelo senoidal para cada grupo. Os pressupostos de homogeneidade dos resíduos (*Shapiro-wilk* test) e homocedasticidade das variâncias (*Levene* test) foram checados. Dados considerados *out-liers* (distância de cook $D < 4/n$) não foram considerados para as análises.

4-Resultados

As médias dos parâmetros físico-químicos da água monitorados durante o experimento não deferiram ($P > 0,05$) entre elas (Tabela 2). Para o ganho de peso dos animais, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os dois tratamentos (Tabela 3).

Tabela 2: Resultados dos parâmetros físico-químicos da água (média $\pm$ desvio padrão) dos tanques componentes do experimento de produção e qualidade espermática de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores e ração comercial controle.

Parâmetros	Reprodutores	Controle
Temperatura (°C)	28,64 $\pm$ 0,18	28,27 $\pm$ 0,12
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹ O ₂)	5,83 $\pm$ 0,42	5,96 $\pm$ 0,400
pH	7,00 $\pm$ 0,29	6,83 $\pm$ 0,43
Alcalinidade (CaCO ₃ mg L ⁻¹)	33,89 $\pm$ 15,72	37,41 $\pm$ 6,36
Amônia (mg L ⁻¹ N-NH ₃)	0,11 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02

Tabela 3: Ganho de peso dos reprodutores durante as coletas do experimento de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT).

Período	CRT (kg)	REP(kg)
Início	7,34±1,28	7,33±1,98
Final	9,76±1,35	9,50±2,02
Ganho de Peso	2,41±0,65	2,18±0,72

Para o volume médio de sêmen (mL) verificou-se que peixes alimentados com ração específica para reprodutores apresentaram resultados semelhantes aos alimentados com ração controle, com exceção para a terceira coleta, em que peixes alimentados com ração controle apresentaram resultados superiores ($p < 0,05$) (Figura 2). Com relação as coletas ao longo do ano, verificou-se maiores valores do grupo alimentado com ração específica na primeira e segunda coleta, e com ração controle na segunda ($p < 0,05$) (Figura 2).

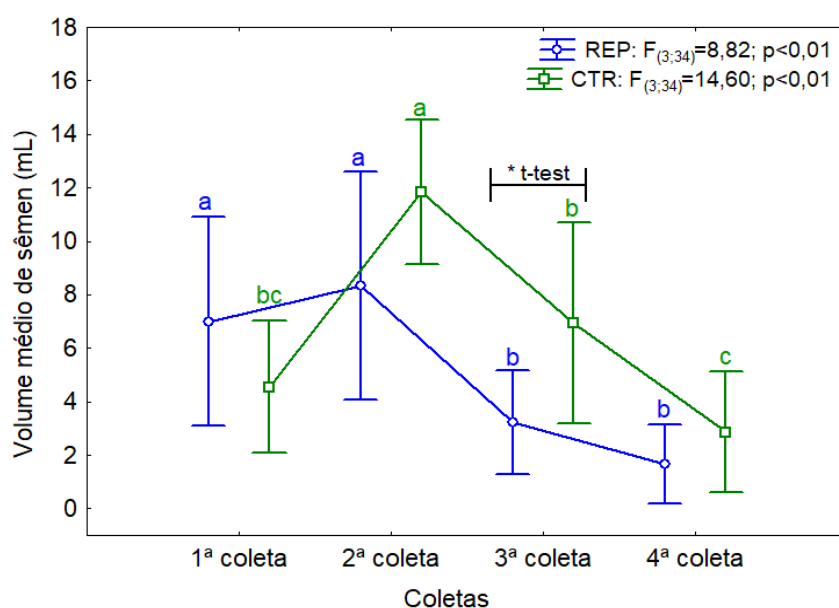
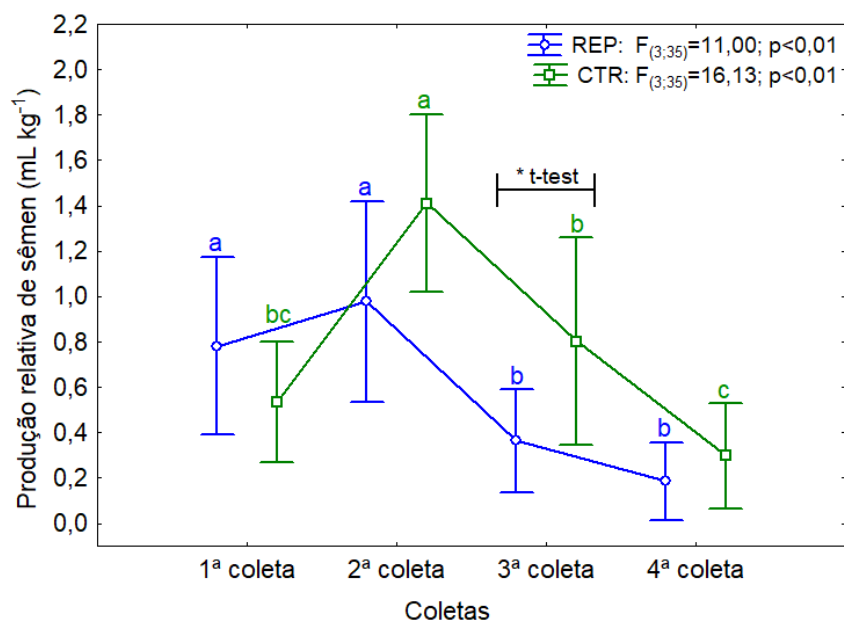


Figura 2: Volume de sêmen extrusado de *C. macropomum* após indução hormonal. Legendas: REP - alimentados com ração comercial específica para reprodutores; CRT - alimentados com ração comercial controle, ao longo do período reprodutivo; 1ª coleta: outubro 2022, 2ª 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período

Para a produção relativa de sêmen (mL kg^{-1}) houve diferença entre os grupos apenas na terceira coleta ($P < 0,05$), no entanto, para o grupo controle, superiores resultados foram verificados na segunda coleta e para o grupo de reprodutores, na primeira e na segunda, reduzindo a produção conforme o ciclo

Figura 3: Produção Relativa de sêmen de *C. macropomum* após indução hormonal. Legendas: REP - alimentados com ração comercial específica para reprodutores; CRT - alimentados com ração comercial controle, ao longo do período reprodutivo;



1ª coleta: Outubro 2022, 2ª coleta: Janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. **t-test* representa o teste *t Student* ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período.

