

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM
TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*, LINNAEUS, 1757), REVERTIDAS
COM RAÇÕES CONTENDO DIFERENTES GRANULOMETRIAS E DE
DIFERENTES IDADES**

Lilian Cristina Makino
Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Dezembro de 2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM
TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*, LINNAEUS, 1757), REVERTIDAS
COM RAÇÕES CONTENDO DIFERENTES GRANULOMETRIAS E DE
DIFERENTES IDADES**

Aluna: Lilian Cristina Makino

Orientadora: Prof^a. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Dissertação apresentada ao Centro de
Aqüicultura da UNESP, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Aqüicultura – Área de
Concentração em Aqüicultura.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Dezembro de 2005

“Todas as grandes jornadas iniciaram-se com um único passo.”

(Lao – Tsé, século XIII)

*“O gado morre, os parentes morrem, todo homem é mortal. Só uma
coisa não morre: a glória dos grandes feitos.”*

(antigo poema islandês, século VI)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, tios e avós por apoiarem e acreditarem sempre em meus “loucos” ideais e sonhos com fé e coragem!

Para minha orientadora, Prof^ª. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi por realmente ter acreditado e confiado em minha pessoa e em minha capacidade profissional.

E, finalmente e com grande ternura ao meu amigo - amor Márcio, por ser uma segura e calma fonte de força, alento e estabilidade nos grandes momentos da minha vida após conhecê-lo.

“Obrigada, ó Senhor, por todas as dádivas e graças que estou recebendo, que já recebi e que receberei de Ti.”

AGRADECIMENTOS

Ao Pai, meu Criador, por me acompanhar, proteger e iluminar meu caminho, sempre me dando gratuitamente forças para seguir em frente, especialmente quando as dificuldades pareciam ser intransponíveis.

À Prof^ª. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi primeiramente pela concessão de uma oportunidade logo que cheguei ao Departamento de Morfologia e de ter acreditado em meu potencial e capacidade de trabalho, mesmo sendo-lhe eu uma completa desconhecida. Acrescentando sua paciência com minha notória inexperiência, sua confiança em meu trabalho, orientação, dedicação e ensinamentos preciosos que possibilitaram minha evolução profissional, intelectual e espiritual. Muito Obrigada, Prof^ª. Laura!!!

Aos membros da Banca Examinadora Professoras Dra. Heid Sueli Leme dos Santos e Dra. Elizabeth Romagosa pelas valiosas sugestões apresentadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao senhor Orandi Mateus, técnico do Laboratório de Histologia no Departamento de Morfologia, Fisiologia e Anatomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, pelas experiências, conselhos, alegres conversas, muitos ensinamentos profissionais e especialmente pessoais, sem contudo esquecer os serviços profissionais prestados, essenciais para a obtenção deste trabalho.

Ao CAUNESP e em especial ao Setor de Tilapicultura, pela oportunidade de realização de estágio extra-curricular onde pude adquirir conhecimentos básicos e fundamentais sobre peixes para posteriormente fazer parte do Curso de Mestrado.

A todos os professores os quais tive o prazer e a sorte de conhecer quando ministraram disciplinas junto ao Curso de Pós-Graduação do CAUNESP.

À Dra. Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein pela concessão dos peixes, das instalações e do suporte técnico necessários à realização do presente trabalho.

Ao Departamento de Morfologia, Fisiologia e Anatomia (DMFA) da FCAV – UNESP pela feliz e auspiciosa acolhida, minha “segunda casa” da qual sempre me lembrarei com bastante saudade e carinho.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros por ter ajudado e muito com o delineamento estatístico deste trabalho, colaborando para a maior credibilidade dos resultados obtidos. E um agradecimento especial pela paciência com que explicava e ensinava os segredos da Matemática aplicáveis neste trabalho. Muito Obrigada!

Ao CNPq pelo apoio financeiro, absolutamente necessário à realização e ao prosseguimento da Pós-Graduação.

Ao senhor Márcio Alves dos Santos que, na qualidade de técnico do Setor de Tilapicultura sempre aportou soluções para quase todos os problemas que surgiram, os quais não foram poucos.

Aos meus tios, Douglas e Leiko, por me acolherem com muito amor e carinho no seio protetor de seu lar e nos cuidados a mim dirigidos.

Um agradecimento especial aos “amigos de jornada” e quem sabe para toda a vida: Verônica, Luciana, Camila, Francine, Maria do Carmo, Fernanda, Érico, Érika, Wanessa, Eliana, Bel (Maria Isabel) e a todos aqueles que deixaram lembranças na minha vida e que contribuíram de algum modo para o meu progresso pessoal e profissional.

Sem esquecer minha grande amiga Margaret Saiki, de Campinas, por todos os seus sábios conselhos, companhia, troca de experiências profissionais e de vida que muito me ajudaram nos momentos mais difíceis desta jornada (que não foram poucos) e que estimularam-me a continuar sempre em frente, pois não existem desgraças ou infortúnios que durem para sempre e tudo tem um fim. Muito Obrigada, minha amiga Margie!!!!

Muito Obrigada a todos, com todo o meu coração!!!!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
CAPITULO I	
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO II	
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
Biometria.....	17
Métodos de Sexagem.....	19
CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos tratamentos (granulometrias).....	15
Tabela 2. Composição da ração experimental.....	16
Tabela 3. Estatísticas F e Coeficientes de Variação (CV) obtidas na análise da variância para as variáveis Peso (g) e Comprimento Total (mm).....	17
Tabela 4. Valores médios obtidos para as variáveis Peso (g) e Comprimento Total (mm) referentes aos tratamentos recebidos (granulometrias: 0,25; 0,35 e 0,50 mm) aos 30, 60 e 90 dias de idade.....	17

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Papila urogenital e orifício anal de tilápia do Nilo macho com 60 dias de idade (seta grossa). A seta fina indica o orifício anal (visão natural).....	23
Figura 2. Papila urogenital e orifício anal de tilápia do Nilo macho com 30 dias de idade (seta grossa: papila e seta fina: orifício anal). Aumento: 10x (lupa).....	23
Figura 3. Fotografia das gônadas de tilápia do Nilo com 30 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 40x. Sexo: Indiferenciado. TCD: tecido conjuntivo denso.....	23
Figura 4. Fotografia de testículos de tilápia do Nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 40x. TCD: tecido conjuntivo denso. LS: lóbulos seminíferos.....	23
Figura 5. Fotografia de testículos de tilápia do Nilo com 90 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 10x. LS: lóbulos seminíferos e TCD: tecido conjuntivo denso.....	24
Figura 6. Fotografia de ovários de tilápia do Nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 20x. OV: ovócitos.....	24
Figura 7. Fotografia das gônadas de tilápia do Nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 20x. Sexo: Intersexo. TCD: tecido conjuntivo denso; OV: de ovócitos e LS: lóbulos seminíferos.....	24
Figura 8. Fotomicrografia das gônadas de tilápia do Nilo com 30 dias de idade. Obj= 40x (HE). Sexo: Indiferenciado. TCD: tecido conjuntivo denso e CInd: células germinativas indiferenciadas (gônias).....	24

Página

Figura 9. Fotomicrografia de testículos de tilápia do Nilo com 60 dias de idade. Obj= 40x (HE). LS: lóbulos seminíferos e TCD: tecido conjuntivo denso.....	25
Figura 10. Fotomicrografia de testículos de tilápia do Nilo com 90 dias de idade. Obj= 20x (HE). LS: lóbulos seminíferos e SPTZ: espermatozóides.....	25
Figura 11. Fotomicrografia de ovários de tilápia do Nilo com 60 dias de idade. Obj= 40x (HE). OV: ovócitos.....	25
Figura 12. Fotomicrografia de ovários de tilápia do Nilo com 90 dias de idade. Obj= 5x (HE). OV: ovócitos.....	25

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Popma e Lovshin (1996) dividiram as tilápias de importância comercial em três grupos taxonômicos, de acordo com seu comportamento reprodutivo: *Tilapia spp.*, que incubam seus ovos em substratos; *Oreochromis spp.*, grupo no qual as fêmeas incubam os ovos dentro da cavidade bucal e *Sarotherodon spp.*, grupo em que machos ou ambos os sexos incubam os ovos na boca.

As tilápias, em geral, são caracterizadas por apresentarem escamas grandes, pouco brilhantes, nítidas listras verticais na nadadeira caudal, manchas esbranquiçadas no ventre e coloração prateada no dorso. Adaptam-se melhor em regiões tropicais e subtropicais, onde as temperaturas da água variam entre 18 e 28°C. Águas com temperaturas abaixo de 12°C e acima de 42°C são letais para estes peixes (Lund e Figueira, 1989).

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foi uma das primeiras espécies utilizadas pelo homem na alimentação. Ilustrações em ruínas egípcias sugerem que estes peixes foram criados há 3000 anos e chamados de “peixes de São Pedro” em alusão à passagem bíblica sobre o peixe que alimentou as multidões. Atualmente é a segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo, constituindo-se em uma relevante fonte de renda e de proteína animal para o consumo humano, perdendo apenas para as carpas (Popma e Masser, 1999; FAO, 2004; Suganuma, 2004).