Em relação ao total de espermatozoides ($\times 10^9$) houve diferença ($P < 0,05$) na terceira coleta, no entanto, para o tratamento reprodutores os valores foram superiores na primeira e segunda coleta, já para o controle na segunda e terceira coleta (Figura 4).

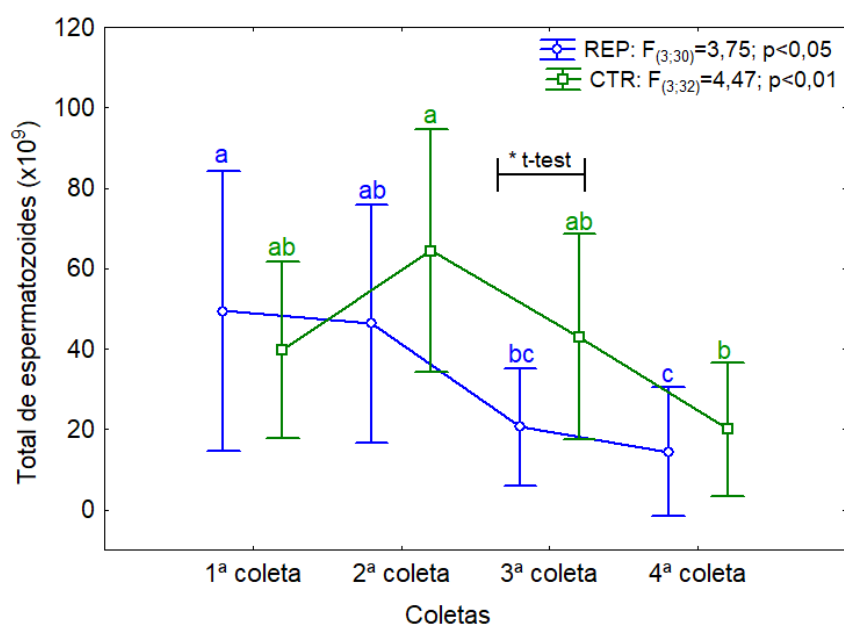
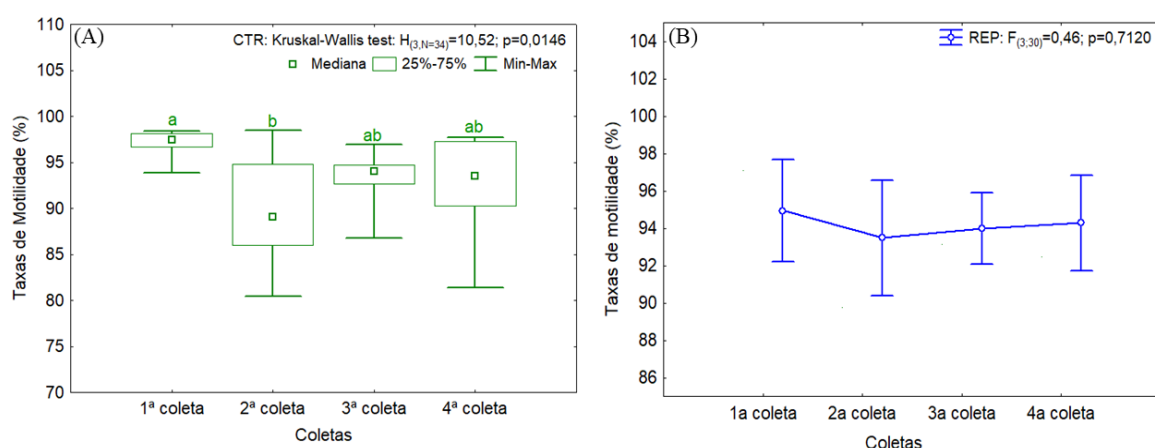


Figura 4: Total de espermatozoides de sêmen de *C. macropomum* após indução hormonal. Legenda: REP - alimentados com ração comercial específica para reprodutores; CRT - alimentados com ração comercial controle, ao longo do período reprodutivo; 1ª coleta: Outubro 2022, 2ª coleta: Janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p<0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período.

Para os parâmetros de taxas de motilidade (%) houve diferença ($P<0,05$) no tratamento controle (Figura 5A) entre as coletas, apresentando variações de 80 a 99% de motilidade entre as coletas, para o tratamento reprodutor (90 e 98%) não houve diferença ($P>0,05$) entre as coletas (Figura 5B).



longo do período reprodutivo após indução hormonal. Legendas: 1ª coleta: Outubro 2022, 2ª coleta: Janeiro 2023, 3ª coleta: Abril 2023 e 4ª coleta: Julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período.

Com relação as taxas de motilidade ao longo do tempo (0 a 35s), verificou-se redução com comportamento senoidal para ambos os tratamentos, sem uma tendência de maior tempo de motilidade de um ou para o outro (Figura 6).