A produção da tilápia está amplamente distribuída no mundo. Segundo a FAO (1999) e Fitzsimmons (2000) é cultivada em 85 países, especialmente no meio-leste e leste da África, Indonésia, América Latina, Ilhas do Caribe, Alemanha, Bélgica, Espanha, Canadá, Coreia, Japão e Estados Unidos da América. É uma espécie nativa da África (Fitzsimmons, 2000), que foi introduzida no Brasil, em 1971, no Ceará, pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), procedentes da Costa do Marfim (África) (Leonhardt, 1997 e Neumann, 2004).

O Brasil possui o potencial de ser o maior abastecedor de tilápias para os Estados Unidos da América e outros países, devido ao clima favorável e abundantes recursos hídricos (Watanabe *et al.*, 2002). Além disso, a produção de tilápias, praticamente insignificante no princípio da década de 90, é hoje estimada no Brasil entre 40 a 50 mil toneladas por ano (Kubitza, 2003).

A tilápia nilótica apresenta muitos atributos para ser criada em pisciculturas, tais como: rusticidade (Maclean *et al.*, 2002), precocidade sexual (Pezzato *et al.*, 1986), alta resistência a doenças e ao manejo intensivo (Koberstein, 2001), tolerância à baixa qualidade de água (Popma e Masser, 1999), além de oferecer carne com boas qualidades organolépticas, baixos teores de gordura e ausência de mioespinhas em forma de “Y” no filé, sendo também bastante apreciada em atividades de pesca esportiva (“pesque-pagues”) (Meurer *et al.*, 2002; Meurer *et al.*, 2003).

Hábito Alimentar

A tilápia nilótica possui grande capacidade adaptativa em condições de cultivo, especialmente em relação ao aspecto nutricional, apresentando um amplo espectro alimentar (Carvalho e Foresti, 1996). Segundo Koberstein (2004) o hábito alimentar das tilápias em meio natural é fitoplanctófago, porém o hábito onívoro em condições naturais pode ser observado com frequência, com a ingestão de uma grande variedade de alimentos, incluindo plâncton, folhas verdes suculentas, organismos bênticos, pequenos invertebrados aquáticos, detritos e matéria orgânica em decomposição.

A utilização de dietas artificiais como única fonte de alimento durante a fase de larvicultura para a maioria das espécies de peixes, não apresenta bons resultados devido à imaturidade do aparelho digestório das larvas (Hayashi *et al.*, 1999). Contudo, para a tilápia do Nilo tal fato possui pouca relevância, pois mesmo no período larval esta já se alimenta com ração e se desenvolve bem, apresentando bons índices de crescimento e ganho de peso (Meurer *et al.*, 2002), tornando possível nesta fase de vida, a reversão do sexo pela adição de um hormônio masculinizante (17 α -metilttestosterona) à ração, a qual é fornecida aos peixes durante o primeiro mês de vida (Phelps *et al.*, 1995; Meurer *et al.*, 2003).

De acordo com Kubitzka (1997) a vantagem da utilização de larvas de tilápia do Nilo sobre as de outras espécies de peixes é que estas ao final da absorção do saco vitelino, possuem o trato digestório completo, com capacidade de digestão enzimática, apresentando potencial para a utilização de rações artificiais. Segundo os trabalhos de Pezzato *et al.* (2002); Meurer *et al.* (2003 e 2005); Bombardelli *et al.* (2004) e Moya *et al.* (2005), a melhor forma de se alimentar tilápias do Nilo nas fases larval e juvenil é com ração farelada, apresentando melhores índices de crescimento e ganho de biomassa, quando alimentadas com ração de diâmetros entre 0,35 e 0,50 mm.

Reprodução

Carvalho e Foresti (1996) afirmaram que a tilápia do Nilo possui uma grande capacidade adaptativa em condições de criação, principalmente no que se refere às suas características reprodutivas, tais como: altas taxas de fecundidade, maturação sexual precoce e cuidados com a prole. Entretanto, segundo Leonhardt (1997); Wassermann e Afonso (2002), tais características atuam como fatores limitantes para o cultivo da espécie, pois com 20 a 30 gramas de peso vivo e cerca de 4 a 5 meses após a eclosão, com adequadas condições de manejo e sanidade, atingem a maturidade sexual. A rápida proliferação, associada à alta sobrevivência da prole e aos cuidados parentais, faz com que a espécie tenda a superpovoar os ambientes de criação, passando a competir com os outros peixes por espaço e alimentos disponíveis (Shelton *et al.*, 1981; Popma e Green, 1990; Carvalho e Foresti, 1996).

As fêmeas desta espécie apresentam ovários em maturação e maduros, tal como é visto na maioria dos teleósteos (Nagahama, 1983), constituídos por ovogônias e ovócitos envoltos por células foliculares, suportadas por tecido conjuntivo fibroso (Carvalho e Foresti, 1996). A desova é do tipo parcelada assincrônica (Vazzoler, 1996), e dependendo do grau de maturação sexual do peixe, os ovários podem exibir ovócitos em vários graus de desenvolvimento, podendo ser classificados em ovogônias e ovócito I (fase de cromatina-nucléolo), ovócito II (fase perinucleolar inicial), ovócito III (fase perinucleolar avançada), ovócito IV (fase de vesícula vitelínica), ovócito V (fase vitelogênica), ovócito VI (maduro) e ovócito em degeneração (Babiker e Ibrahim, 1979; Carvalho e Foresti, 1996; Msiska, 2002).

Nos machos, a organização testicular das tilápias do Nilo é semelhante em quase todos os peixes teleósteos, sendo basicamente constituídos por numerosos lóbulos seminíferos (Babiker e Ibrahim, 1979). Cada lóbulo seminífero é formado por cistos que contém dois tipos de linhagem celular: germinativas e somáticas distintas, na periferia dos lóbulos (Nagahama, 1983). Em geral todas as células da linhagem germinativa de um mesmo cisto estão na mesma fase de desenvolvimento durante o processo de maturação do testículo (Nagahama, 1983; Carvalho e Foresti, 1996; Paller e Guerrero III, 2001).

Produção de populações monossexuais masculinas

A fim de solucionar os problemas inerentes à maturidade sexual precoce da tilápia do Nilo, foram estudadas várias técnicas visando a obtenção de populações

monossexuais masculinas, comumente utilizadas na tilapicultura. Grande parte das criações de tilápias no Brasil e no mundo faz uso de populações monossexo macho, por estes apresentarem maiores índices de crescimento e ganho de peso (Tachibana *et al.*, 2004), pois as fêmeas utilizam grande parte das reservas energéticas para o desenvolvimento gonadal e reprodução, além de não se alimentarem durante a incubação oral dos ovos e das larvas (Gale *et al.*, 1999; Beardmore *et al.*, 2001; Carrillo, 2004).

As formas de obtenção de populações monossexuais na criação de tilápias nilóticas são muito variadas, indo desde a avaliação visual da papila urogenital (Afonso e Lebouté, 1993), passando pela indução de reversão do sexo mediante o uso de hormônios esteróides androgênicos (Popma e Lovshin, 1996; Gale *et al.*, 1999; Beardmore *et al.*, 2001) e até técnicas de manipulação genética nos cromossomos sexuais (Carrillo, 2004) para a separação dos sexos.

Dentre os vários métodos disponíveis para controlar a reprodução precoce, com o intuito de prevenção contra a conseqüente superpopulação dos tanques na criação de tilápias nilóticas, o mais utilizado atualmente é a indução da reversão sexual com o uso de hormônios androgênicos. A técnica de indução hormonal de peixes com andrógenos consiste na reversão de fêmeas em machos pelo uso de hormônios esteróides masculinizantes (Popma e Green, 1990; Gale *et al.*, 1999; Tachibana *et al.*, 2004). Este fenômeno só é possível em espécies gonocóricas indiferenciadas, como parece ser o caso das tilápias (Rowell *et al.*, 2002). Neste caso as gônadas se desenvolvem primeiramente como estruturas semelhantes a ovários, e posteriormente, metade dos indivíduos da população desenvolvem-se em machos e a outra metade em fêmeas (Yamazaki, 1983).

O processo de reversão sexual em peixes deve ter início antes que o tecido gonadal das fêmeas tenha se diferenciado em ovários (Yamamoto, 1969; Nakamura *et al.*, 1998). Green e Teichert-Coddington (1993) e Neumann (2004) sugeriram que as larvas de tilápias com comprimento de 9 a 11 mm estão adequadas para a masculinização por ainda serem sexualmente indiferenciadas, no que se refere aos aspectos morfológicos. De acordo com os autores, a administração de andrógenos nestes peixes por um período de três a quatro semanas resulta em uma população com 97 a 100% de machos fenotípicos. Segundo Ribeiro (1996) o momento exato em que o tratamento hormonal possa ser interrompido ainda não é definido.

Koberstein (2004) preconizou, para a reversão sexual de tilápia do Nilo, 30 dias de administração do hormônio 17 α -metiltestosterona na dosagem de 60 mg, quando incorporado à ração. Contudo, há outros métodos de administração do hormônio androgênico, incluindo injeção intramuscular do fármaco e a imersão das larvas em banhos contendo hormônio. Devido à natureza não invasiva da imersão das larvas em banhos de hormônios e da adição deste à ração, estes dois métodos são os mais praticados na aqüicultura atual (Gale *et al.*, 1999).