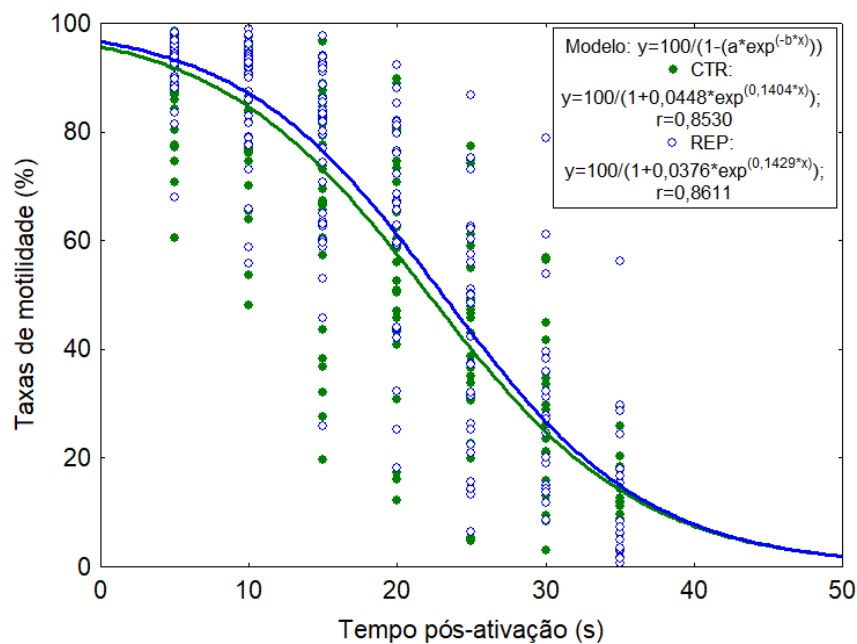


Figura 6: Taxa de motilidade de (0 a 35 segundos) obtido através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR) ao longo do período reprodutivo.

Para o parâmetro de velocidade curvilinear VCL ($\mu\text{m/s}$) observou-se diferença para os dois tratamentos ($P < 0,05$), entretanto os resultados obtidos para o controle (Figura 7A) a velocidade foi superior ao reprodutor (Figura 7B), na

segunda coleta a velocidade diminuiu para os ambos e na terceira e quarta o comportamento de velocidade foi similar, entretanto com VCL diferentes (Figura 7)

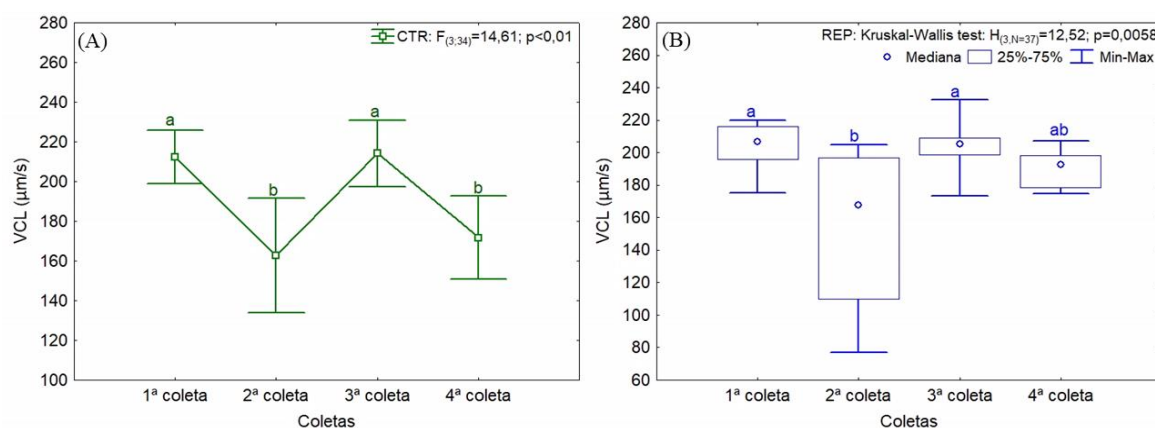


Figura 7: Velocidade curvilínea (VCL) obtido através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle ao longo do período reprodutivo (CTR). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio/erro padrão. **Legendas:** 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$), de acordo com o teste não paramétrico de H.

Dados obtidos para o parâmetro de velocidade média da trajetória do espermatozoide (VAP) demonstram que os resultados foram similares entre os tratamentos até a terceira coleta, expressando diferença ($P<0,05$) na quarta coleta (Figura 8A). Para o parâmetro espermático de velocidade linear progressiva (VSL) apresentou diferença ($P<0,05$) na quarta coleta, no entanto os valores foram semelhantes entre os tratamentos (figura 8B). Para o parâmetro espermático de retilinearidade (STR) não foi verificado diferença entre os tratamentos, apenas entre as coletas ($P<0,05$), observando comportamento similar (figura 8C). Os resultados obtidos para o parâmetro índice de oscilação (WOB), obteve diferença ($P<0,05$) entre as coletas e tratamentos, com variações na 2ª e 4ª coleta, nas demais o comportamento foi semelhante (Figura 8D).