Carvalho e Foresti (1996) afirmaram que, durante a reversão sexual de tilápias, tempos mais longos de administração hormonal (maior que 60 dias) e em presença de doses mais elevadas de hormônio (100 mg) pode ocorrer o “efeito paradoxal feminilizante”, onde a enzima aromatase converte o excesso de andrógeno (masculinizante) em estrógeno (feminilizante), resultando em indivíduos geneticamente machos e fenotipicamente (fisiologicamente) fêmeas ou até hermafroditas, acrescentando ainda que, o efeito paradoxal é provavelmente mais de cunho farmacológico do que fisiológico (Van Den Hurk *et al.*, 1989; Gannam e Lovell, 1991; Carvalho e Foresti, 1996). De acordo com Piferrer e Donaldson (1991) este evento pode ser minimizado pelo uso de andrógenos não aromatizáveis. Os autores concordaram que o hormônio metiltestosterona, embora aromatizável, é o agente masculinizante mais comumente empregado.

Técnicas de sexagem

As técnicas de sexagem mais utilizadas atualmente para tilápias do Nilo são:

Exame macroscópico da papila urogenital

A tilápia do Nilo é sexualmente dimórfica, ou seja, machos e fêmeas possuem características sexuais secundárias, permitindo a diferenciação do sexo pela presença da papila urogenital, até mesmo quando o peixe é pequeno, com comprimentos menores que 3,0 cm e pesando menos que 0,5 g (Afonso e Lebouté, 1993). A técnica da sexagem manual consiste na observação visual da papila urogenital e no descarte das fêmeas, contudo Popma e Lovshin (1996); Beardmore *et al.* (2001) e Carrillo (2004) afirmaram que tal técnica tem suas limitações, pois não é 100 % eficaz, exigindo mão-de-obra especializada, embora possa haver uma grande probabilidade de erro no momento da seleção, além de estressar os peixes. Desprez *et al.* (2003) afirmaram que este método está em processo de desuso nas criações comerciais.

Exame microscópico das gônadas pela coloração com acetato-carmim

Guerrero e Shelton (1974) postularam que mesmo que o sexo fenotípico esteja internamente definido, há necessidade de se determinar o sexo com o exame microscópico das gônadas, devido à alta incidência de fêmeas que podem ocorrer após a reversão sexual incompleta (Neumann, 2004). Vários trabalhos foram realizados utilizando-se o método de sexagem corando-se as gônadas das tilápias com acetato-carmim (Guerrero e Shelton, 1974; Wassermann e Afonso, 2002; Bombardelli *et al.*, 2004; Neumann, 2004; Tachibana *et al.*, 2004), embora não tenham sido descritos os aspectos histológicos das gônadas e nem terem sido realizadas avaliações comparativas quanto à sua eficiência frente aos outros métodos testados. Wassermann e Afonso (2002) recomendaram tal método como uma alternativa na redução de custos, visto este ser menos dispendioso e de mais simples execução que a análise das gônadas na rotina histológica.

Cavalcante *et al.* (2004) desenvolveram uma técnica alternativa ao acetato-carmim na determinação sexual em juvenis de tilápias do Nilo, utilizando como corante a anilina 0,5 %, mostrando resultados semelhantes ao acetato-carmim.

Exame microscópico das gônadas pela rotina histológica

Quanto ao processo de sexagem utilizando como ferramenta a histologia das gônadas, há relatos em tilápias do Nilo de Babiker e Ibrahim (1979); Carvalho e Foresti (1996); Coward e Bromage (1999); Paller e Guerrero III (2001) e em tilápia mossambica (*O. mossambicus*) por Chmilevskyi (1995). Msiska (2002) também utilizou o método ao estudar a maturação gonadal em fêmeas e machos de *Oreochromis karongae*.

Os exames microscópicos necessitam de reagentes, corantes e de equipamento para análise, tornando difícil e onerosa a sua aplicação para o piscicultor.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. O. B.; LEBOUTE, E. M. Método para a sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 4. 1993, Porto Alegre, Brasil, *Anais...*Porto Alegre: UFRGS, p. 100 – 103, 1993.

CARRILLO, M. A. *Indução à tetraploidia em tilápia nilótica, Oreochromis niloticus utilizando-se choque térmico*. 2004. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BABIKER, M. M.; IBRAHIM, H. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. *J. Fish Biol.*, Oxford – England, v. 14, p. 437 – 448, 1979.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, J. A.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, p. 283 – 301, 2001.

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; FORNARI, D. C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por banhos de imersão e o andrógeno dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 209 - 215, 2004.

CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão de sexo em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* TREWAVAS, 1983, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos, v. 56, n. 2, p. 249 - 262, 1996.

CAVALCANTE, J. M. M.; FARIAS, J. O.; CAMPELLO, C. C. C.; CARVALHO, M. A. M.; GONDIM, J. M. Avaliação de método alternativo na determinação da proporção sexual de alevinos de tilápia por esmagamento gonadal em lâmina/lamínula em comparação ao método do acetato-carmim. In: IX SEMANA UNIVERSITÁRIA – XIII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2004, Fortaleza. *Anais...*Fortaleza; UECE, 2004. CD-ROM

CHMILEVSKYI, D. A. Effect of reduced temperature on oogenesis of the mouthbrooder, *Oreochromis mossambicus*, 2. Effect on fish twenty – two days after hatching. *Journal of Ichthyology*, Alabama, v. 35, n. 1, p. 72 – 80, 1995.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Spawning frequency, fecundity, egg size and ovarian histology in groups of *Tilapia zilli* maintained upon two distinct food ration sizes from first-feeding to sexual maturity. *Aquat. Living Resour.*, Stirling - Scotland, v. 12, n. 1, p. 11 –22, 1999.

DESPREZ, D.; GÉRAZ, E.; HOAREAU, C. M.; BOSCH, P.; BAROILLER, J. F. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 216, p. 55 – 65, 2003.

FAO, Aquaculture Production Statistics 1988 – 1997. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome – Italy, 203p., 1999.

FAO, World Aquaculture Production of fish, crustacea, molluscus, etc. by principal species in 2000. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em <http://www.fao.org>, 2002 (Acesso em: setembro de 2004).

FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. In: *Tilapia Aquaculture in the America*, vol. 2, p. 252 – 264 (Costa Pierce, B. A. and J. E. Rakocy, Eds.). *World Aquaculture Society*, Louisiana, 2000.

GALE, W. L.; FITZPATRICK, M. S.; LUCERO, M. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 178, p. 349 – 357, 1999.

GANNAM, A. L.; LOVELL, R. T. Effects of feeding 17-alpha-methyltestosterone, 11-ketotestosterone, 17-beta-estradiol and 3, 5, 3 – triiodothyronine to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 92, p. 377 – 388, 1991.

GREEN, B. W.; TEICHERT-CODDINGTON, D. R. Production of *Oreochromis niloticus* fry hormonal sex reversal in relation to water temperature. *Journal of Applied Ichthyology*, Oxford, v. 9, p. 230 – 236, 1993.

GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An acetate – carmin squash technique for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish – Culturist*, Alabama, v. 36, p. 56, 1974.

HAYASHI, C. BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 21, n. 3, p. 733 – 737, 1999.

KOBERSTEIN, T. C. R. D. Técnicas de cultivo de tilápias (*Apostila*). Jaboticabal, 15 p., 2001.

KOBERSTEIN, T. C. R. D. Técnicas de monossexo In: *Criação racional de tilápias (Apostila)*. Jaboticabal, 81 p., 2004.

KUBITZA, F. *Nutrição e alimentação dos peixes*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 74p., 1997.

KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro. Março/Abril, p. 25 – 35, 2003.

LEONHARDT, J. H. *Efeitos da reversão sexual em tilápia do Nilo Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1757)*. 1997. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

LUND, V. X.; FIGUEIRA, M. L. O. *Criação de tilápias*. São Paulo: Livraria Nobel, 63 p., 1989.

MACLEAN, N.; RAHMAN, M. A.; SOHM, F.; HWANG, G.; IYENGAR, A.; AYAD, H.; SMITH, A.; FARAHMAND, H. Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene*, Amsterdam, v. 295, p. 265 – 277, 2002.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 566 – 573, 2002.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 262 – 267, 2003.

MEURER, F. *et al.* Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 81 – 85, 2005.

MOYA, C. F.; NAKAGHI, L. S. O.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; MALHEIROS, E. B.; ZAIDEN, S. F. Avaliação histológica do desenvolvimento bucal e sua cronologia para testar a eficiência de diferentes granulometrias da ração no desempenho de larvas de tilápias do Nilo. *Acta Scientiarum* (artigo no prelo), Maringá, 2005.

MSISKA, O. V. The histology of mature gonads of *Oreochromis* (Nyasalapia) *karongae* (Trewavas). *Afr. J. Ecol.*, Namíbia, v. 40, p. 164 – 171, 2002.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology teleost gonads. In: *W. Hoar and D. P. Randal, Fish Physiology*, Ed. Academic Press Inc., New York, v. IX, p. 223-275, 1983.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X. T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology*, New York, v. 281, p. 362 – 372, 1998.

NEUMANN, E. *Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia Oreochromis niloticus e uma híbrida Oreochromis sp.* Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 63 p., 2004.

PALLER, V. G. V.; GUERRERO III, R. D. Histological effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation of *Oreochromis niloticus* L. fry. *Asia Life Sciences*, Philippines, v. 10, n. 1, p. 55 – 68, 2001.

PEZZATO, L. E.; PACKER, I. U.; FORESTI, F.; FURLAN, L. R. Ação de hormônios sexuais sobre larvas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual, mortalidade e frequência de reversão. In: V-SIMBRAQ – SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 1986, Cuiabá. *Anais...* Cuiabá, 1986. p. 63 – 69.

PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; FURUYA, W. M.; PINTO, L. G. Q.; BARROS, M. M.; ROSA, G. J. M. Diâmetro do ingrediente e a digestibilidade aparente de rações por duas espécies de peixes tropicais. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 4, p. 901 – 907, 2002.

PHELPS, R. P.; SLAZAR, G. C.; ABE, V. Sex reversal and nursery growth of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*, L.), free – swimming in earthen ponds. *Aquaculture Research*, Oxford, n. 26, p. 293 – 295, 1995.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Dosage dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, v. 9, p. 145 – 150, 1991.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Reversão sexual de tilápias em tanques de terra. In: *Manual de produção em aqüicultura*. Flórida, University Auburn, 52 p., 1990.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. Worldwide prospects for commercial production of tilapia. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. *Research and Development*, Auburn: Auburn University, Alabama. Series n. 41, 23p., 1996.

POPMA, T. J.; MASSER, M. Tilapia life story and biology. *SRAC Publication*, Mississippi State University, n. 283, 1999.

RIBEIRO, M. A. G. Reversão sexual de tilápias. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro. Setembro/Outubro, p. 14 – 18, 1996.

ROWELL, C. B.; WATTS, S. A.; WIBBLES, T.; HINES, G. A.; MAIR, G. Androgen and strogen metabolism during sex differentiation in mono-Sex populations of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology*, <http://www.idealibrary.com>, v. 125, p. 151 – 162, 2002.

SHELTON, W. L.; GUERRERO, D. R.; MACIAS, J. L. Factors affecting androgen sex reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 59 – 65, 1981.

SUGANUMA, C. H. *Caracterização de estoques de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) através do uso de microssatélites*. 2004. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 46 p., 2004.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305 – 311, 2004.

VAN DEN HURK, R.; RICHTER, C. J. J.; JANSSEN-DOMERHOLT. Effects of 17-alpha-methyltestosterone on gonadal differentiation in the african catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 83, p. 179 – 191, 1989.

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

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validação da técnica do acetato-carmim para avaliar o sexo de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 133 – 139, 2002.

WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production systems in the Americas: Technological Advances, Trends and Challenges. *Reviews in Fisheries Science*, Boca Raton, v. 10, p. 465 – 468, 2002.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Editors). *Fish Physiology*. V. III, New York: Academic Press, p. 117 – 175, 1969.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 33, p. 329 – 354, 1983.

CAPÍTULO II

**Eficiência dos métodos de identificação do sexo em tilápias (*Oreochromis niloticus*)
revertidas e alimentadas com dietas de diferentes granulometrias aos 30, 60 e 90
dias de idade**

CAPÍTULO II

Eficiência dos métodos de identificação do sexo em tilápias (*Oreochromis niloticus*) revertidas e alimentadas com dietas de diferentes granulometrias aos 30, 60 e 90 dias de idade

RESUMO

O trabalho avaliou três métodos de sexagem em tilápias do Nilo, nas idades de 30, 60 e 90 dias, que foram revertidas mediante a administração do andrógeno 17 α -metiltestosterona incorporado às rações de diferentes granulometrias (0,25; 0,35 e 0,50 mm) na dosagem de 60 mg/kg de ração. Para os parâmetros biométricos de peso e comprimento total utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em parcelas subdivididas, três tratamentos e três repetições, sendo parcelas as três granulometrias e subparcelas as três idades. Ao término do estudo, os peixes alimentados com as granulometrias 0,35 e 0,25 mm, respectivamente, obtiveram os melhores resultados para peso (14,42 g e 13,36 g) e comprimento total (83,13 mm e 82,72 mm), não sendo embora, estatisticamente significativos. Perante os três métodos de sexagem avaliados, a histologia das gônadas obteve o diagnóstico mais seguro.

Palavras-chave: sexagem, coloração, diâmetro de grão, histologia, peixe, idades.

CHAPTER II

Efficiency of methods of sexual identification in tilapias (*Oreochromis niloticus*) reverted and feeded with different diameters of ration with 30, 60 and 90 days of age

ABSTRACT

This work evaluated three methods of sexual identification of Nile tilapias with ages of 30, 60 and 90 days of age reverted through administration of androgen 17 α -methyltestosterone added to the rations of different diameters (0.25; 0.35 and 0.50 mm) in dosage of 60 mg/kg of ration. To the biometricals parameters as weight and length total were used a completely randomized design and subdivided instalments with three treatments and three repetitions, where the instalments were the three diameters of ration and the subinstalments, the three ages. In the end of this work, fishes feeded with diameters 0.35 and 0.25 mm, respectively, have obtained the best results for weight (14.42 g and 13.36 g) and length total (83.13 mm and 82.72 mm), although being statistically insignificant. In the presence of the three methods of sexual identification evaluated, histology of gonads has shown the most confident diagnosis.

Keywords: sexual detection, coloration, milling degree, histology, fish, ages.

Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie que apresenta qualidades favoráveis para a piscicultura, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo quanto ao sistema de criação em tanques-rede com rações completas e alta tecnologia de produção, agregando ainda qualidades como alta rusticidade, facilidade de obtenção de juvenis, grande aceitação no mercado de lazer (pesque-pague) e alimentício, pelas qualidades nutritivas e organolépticas do filé (Meurer *et al.*, 2002; Meurer *et al.*, 2003).

Meurer *et al.* (2003) afirmaram que para as tilápias, rações fareladas são as mais adequadas para as fases larval e juvenil e, que o grau de moagem das mesmas está relacionado com o desempenho dos animais em ganho de peso e crescimento (Meurer *et al.*, 2005).

A precocidade sexual é um complicador para o cultivo desta espécie (Cavalcante *et al.*, 2004), pois as fêmeas da tilápia a partir de 30 g de peso podem iniciar sua vida reprodutiva (Wassermann e Afonso, 2002). Leonhardt (1997) afirma que o desvio de elementos plásticos (proteínas) e energéticos (lipídios e carboidratos) para a reprodução em detrimento do crescimento, produz rapidamente uma superpopulação nos tanques de cultivo. El Gamal *et al.* (1999) e Carrillo (2004) atestam que os peixes competem por espaço e alimento, afetando negativamente o rendimento do lote. Para contornar tais problemas, emprega-se atualmente o uso da reversão sexual das larvas por meio do fornecimento de rações contendo hormônios androgênicos para as tilápias durante a fase de larvicultura (Macintosh e Little, 1995; Sanches e Hayashi, 2001). De acordo com o trabalho de Phelps e Cerezo (1992) a utilização de hormônios masculinizantes mostrou ser a técnica mais prática e efetiva para a produção de machos fenotípicos. Esta prática, além de eliminar problemas relativos à reprodução descontrolada, proporciona segundo Tachibana *et al.* (2004) a obtenção de populações constituídas apenas por machos e com maior potencial de crescimento. Entre os vários hormônios pesquisados, o andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona (MT), tem sido o mais empregado no processo de reversão sexual por apresentar a vantagem de ser facilmente excretado logo após o período do tratamento hormonal (Popma e Green, 1990; Guerrero III e Guerrero, 1997; Mainardes-Pinto *et al.*, 2000).

Cavalcante *et al.* (2004) atestaram que apesar da difusão da tecnologia da reversão do sexo em peixes, faltam meios eficazes na avaliação da qualidade desta reversão. Geralmente a eficiência do processo de reversão é avaliada por meio da

histologia das gônadas dos peixes (Carvalho e Foresti, 1996; Paller e Guerrero III, 2001), ou ainda, mais recentemente pelo método do acetato-carmim, desenvolvido por Guerrero e Shelton (1974) e validado para a tilápia do Nilo por Wassermann e Afonso em 2002. Além desses, existe o método de sexagem manual das tilápias por meio do exame da papila urogenital (Afonso e Lebouté, 1993; Beardmore *et al.*, 2001; Carrillo, 2004; Tachibana *et al.*, 2004).

O presente trabalho foi desenvolvido com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas com três granulometrias de ração contendo andrógeno 17 α -metiltestosterona, aos 30, 60 e 90 dias de idade. Pretendeu-se validar a idade e o método que confirme o diagnóstico mais seguro.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP e no Setor de Tilapicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, ambos localizados em Jaboticabal/SP, por um período de 90 dias, de agosto a novembro de 2004.

Para tal, foram utilizadas 900 larvas de tilápia do Nilo com dois dias de idade (pós-eclosão), distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos e três repetições (Tabela 1), em um esquema de parcelas subdivididas, tendo como parcelas as três granulometrias de ração e como subparcelas as três idades analisadas. Os tratamentos foram constituídos pelas granulometrias de ração 0,25; 0,35 e 0,50 mm.