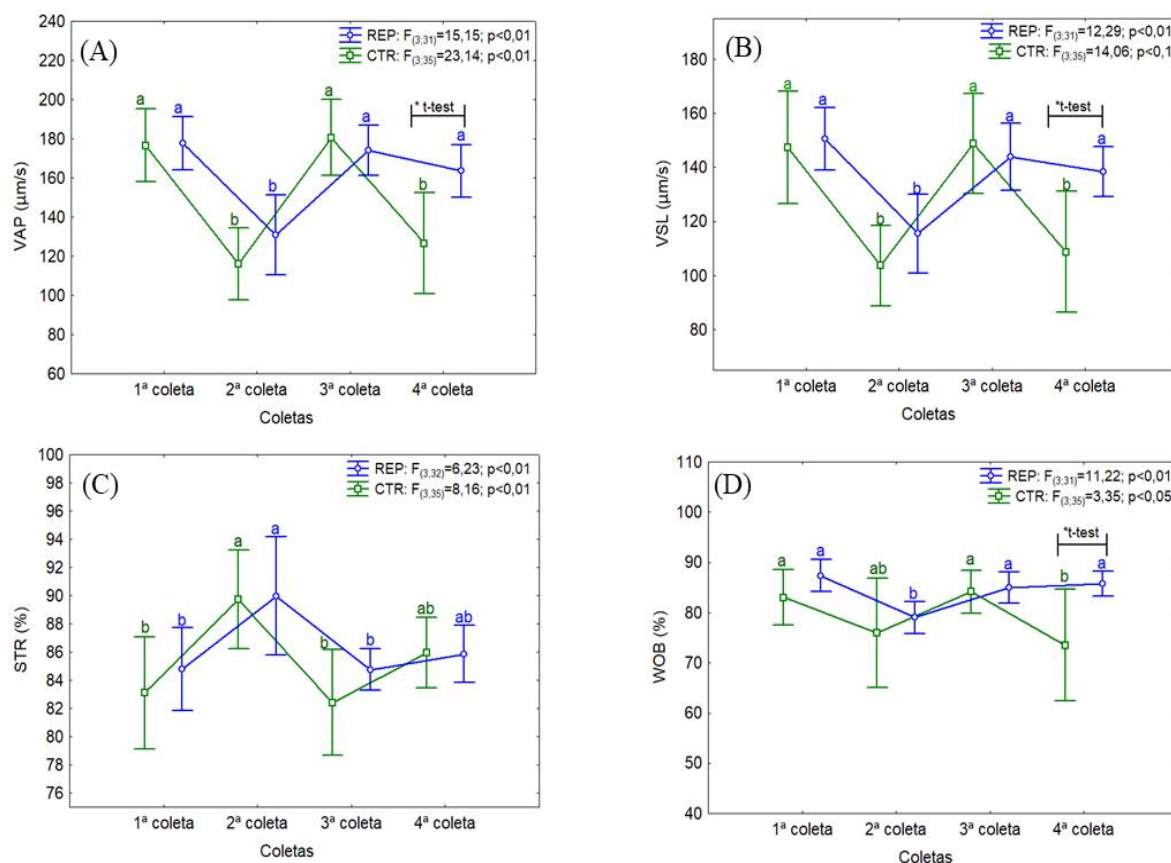


Figura 8: Parâmetros espermáticos obtidos através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023; (VAP), (B) Velocidade linear progressiva (VSL), (C) Retilinearidade (STR), (D) Oscilação (WOB). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p<0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período.

Para o resultado espermático de progressão (PROG), houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos apenas na 4ª coleta, para o grupo reprodutores a diferença foi apenas na 3ª e no controle na 2ª e 4ª coleta. (figura 9A). Para o parâmetro espermático frequência do batimento flagelar cruzado (BCF) houve diferença entre as coletas de cada tratamento ($P<0,05$), nas coletas 1ª, 2ª e 3ª, o comportamento de frequência entre os dois grupos foram similares, entretanto, na 4ª coleta houve diferença, com média superior para o controle (figura 9B).

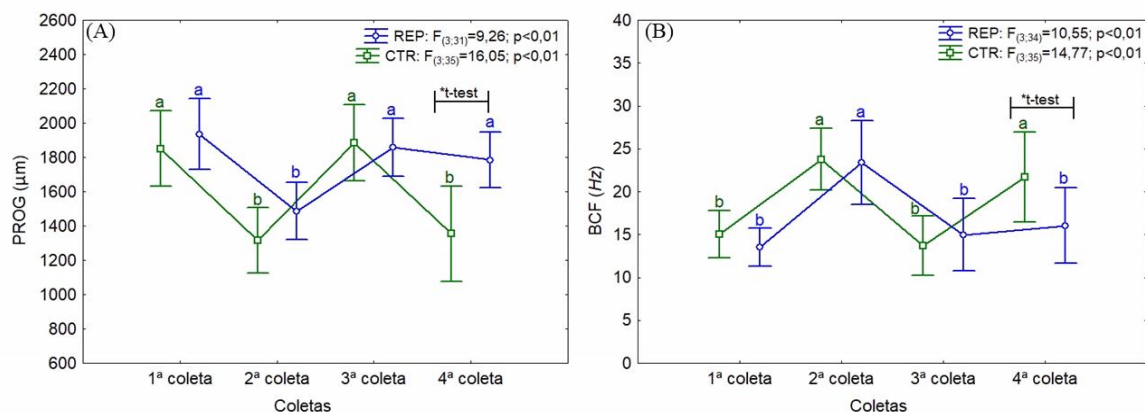


Figura 9: Resultados de progressividade (PROG) e batimento flagelar cruzado (BCF) obtidos através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle. Resultados de progressividade (PROG) e batimento flagelar cruzado (BCF) obtidos através software livre ImageJ/plugin CASA para sêmen de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período.

O percentual de espermatozoides íntegros permaneceu acima de 78% para os dois tratamentos durante o período experimental, obtendo maior variação para o tratamento REP na segunda coleta, no entanto na 4ª os tratamentos obtiveram resultados superiores as demais coletas (Figura 10).

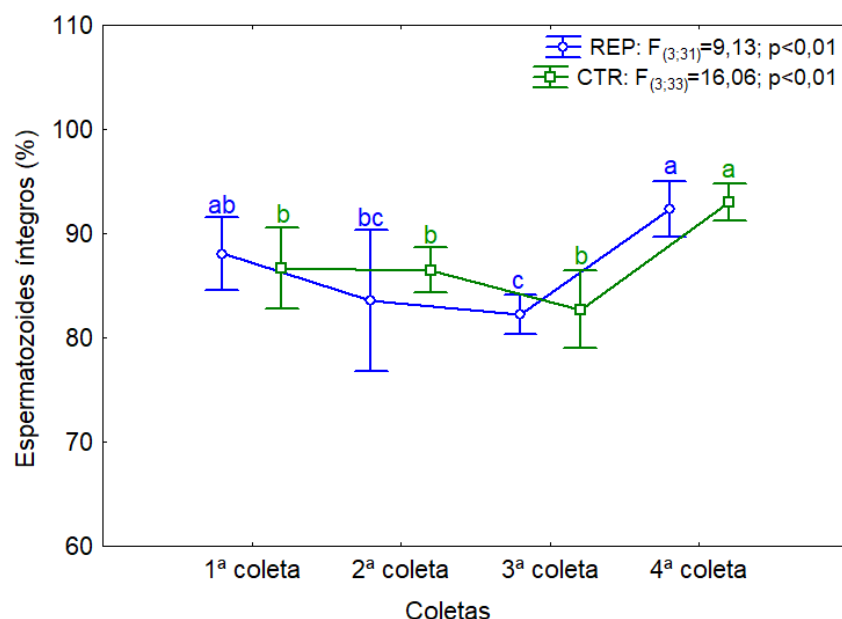


Figura 10: Resultado de espermatozoides íntegros sêmen *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração

comercial controle (CRT) ao longo do período reprodutivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *t-test representa o teste t Student ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo período.