Tabela 1. Distribuição dos tratamentos (granulometrias).

Caixas	Tratamento	Caixas	Tratamento	Caixas	Tratamento
1	R1- 0,50 mm	4	R2- 0,50 mm	7	R3- 0,50 mm
2	R1- 0,35 mm	5	R2- 0,35 mm	8	R3- 0,35 mm
3	R1- 0,25 mm	6	R2- 0,25 mm	9	R3- 0,25 mm

Considerou-se como unidade experimental um aquário contendo 100 larvas. Para a realização do experimento, utilizaram-se nove aquários com capacidade para 100 litros de água, sendo estes equipados com sistemas de aeração e abastecimento de água contínuos. A vazão da água foi de 400mL/minuto, possibilitando 100% de renovação a cada 2 horas. Os aquários foram sifonados, diariamente, pela manhã (9:00h) e pela tarde (15:00h), para a eliminação das fezes e da ração não ingerida. As temperaturas da água (máxima e mínima) foram registradas diariamente às 9:00 h, antes da sifonagem das caixas e seus valores médios variaram entre $25,9 \pm 1,36$ °C a $28,0 \pm 0,62$ °C.

As dietas experimentais apresentaram a mesma composição quanto aos ingredientes e nutrientes, diferindo apenas no tamanho das partículas dos ingredientes utilizados (Tabela 2). Os alimentos que compuseram as rações foram triturados e moídos individualmente, em moinho de facas, provido com peneiras de diferentes diâmetros de grão: 0,25; 0,35 e 0,50 mm, sendo depois misturados, manualmente. No momento da confecção das rações adicionou-se o andrógeno 17 α -metiltestosterona na quantidade de 60 mg/kg de ração (Popma e Green, 1990).

Os animais foram alimentados com as rações na forma farelada (Meurer *et al.* 2003 e Bombardelli *et al.*, 2004a). Para o fornecimento das rações, fez-se uso do regime de alimentação *ad libitum*, com frequência de arraçoamento de três vezes ao dia em horários pré-determinados (9:00, 14:00 e 17:30h), durante 30 dias. Após esse período, utilizou-se a granulometria 0,35 mm sem hormônio para crescimento até os 90 dias de idade.

Tabela 2. Composição da ração experimental.

Ingredientes	Quantidade (%)	Componente	Quantidade
Milho	5,0	Proteína Bruta (%)	35,0
Farelo de Trigo	29,0	Fibra Bruta(%)	5,19
Farelo de Arroz	5,0	Extrato Etéreo (%)	6,22
Farelo de Soja	39,0	Extrato Não-Nitrogenado (%)	31,52
Farinha de Peixe	21,0	Matéria Seca (%)	88,28
Suplemento vit.min. ¹	1,0	Energia Bruta (Kcal/kg)	4130
Total	100,0		

¹ Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 200.000UI; Vit. D3, 200.000UI; Vit. E, 12.000mg; Vit. K3, 2.400mg; Vit. B1, 4.800mg; Vit. B2, 4.800mg; Vit. B6, 4.000mg; Vit. B12, 4.800mg; Ác. Fólico, 1.200mg; Pantotenato Ca, 12.000mg; Vit. C, 48.000mg; Biotina, 48mg; Colina, 65.000mg; Niacina, 24.000mg; Ferro, 10.000mg; Cobre, 6.000mg; Manganês, 4.000mg; Zinco, 6.000mg; Iodo, 20mg; Cobalto, 2mg; Selênio, 20mg.

Procedeu-se as coletas dos peixes aos 30, 60 e 90 dias de idade, onde os animais foram anestesiados em solução de benzocaína a 0,1% (Apêndice), sacrificados e fixados inteiros em solução de formol tamponado a 10% (Apêndice) com pH=7,4 durante 24 horas, no mínimo. Aos 30 e 90 dias foram coletados 30 peixes/tratamento (total de 90 peixes) e aos 60 dias, coletaram-se 10 peixes/tratamento (total de 30 peixes). Os animais foram analisados quanto ao peso (g) e ao comprimento total (mm) e depois identificados com os seguintes métodos de sexagem: 1- Exame macroscópico da papila urogenital evidenciada com azul de metileno a 1% (proposta por Afonso e Lebouté, 1993), 2- Exame microscópico das gônadas pela coloração com acetato-carmim (segundo Guerrero e Shelton, 1974), que consistiu no exame das gônadas à fresco, seguindo as recomendações de Wassermann e Afonso (2002) e 3- Exame microscópico das gônadas pela rotina histológica, de acordo com Carvalho e Foresti (1996). Para a

execução das duas últimas técnicas microscópicas de sexagem foi necessária a retirada das gônadas da cavidade abdominal dos peixes, segundo a metodologia de Wassermann e Afonso (2002).

Os dados obtidos para as variáveis biométricas de peso (g) e comprimento total (mm) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a um nível de 5% de probabilidade. Nos casos onde houve diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey ($\alpha=5\%$). As análises estatísticas foram feitas por meio de programa estatístico SAS (Statistic Analysis System), versão 8.0.

Resultados e Discussão

Biometria

Na Tabela 3 estão apresentados os valores das estatísticas F e os coeficientes de variação (CV) obtidos na análise de variância para o peso e comprimento total, enquanto que na Tabela 4, estão representados os valores médios obtidos para o peso e comprimento total por idade e tratamento.

Tabela 3. Estatísticas F e Coeficientes de Variação (CV) obtidas na análise da variância para as variáveis Peso (g) e Comprimento Total (mm).

Estatísticas	Peso (g)	Comprimento Total (mm)
F para Tratamento	2,36 ^{NS}	2,40 ^{NS}
F para Idade	158,41 ^{**}	436,78 ^{**}
F para interação Idade X Tratamento	1,75 ^{NS}	3,29 [*]
CV (parcelas)	77,32 %	20,29 %
CV (subparcelas)	63,55 %	19,19 %

** Significativo para $P<0,01$; * Significativo para $p<0,05$ e NS para $p>0,05$ = valores não significativos.

Tabela 4. Valores médios obtidos para as variáveis Peso (g) e Comprimento Total (mm) referentes aos tratamentos recebidos (granulometrias: 0,25; 0,35 e 0,50 mm) aos 30, 60 e 90 dias de idade.

Variáveis	Idades	Tratamentos		
		0,25 mm	0,35 mm	0,50 mm
Peso (g)	30 dias	0,55 ^c	0,64^c	0,54 ^c
	60 dias	3,96 ^b	8,53^b	5,39 ^b
	90 dias	13,36 ^a	14,42^a	10,91 ^a
C.Total (mm)	30 dias	31,65 ^c	32,15^c	32,24 ^c
	60 dias	49,08 ^b	64,84^b	62,76 ^b
	90 dias	82,72 ^a	83,13^a	76,36 ^a

*As médias seguidas por letras diferentes (nas colunas) diferem entre si para valores de $p<0,05$ (Teste de Tukey).

Os valores obtidos e que constam na Tabela 3 mostram que não houve diferenças estatísticas significativas para o peso e comprimento total entre os tratamentos (granulometrias). Em relação às idades houve diferenças significativas tanto

para o peso quanto para o comprimento total (para valores de $p < 0,01$). A interação entre as idades e os tratamentos foi significativa apenas para o comprimento total no intervalo de confiança de 95%, sendo não significativo para os pesos.

Os altos valores de CV encontrados para o peso e comprimento total em todos os tratamentos e idades eram esperados, pois Volpato *et al.* (1989) e Borges *et al.* (2005) relataram que o crescimento heterogêneo entre larvas e alevinos de tilápia é uma característica comum, estando relacionada ao estabelecimento de hierarquias entre os peixes, onde há poucos animais grandes e muitos animais pequenos. Desta maneira, os índices de crescimento e ganho de peso dos peixes ao término do período de reversão sexual podem apresentar uma grande variabilidade, como foi encontrado neste trabalho. Acrescenta-se ainda que Vera Cruz e Mair (1994) e Mainardes-Pinto *et al.* (2000) relataram que indivíduos dominantes dentro de uma população podem consumir mais alimento e crescerem mais rapidamente, deixando menos alimento para os outros com comportamento mais submisso que acabam por apresentar menor crescimento tornando-se, portanto, mais vulneráveis ao canibalismo.

Os dados da Tabela 4 mostram que ao comparar os valores médios de peso e comprimento total tomados aos 30, 60 e 90 dias de idade houve diferenças significativas entre eles, sendo esta já esperada, pois com o avanço da idade, mediante técnicas adequadas de manejo sanitário e nutricional, o crescimento dos animais e o aumento de seus pesos corporais se elevam naturalmente. O peso e o comprimento não variaram significativamente aos 30 dias de idade para os três tratamentos (granulometrias). Aos 60 e 90 dias evidenciaram-se valores médios maiores entre os tratamentos para os peixes alimentados com as rações de granulometrias 0,35 e 0,25 mm, respectivamente, embora não diferindo entre si em termos estatísticos. Moya *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes com o teste das granulometrias 0,21; 0,35 e 0,50 mm, onde o fornecimento tanto da ração com 0,35 mm quanto da com 0,50mm não alteraram os dados biométricos dos alevinos. Porém, destaca-se que neste experimento, os peixes alimentados com a granulometria 0,21 mm obtiveram as menores médias de peso e comprimento.

No entanto, segundo Monticelli *et al.* (1996); Soares *et al.* (2003) e Meurer *et al.* (2005) a eficiência da digestão dos alimentos está relacionada com a superfície de exposição das partículas alimentares às secreções digestivas, superfície esta que é inversamente proporcional ao grau de moagem e ao seu trânsito gastrointestinal (NRC, 1993; Zanotto *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1999). Meurer *et al.* (2003 e 2005) afirmaram

que durante o processamento das rações, o grau de moagem dos seus ingredientes mostrou-se como um dos fatores de maior importância, pois quanto mais finamente moídos, maiores seriam os custos de produção, devido ao maior consumo de energia e ao tempo de moagem. Mediante a moagem dos ingredientes da ração inferior a 0,50 mm, pode-se inferir que apesar da eficiência da digestão dos alimentos melhorar com a redução do tamanho da partícula (Monticelli *et al.*, 1996), concomitantemente poderá ocorrer uma redução das taxas de trânsito alimentar pelo trato digestivo (NRC, 1993; Zanotto *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1999 e Meurer *et al.*, 2005). Este fato, segundo Meurer *et al.* (2002) pode levar à limitação da ingestão voluntária de alimento pelo animal, acarretando em prejuízos ao desempenho, como a redução das taxas de crescimento e de aumento de peso. Pode-se acrescentar a este fato as observações de Pezzato (1999) no tocante à perda de nutrientes por lixiviação na superfície do corpo d'água, aumentando a carga poluente no mesmo e naquele que recebe os efluentes.

Lovell (1988) e Kubitzka (1997) sugerem que o grau de moagem dos alimentos que compõem as rações deva ser inferior a 0,50 mm, enquanto que Hayashi *et al.* (1999) e Meurer *et al.* (2005) recomendaram a utilização de peneiras com malha de abertura 0,50 mm na fabricação de rações fareladas para tilápia do Nilo durante a fase de reversão sexual e no início da fase de crescimento. Meurer *et al.* (2005) afirmaram ainda que as implicações de um processamento inadequado dos ingredientes componentes das rações para a tilápia nilótica durante a fase de reversão sexual podem afetar a produção tanto no aspecto produtivo (juvenis com menores pesos e tamanhos), quanto no aspecto financeiro, pois a moagem muito fina dos ingredientes torna oneroso o processo produtivo com maiores gastos de energia e de mão-de-obra.

Métodos de sexagem

O exame macroscópico da papila urogenital das tilápias mostrou ser mais eficaz aos 60 e 90 dias de idade, para peixes maiores que 5,0 cm (Figura 1) com elevadas possibilidades de acerto, visto que o aparelho genital externo revelou-se bem formado e distinto nestas idades. Nos peixes com 30 dias de idade (Figura 2), tal método de sexagem não apresentou resultados confiáveis, pois nesta idade, para peixes menores que 3,0 cm e pesando menos que 0,5 g, a papila urogenital apresentou-se pouco visível, mesmo com o auxílio do estereomicroscópio (lupa). Este tipo de sexagem requer uma certa prática da pessoa que a realiza, pois ela pode induzir a erros de diagnóstico,

especialmente para tilápias com proporções corporais reduzidas (Makino, 2005*. Comunicação pessoal). Desprez *et al.* (2003) afirmaram que tal técnica está em processo de desuso, por ser pouco prática e bastante estressante para os animais durante a captura. Wassermann e Afonso (2002) acrescentaram que a técnica de sexagem macroscópica é adequada para sexar tilápias nilóticas com peso corporal acima de 0,5 g, informação que corrobora com os dados obtidos no presente trabalho, pois foi somente a partir dos 60 dias de idade que este método obteve sucesso. Nakamura *et al.* (1998) afirmaram que durante o processo de reversão sexual em peixes, a masculinização da papila urogenital pode acontecer antes da masculinização gonadal. Assim, um peixe pode parecer macho externamente, e internamente apresentar ovários. Nesse experimento houve ocorrência deste tipo, especialmente em peixes com 30 e 60 dias de idade que, ao exame da papila urogenital mostraram externamente serem machos e ao realizar o exame microscópico das gônadas, resultaram ser fêmeas.

Na análise microscópica das gônadas utilizando-se a técnica de coloração com acetato-carmim, observou-se que nos peixes com 30 dias de idade estas se mostraram indiferenciadas, sem contornos definidos no parênquima e com a presença do tecido de natureza conjuntivo-fibrosa (Figura 3). Os indivíduos diagnosticados como sendo machos nesta fase, apresentaram estruturas semelhantes a túbulos seminíferos muito rudimentares e pouco característicos enquanto que, aqueles identificados possivelmente como fêmeas exibiram estruturas ovóides que se assemelhavam a ovócitos rudimentares, mergulhados numa matriz altamente fibrosa de natureza conjuntiva. Estes dados concordam com o trabalho de Carvalho e Foresti (1996), onde em *Oreochromis niloticus* somente aos 48 dias pôde ser evidenciada a presença de células germinativas da linhagem feminina em atividade meiótica e a formação da cavidade ovariana, demonstrando que a diferenciação morfológica da gônada para a formação dos ovários ocorre neste período. Concordando com os mesmos autores, a diferenciação morfológica dos testículos é evidenciada aos 68 dias de vida, pela presença de cistos germinativos contendo espermatogônias. Paller e Guerrero III (2001) encontraram resultados semelhantes, onde a diferenciação morfológica dos ovários nas tilápias do Nilo ocorre mais precocemente que os testículos. Na espécie *Oreochromis mossambicus* o início da diferenciação entre os sexos morfológicamente visível é mais precoce, ocorrendo aos 37 dias de idade (Chmilevskiy, 1995). Babiker e Ibrahim (1979) demonstraram que o desenvolvimento das gônadas em tilápias do Nilo está intimamente associado ao crescimento corporal. Esta afirmação corrobora com os resultados obtidos

neste trabalho pois, nos peixes com 60 e 90 dias de idade, os caracteres sexuais apresentaram-se mais evidentes. Os testículos apresentaram túbulos seminíferos evidentes que continham células da linhagem germinativa isoladas ou agrupadas em cistos (Figuras 4 e 5). As fêmeas exibiram ovários contendo ovócitos em diferentes fases de maturação (Figura 6), especialmente nas tilápias com 90 dias de idade. O método de sexagem da coloração a fresco das gônadas com o acetato-carmim mostrou ser mais eficiente nos peixes com idades maiores que 60 dias, pois como foi visto ao término de experimento, tanto os machos quanto as fêmeas estavam bem definidos. Nesta idade, foi possível também observar a presença de indivíduos intersexos, cujas gônadas apresentaram características morfológicas masculinas e femininas coexistindo simultaneamente (Figura 7). Pandian e Sheela (1995); Carvalho e Foresti (1996) citados por Neumann (2004) relatam que a intersexualidade em tilápias pode ser resultante de altas dosagens de andrógenos (acima de 60mg/kg de ração), ou pela administração destes por períodos prolongados (acima de 30 dias).

A análise histológica das gônadas em tilápias com 30 dias de idade confirmou a fase de gônadas indiferenciadas, apresentando abundância de tecido conjuntivo fibroso, não sendo possível o diagnóstico do sexo (Figura 8). Babiker e Ibrahim (1979); Carvalho e Foresti (1996); Paller e Guerrero III (2001) encontraram estas mesmas características em tilápias nilóticas nesta idade.

Para os peixes com 60 e 90 dias de idade, a identificação entre machos, fêmeas é evidente, pois as gônadas apresentaram-se bem definidas, especialmente aos 90 dias. Nos machos, os cortes histológicos longitudinais dos testículos mostraram-se envolvidos por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo contendo em seu interior túbulos seminíferos, onde cada um deles mostraram células da linhagem germinativa isoladas ou em cistos, organização morfológica também observada no trabalho de Babiker e Ibrahim (1979) e Paller e Guerrero III (2001) (Figuras 9 e 10).

Nas fêmeas com 60 e 90 dias de idade, os cortes histológicos longitudinais dos ovários exibiram ovócitos bem diferenciados e característicos e em várias fases de maturação ovocitária (Figuras 11 e 12). Coward e Bromage (1998) também observaram este padrão de organização morfológica dos ovócitos em *Tilapia zilli*.

A presença de intersexos foi notada em peixes analisados com 60 dias. O tipo de intersexo observado, foi em sua maioria, composto por testículos contendo alguns ovócitos dispersos no parênquima das gônadas, corroborando com os resultados de

Carvalho e Foresti (1996) e Neumann (2004) para peixes desta espécie, que foram submetidos ao processo de reversão do sexo induzida por hormônios androgênicos.