Para o parâmetro de morfologia, não houve efeito ($p > 0,05$), para o tratamento ração comercial específico para reprodutores apresentou média de ($73,04 \pm 3,249\%$) de espermatozoides normais e para ração comercial controle média ($74,898 \pm 3,873\%$) de espermatozoides normais durante o período experimental.

Ao avaliar a fertilização de todas as coletas, observou-se que não houve diferença para a fertilização com fêmeas alimentados com ração específica para reprodutores, nem para o tratamento controle. Entretanto, quando comparada a fertilização entre as fêmeas reprodutores e controle, observou-se diferença ($P < 0,05$) com resultados superiores de fertilização para o tratamento controle, resultado observado para os machos do grupo reprodutores e controle (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de fertilização (%) de machos e fêmeas de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR).

Machos	Fêmeas		p-valor
	REP	CTR	
REP	$61,84 \pm 18,84$	$86,60 \pm 12,45$	$p < 0,01$
CTR	$61,56 \pm 17,35$	$81,61 \pm 15,25$	$p < 0,01$
p-valor	$p = 0,97$	$p = 0,30$	

Para os dados obtidos para capacidade de fertilização, observou-se resultados semelhantes entre os dois tratamentos, para ambos houve diferença ($P < 0,05$) entre as coletas, destacando maior variação dos resultados na 1ª e 2ª (Figura 11A), com valores superiores e constante na 3ª e a 4ª coleta, no entanto a média do tratamento reprodutor foi superior ao controle (Figura 11B)

Para os resultados obtidos do percentual de larvas normais observou-se diferença ($P < 0,05$) com resultado superior para o grupo de machos reprodutores e fêmea controle, tendo em vista que a normalidade dos machos e fêmeas controle, também obteve resultado superior. Tendo em vista que não houve diferença dentro de cada grupo de fêmeas ($P > 0,05$) (Tabela 5).

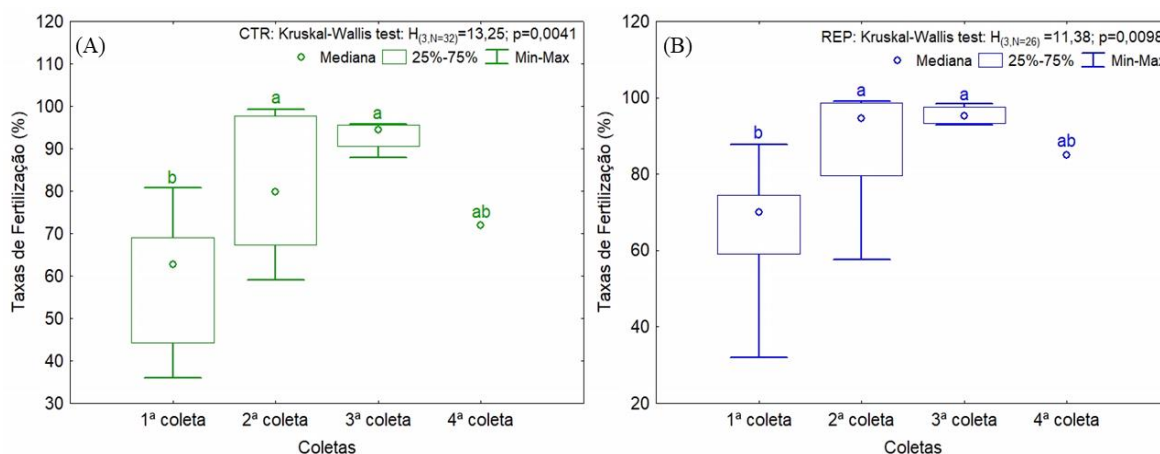


Figura 11: Taxa de fertilização de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste não paramétrico de H.

Tabela 5: Percentual de larvas normais de machos e fêmeas de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR).

Machos	Fêmeas		p-valor
	REP	CTR	
REP	96,26 $\pm$ 3,53	99,09 $\pm$ 1,66	p=0,01
CRT	95,46 $\pm$ 5,97	98,55 $\pm$ 1,86	p=0,05
p-valor	p=0,71	p=0,36	

Para o resultado de percentual de larvas normais de cada coleta, observou-se diferença ($P < 0,05$) entre as coletas de cada tratamento, destacando comportamento similar de normalidade entre os dois grupos, para a 1ª e 2ª coleta

observou maior variação em ambos os tratamentos, no entanto para a 3ª e 4ª coletas os valores foram acentuados e superiores (Figura 12).