Faz-se necessário considerar que houve muitas dificuldades na dissecação, coleta e análise das gônadas nas tilápias com 30 dias de idade, devido às suas pequenas dimensões corporais e também ao alto grau de imaturidade do tecido gonadal. A indiferenciação morfológica das gônadas impossibilitou o diagnóstico sexual correto destes animais, especialmente para o método de preparação das gônadas com o acetato-carmim. No processamento histológico das gônadas, devido aos finos cortes (5,0 μm), houve uma melhor identificação do sexo nesta fase. Wassermann e Afonso (2002) e Bombardelli *et al.* (2004b) preconizaram que para a execução da técnica usando o acetato-carmim, os peixes devem apresentar tamanhos maiores que 2,5 cm e pesarem mais que 0,5 g.

A partir dos 60 dias de idade, a identificação do sexo dos peixes tornou-se mais evidente, visto que o desenvolvimento e a maturação gonadais na tilápia do Nilo estão fortemente relacionados com o desenvolvimento corporal (Babiker e Ibrahim, 1979), tanto no aspecto macroscópico, onde a papila urogenital mostrou-se facilmente distinguível, quanto no aspecto microscópico, pois as gônadas apresentaram-se mais diferenciadas, culminando aos 90 dias com a completa definição do sexo. Nesta idade houve maiores acertos no processo de sexagem, não importando o método utilizado.

Figura 1. Papila urogenital e orifício anal de tilápia do Nilo macho com 60 dias (seta grossa). A seta fina indica o orifício anal (visão natural).

Figura 2. Papila urogenital e orifício anal de tilápia do Nilo macho com 30 dias (seta grossa: papila e seta fina: orifício anal). Aumento: 10x (lupa).

Figura 3. Fotografia das gônadas de tilápia do Nilo com 30 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 40x. Sexo: Indiferenciado. TCD: tecido conjuntivo denso.

Figura 4. Fotografia de testículos de tilápia do Nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 40x. TCD: tecido conjuntivo denso. LS: lóbulos seminíferos.

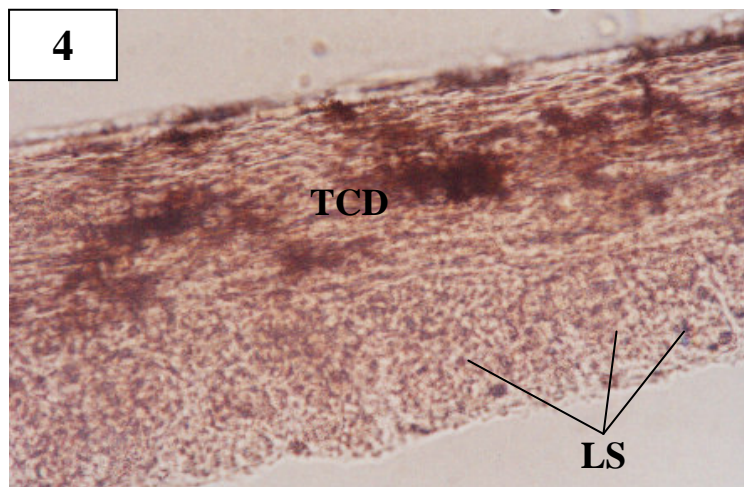
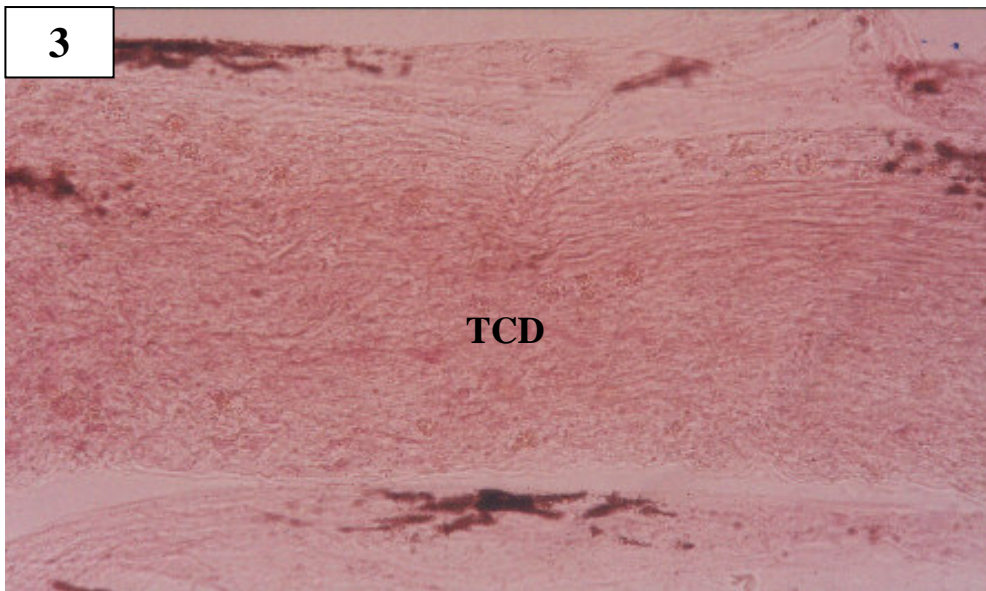
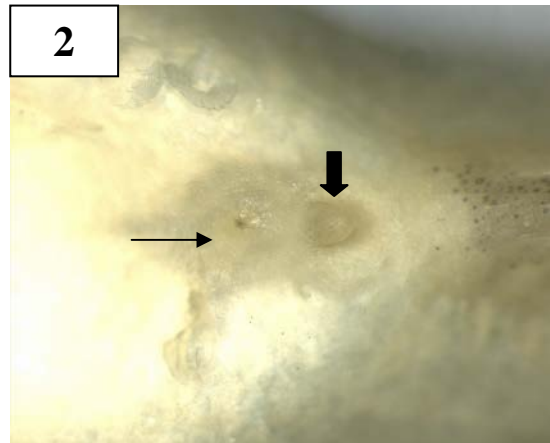
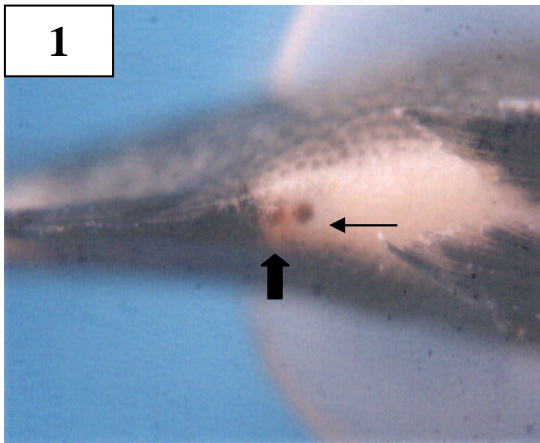


Figura 5. Fotografia de testículos de tilápia do Nilo com 90 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 10x. LS: lóbulos seminíferos e TCD: tecido conjuntivo denso.

Figura 6. Fotografia de ovários de tilápia do Nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 20x. OV: ovócitos.

Figura 7. Fotografia das gônadas de tilápia do Nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 20x. Sexo: Intersexo. TCD: tecido conjuntivo denso; OV: de ovócitos e LS: lóbulos seminíferos.

Figura 8. Fotomicrografia das gônadas de tilápia do Nilo com 30 dias de idade. Obj= 40x (HE). Sexo: Indiferenciado. TCD: tecido conjuntivo denso e CInd: células germinativas indiferenciadas (gônias).