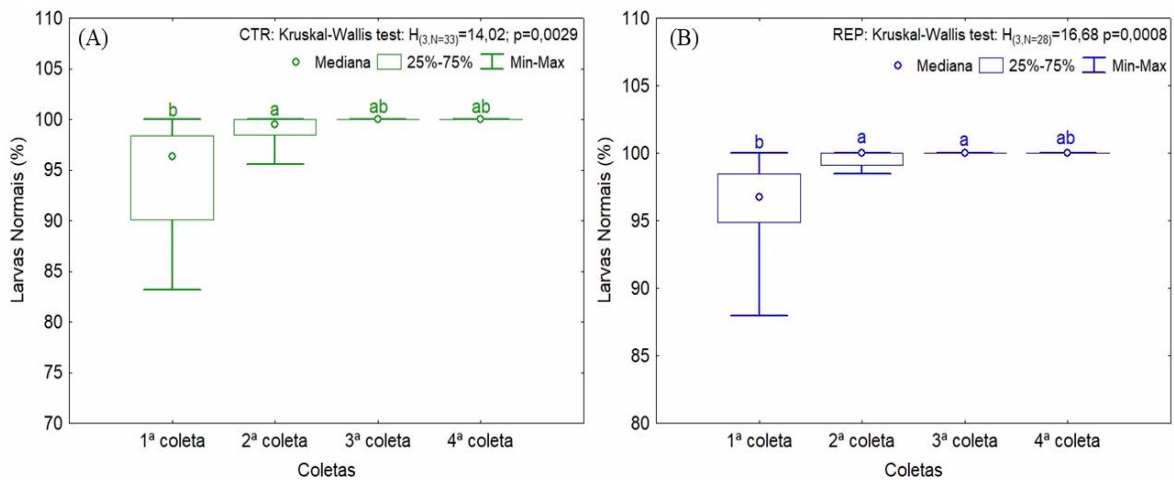


Figura 12: Larvas normais de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CTR) ao longo do período reprodutivo. Legendas: 1ª coleta: outubro 2022, 2ª coleta: janeiro 2023, 3ª coleta: abril 2023 e 4ª coleta: julho 2023. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras ao longo do período para o mesmo tratamento indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste não paramétrico de H.

Tabela 6: Valores de produção de sêmen de *C. macropomum* alimentados com ração comercial específica para reprodutores (REP) e ração comercial controle (CRT).

	Produção (mL)	Total spz	Capacidade Fertilizante	Gasto Dieta (R\$)	Custo spz $\times 10^6$ (R\$)
REP	203,5	$1,65E^{+12}$	16.468.500	1.948,62	$1,18E^{-09}$
CRT	261,0	$1,92E^{+12}$	19.171.425	836,07	$4,35E^{-10}$
≠ (%)	22,03%	14,11%	14,11%	133,07%	

Para os valores de produção de sêmen, total de espermatozoides, capacidade fertilizante, o tratamento CRT obteve melhores resultados, tendo em vista que o maior gasto da dieta em todo o período experimental foi superior no tratamento REP, consequentemente o tratamento CRT obteve o menor custo de spz $\times 10^6$ (Tabela 6). Durante o período reprodutivo o tratamento controle produziu 261mL de sêmen e o tratamento reprodutores 203mL com diferença de 22%, e a capacidade fertilizante e total de espermatozoides para o tratamento controle foi 14% a mais comparado com os reprodutores.

5.0 Discussão

No presente trabalho verificou-se que machos de *C. macropomum* liberam sêmen ao longo de todo o período reprodutivo e quando alimentados com ração com menor quantidade de nutrientes apresentam melhor desempenho em comparação com ração específica de reprodutores que é suplementada com minerais e vitaminas, ou seja, a ração utilizada para crescimento da espécie, pode ser utilizada para alimentação dos machos.

Com relação à possibilidade de produção de sêmen ao longo dos meses de coleta, alguns autores destacam o ciclo reprodutivo do *C. macropomum* durante o período de setembro a fevereiro (HILSDORF et al., 2022). Novoa & Ramos (1982) destacam o pico de maturação por volta do mês de junho, embora possam ser encontradas fêmeas maduras de agosto a setembro.

Dessa forma, em algumas pisciculturas comerciais do estado de Rondônia, o processo de reprodução inicia-se no entre os meses de setembro e outubro e reproduzem até julho, a fim de verificar o período reprodutivo completo, as coletas deram-se início no mês de outubro/2022 e obteve resultados satisfatório de volume médio de sêmen, em comparação para os dois tratamentos testados, observou-se que o (CRT) (28%PB) produziu maior volume de sêmen quando comparado ao tratamento (REP) (36PB%). Nesse sentido, a maior variação de motilidade correu na segunda coleta, o que pode estar relacionado com o volume espermático que também foi superior. Levando em consideração que os dois tratamentos estavam com as mesmas condições de densidade, qualidade de água, mesmos procedimentos para as análises, a motilidade foi superior a 80% para os dois tratamentos, entretanto para o tratamento REP não houve diferença ($94 \pm 4\%$) entre as coletas, diferente do controle que teve variações no decorrer do ciclo reprodutivo. Como na segunda coleta a motilidade do tratamento controle foi inferior em relação as outras, consequentemente os parâmetros cinéticos também, os parâmetros de velocidade curvilínea (VCL) velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB), progressão (PROG) e frequência de batimento cruzado (BCF) apresentaram valores semelhantes para os dois tratamentos, no entanto, houve diferenças entre as coletas.

As maiores variações e menores valores de taxa de fertilização ocorreram na 1ª coleta para os dois tratamentos, esses resultados podem estar vinculados as fêmeas, pois estava no início do ciclo reprodutivo, no entanto, as (2ª, 3ª e 4ª) coletas a fertilização obteve médias (<80%). resultados semelhantes foram encontrados por Gallo et al. (2022) onde avaliam o sêmen de *C. macropomum* ao longo do ciclo reprodutivo e obtiveram fertilização para as três primeiras coletas (< 78%). A fim de verificar a fertilização com fêmeas e machos alimentados com as mesmas dietas, não foi observado diferença de fertilização dentro de cada grupo de fêmeas, no entanto, quando observado comparando cada grupo, observou-se que as fêmeas do grupo controle ($81,61 \pm 15,25$) obtiveram melhores resultados em relação as fêmeas alimentadas com ração específica para reprodutores ($61,56 \pm 17,35$). Para o percentual de larvas normais durante o período reprodutivo foi satisfatória, no entanto, a 1ª coleta houve variação para os dois tratamentos, o que pode estar vinculado a fêmea, por ser o início do ciclo reprodutivo e a taxa de fertilização que também foi a coleta que teve menor taxa e maior variação. Gallo et al. (2022) avaliando o sêmen do *C. macropomum* no mesmo ciclo reprodutivo observaram baixa viabilidade de larvas no final do ciclo, os autores destacam que tal comportamento está vinculado as fêmeas já que a motilidade espermática estava acima de 90%. A motilidade espermática é um parâmetro indispensável a ser considerado na análise da qualidade do sêmen de peixes. Dessa forma, deve-se levar em consideração que é influenciada por vários fatores, como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise empregada e espécie estudada (MURGAS et al. 2011).

Dentre os parâmetros físico-químicos da água mensurados (oxigênio dissolvido, pH alcalinidade e amônia) todos permaneceram dentro dos valores considerados ótimos para o cultivo, e um fator que contribuiu para não ter variações durante o experimento foi a alcalinidade superior a 30 mgCaCO₃/L para os dois viveiros, segundo Kubitza, (2017) o recomendado para viveiros de reprodutores são valores acima de 30 mg de CaCO₃/L, águas com altos valores de carbonato de cálcio possuem maior estabilidade química e consequentemente vai reduzir a elevação do pH, evitando excesso de níveis de gás carbônico. O ganho de peso durante o período experimental para os dois tratamentos foram de $2,418 \pm 0,657$ (CRT) $2,18 \pm 0,728$ (REP), levando em consideração que esses animais estavam com a densidade de estocagem inferior ao recomendado, segundo Kubitza (2017)

a densidade de estocagem dos reprodutores não pode exceder (250g de reprodutores/m²) e no experimento foi utilizado a (210g de reprodutores/m²). Ressaltasse que esses animais estavam em condições ótimas de densidade, alimentação e qualidade de água durante o ciclo reprodutivo

Dessa forma, durante todo o período reprodutivo houve produção espermática, entretanto, o volume reduziu no decorrer das coletas, comportamento comum durante o ciclo reprodutivo, Segundo Murgas et al. (2011) baixa concentração espermática pode ser verificada quando ocorre aumento no volume seminal em peixes induzidos hormonalmente, no entanto, a 2ª coleta houve comportamento contrário, pois o tratamento CRT aumentou o volume e a concentração espermática, comportamento também observado em espécies como o *Brycon orbignyanus*, *Piaractus mesopotamicus* e o *Piaractus brachypomus* (VIVEIROS E GODINHO, 2008). Pires et al. (2017) coletaram sêmen de *C. macropomum* com coletas sucessivas e volume foi inferior ao encontrado nesse estudo. De acordo com Murgas et al. (2011) o volume é muito variável entre as diversas espécies e até mesmo na mesma espécie, por ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de coleta. O período de maior volume seminal foi na segunda coleta (janeiro) para ambos os tratamentos, o que pode estar relacionado com o pico reprodutivo da espécie conforme Vazzoler & Menezes (1992) destacam que o período reprodutivo dos Characiformes ocorre de novembro a março (período com maior índice de precipitação).

Estudos com tilápia encontraram menores valores das taxas de motilidade espermática e velocidades no tratamento contendo 50% de PB, indicando que elevados níveis proteicos podem causar prejuízos no desempenho reprodutivo (RIBEIRO 2016). Lenz et al. (2018) também avaliaram a qualidade espermática de *C. macropomum* durante o ciclo reprodutivo e obtiveram resultados semelhantes com o presente estudo. Pires et al. (2017) encontraram resultados diferentes ao encontrado nesse estudo, onde, realizaram três coletas sucessivas com *C. macropomum* no mesmo período reprodutivo (setembro a fevereiro) com os mesmos reprodutores, e obtiveram motilidade (<80%) e oscilação (<69%) semelhantes ao encontrado nesse estudo, no entanto, os valores de velocidade de linha reta velocidade curvilínea, velocidade de deslocamento e retilinearidade foram inferiores aos encontrados nesse estudo

De acordo com Volkoff, & London (2018) o desenvolvimento reprodutivo pode ser concluído se as condições forem ótimas, mas pode ser atrasado em condições não ótimas. Em casos de desnutrição reduz o volume e a concentração espermática, o que pode afetar negativamente o sucesso da fertilização, para tanto, é necessário que os reprodutores produzam gametas de qualidade, nesse processo o macho e a fêmea devem estar aptos, caso contrário pode prejudicar o sucesso da reprodução, no entanto, um fator de grande importância para a fertilização é a dose inseminante nesse estudo utilizou-se 102.332 espermatozoides por ovócito (LEITE et al. 2013), no entanto, a fertilização está diretamente relacionada a motilidade, e alterações morfológicas podem reduzir a movimentação dos espermatozoides, interferindo diretamente no momento da fertilização (COSSON, et al. 1999).

Neste sentido, Lipídios, proteínas e carboidratos são nutrientes metabolizados pelo organismo para produzir a energia necessária para diversos processos fisiológicos e atividades físicas. Nos peixes, existem diferenças consideráveis entre espécies nas necessidades destes nutrientes e na capacidade de utilizá-los, estando associadas aos hábitos alimentares, que podem ser classificados como carnívoros, herbívoros e onívoros. As espécies carnívoras utilizam proteínas e lipídios da dieta de maneira muito eficiente para obter energia, mas não são eficientes no uso de carboidratos na dieta. Por outro lado, herbívoros e onívoros podem usar carboidratos e exigir menos proteína na dieta do que algumas espécies carnívoras (VOLKOFF & LONDON 2018). Informações relevantes com o presente estudo, o *C. macropomum* é uma espécie onívora, e os resultados para os tratamentos controle (28%PB) e reprodutores (36%PB) obtidos, o controle foram superiores ao reprodutores, o que pode estar atrelado ao hábito alimentar da espécie, onde uma ração com menor teor de proteína é suficiente para obter resultados satisfatórios de produção espermática em escala comercial.

Para tanto, Izquierdo et al. (2001) destacam que formular dietas específica para reprodutores aumentariam os custos de produção de rações, que seriam ainda maiores se fossem desenvolvidas para cada espécie. No entanto, para formular uma dieta para espécies específicas é necessário o estudo e comportamento principalmente no período reprodutivo, identificar todas as exigências para manter maior potencial durante esse período, no entanto, não é o que acontece na prática, pois as rações específicas para reprodutores disponíveis no mercado não são

formuladas para uma espécie, mas para os reprodutores no geral. Dessa forma, no presente estudo, quando comparamos o valor das rações utilizadas e o desempenho dos reprodutores é possível observar grande diferença. Observa-se que a ração específica para reprodutores na alimentação de machos de *C. macropomum* obteve custo superior e produção e qualidade inferior ao tratamento controle, nesse sentido, o produtor pode alimentar seus reprodutores com uma ração de menor custo que irá suprir as necessidades reprodutivas, com gametas de qualidade, e consequentemente aumentar a viabilidade econômica da produção de larvas e juvenis de *C. macropomum*.

6-Conclusões

Machos de *C. macropomum* alimentados com ração comercial utilizada para engorda (28% de PB) apresentam maior produção, qualidade e viabilidade espermática, quando comparados com machos alimentados com ração específica para reprodutores (36% de PB) suplementada com minerais e vitaminas.

7-Referências

- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. fertility sterility, 1, 176-177.
- Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C. And Suquet M. 1999. Regulation of fish sperm axonemal wave parameters by ionic factors. In: The gamete male: from basic knowledge to clinical applications. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.038>
- Gallo, M.J., Rodrigues, B.R., Fornari, C.D., Povh, A.J., Ribeiro, P.R., Zhang, T., Freitas, R.D., Teixeira, S.N., Streit Junior, DP., 2022. Does semen quality of *Colossoma macropomum* change the productivity of larvae during the reproductive period? Aquaculture 558, 738376, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738376>.
- Gomes, L.C.G. Simões, L.N., Araujo, Lima, C.A.R.M., 2013. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: Ed. UFSM.
- Hilsdorf, A. W. S., Hallerman, E., Valladao, G. M. R., Zaminhan-Hassemer, M., Hashimoto, D. T., Dairiki, J. K., CYRINO., J. E. P., 2022. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. Reviews in Aquaculture, 14(2), 993-1027. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>

- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, A.G.J., 2001. Tacon, Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00581-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6).
- Kubtza, F., 2017. Reprodução, larvivultura e produção de alevinos de peixes nativos. Editota kubtza.
- Leite, L.V., Melo, M.A.P., Oliveira, F.C.E., Campello, J.F. Nunes, C.S.B., 2013. Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.2, p.421-429.
- Lemanova, N.A., Sakum, O.F., 1975. Metodisceskoe posibile pogor monalnoistimulacji proizvoditielei Karpa pré rannom polucenii licinok. *Izvestiya Gosudartvennogo Nauchno Isseledivatel Skogo Instituta*, v.88, p. 3- 23.
- Lenz, R. D., Victorio, M.A., Lima, C.M.C., Prado, F.T., Paula, G.F., Meirinhos, G.L.M., 2018. Arnhold.E Semen characterization of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the breeding season, *Revista de Ciências Agroveterinárias*, <https://doi.org/10.5965/223811711732018603>.
- Murgas, L.D., Felizardo, V.O., Ferreira., M.R. Andrade., G.C., 2011. Importance of evaluation of reproductive parameters in native fish, *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.186-191.
- Novoa, D., Ramos, F., 1982. Aspectos gencrales sobre la biologia de las principales espécies de peces de importância comercial en el rio Orinoco. Los recursos pesqueros del río Orinoco y su explotación. *CVG*, 107-128.
- PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura, 2022.
- Pires, B.L., Corrêa, A.R., Sanches, A.E., Romagosa, E., Silva, G.T., Rech, S., Streit, P.D., Povh, A.J., 2018. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Animal Reproduction Science* 196, 138-142, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.006>.
- Pires, L.B., Sanches, E.A., Romagosa, E., Corrêa Filho, R.A.C., Streit Jr., D.P, Nass, R.A.R, Povh, J.A., 2017. Characteristics of semen *Colossoma macropomum* de three successive sample collections in the same reproductive cycle. *Aquaculture Research*. 48, 1–7. <https://doi.org/10.1111/are.13329>
- Poupard, G.P., Paxion, C., Cosson, J., 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture* 60, p.317-328. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00301-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00301-3)
- Ribeiro, M.J.P 2016. Dietas práticas para reprodutores de tilápia-do-nilo.
- Romagosa, E., Bittencourt, F., Boscolo, W.R, (2016). Nutrição e alimentação de reprodutores. *NUTRIAQUA*, cap 8, 167-184.
- Sanches, E.A., Caneppele, D., R. M., Okawara, R.Y., Damasceno, D..Z., Bombardelli, R.A., Romagosa, E., 2016. Inseminating dose and water volume applied to the artificial fertilization of *Steindachneridion parahybae* (*Steindachner*, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae. *Neotropical Ichthyology*. 14. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140158>.

- Streit Junior, D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P. et al., 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* 7, 157-162.
- Vazzoler, A. Menezes, N.A., 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, *Ostariophysi*). *Revista Brasileira Biologia* 52, 627-640.
- Viveiros, A.T.M, Godinho, HP., 2008. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 35, 137-150.
- Volkoff, H., London, S., 2018. Nutrition and reproduction in fish. *Encyclopedia of reproduction*, 743-748. Doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20624-9
- Wilson-Leedy, J. G., Ingermann, R. L. 2007. Development of a novel CASA system based on open sourceopen-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67, 661-672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>
- Wirtz S, Steinmann P., 2006. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis*. *Fish Biologia* 68,1896-1902. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01065.x>
- Zaniboni Filho, E.,Weingartner, M., 2007. Reprodução induzida em peixes migratórios. *Reprodução Animal*. 31, 367–373.