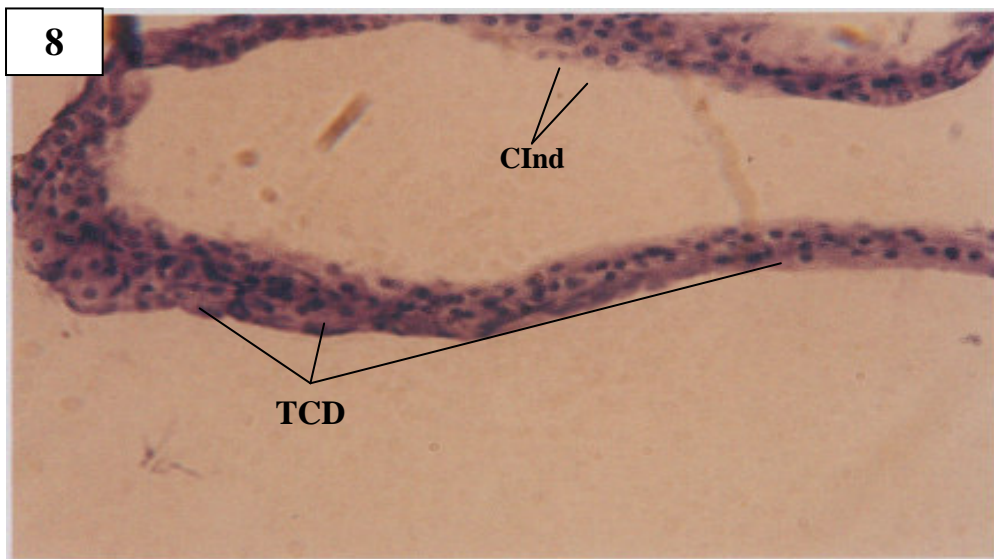
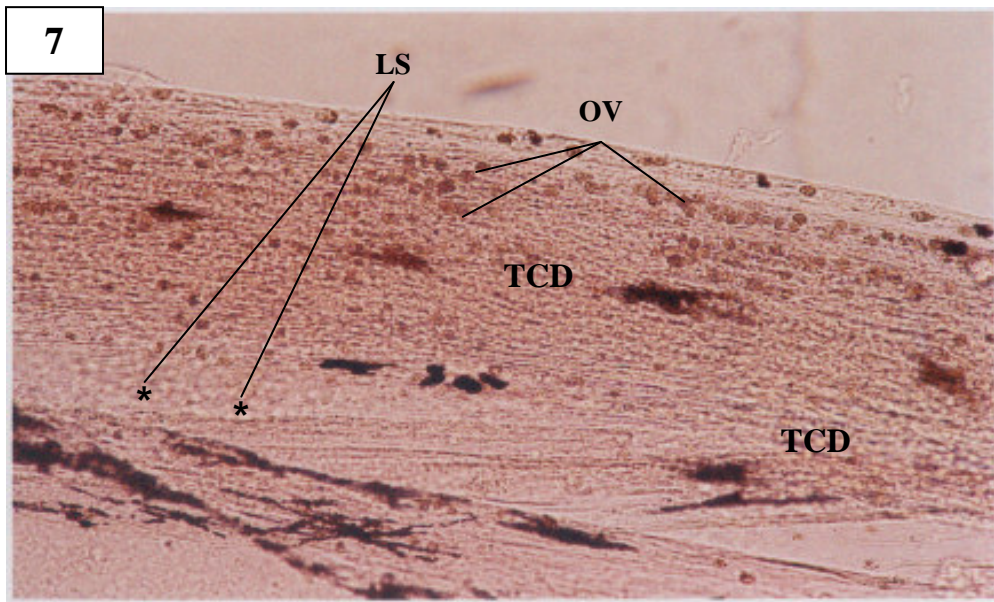
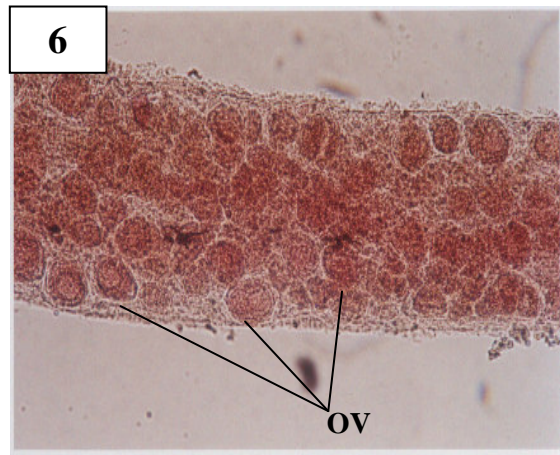
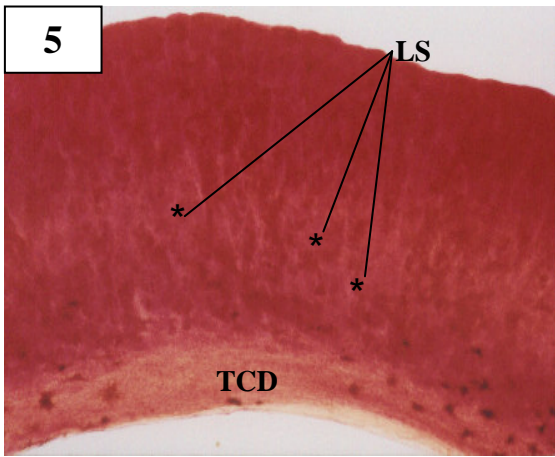
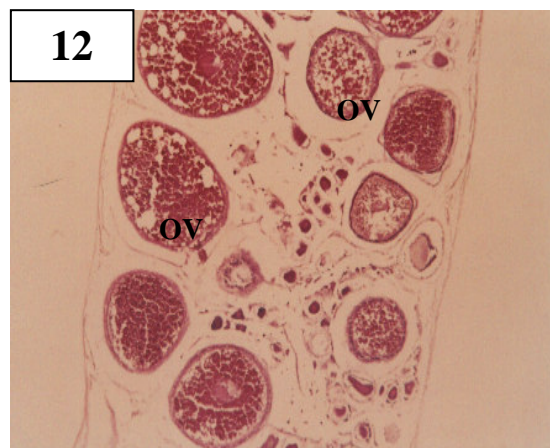
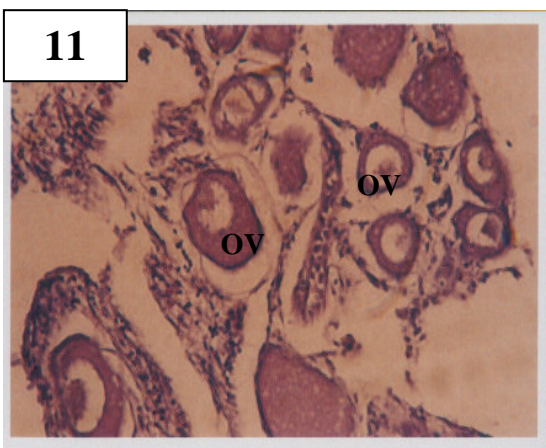
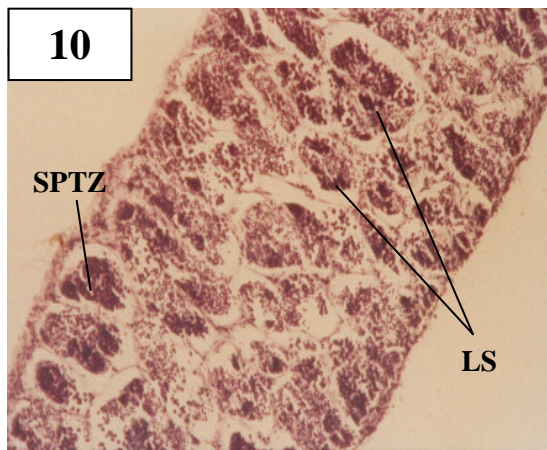
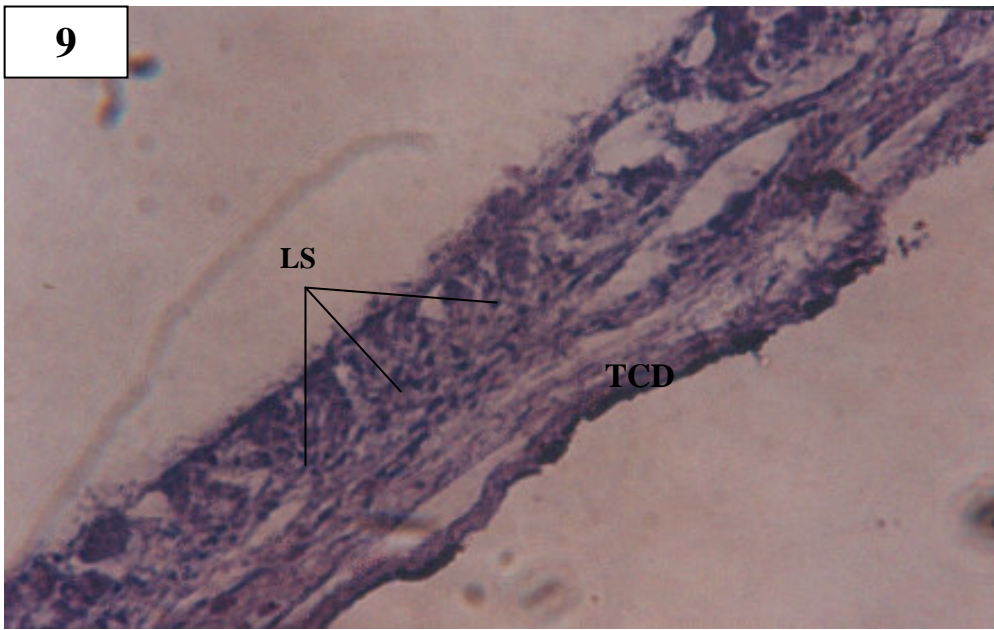


Figura 9. Fotomicrografia de testículos de tilápia do Nilo com 60 dias de idade. Obj= 40x (HE). LS: lóbulos seminíferos e TCD: tecido conjuntivo denso.

Figura 10. Fotomicrografia de testículos de tilápia do Nilo com 90 dias de idade. Obj= 20x (HE). LS: lóbulos seminíferos e SPTZ: espermatozóides.

Figura 11. Fotomicrografia de ovários de tilápia do Nilo com 60 dias de idade. Obj= 40x (HE). OV: ovócitos.

Figura 12. Fotomicrografia de ovários de tilápia do Nilo com 90 dias de idade. Obj= 5x (HE). OV: ovócitos.



Conclusões

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que os peixes alimentados com as granulometrias 0,35 e 0,25 mm, respectivamente, obtiveram os melhores índices de crescimento e ganho de peso. Não se recomenda a sexagem das tilápias aos 30 dias de idade para nenhum dos métodos estudados, estando a eficiência do diagnóstico do sexo relacionado mais ao tamanho e peso das tilápias (acima de 3,0 cm e 0,5 g) do que propriamente à idade avaliada. Como era esperado, o método de sexagem pela histologia das gônadas permitiu um diagnóstico mais seguro, frente aos outros métodos.

Referências

- AFONSO, L. O. B.; LEBOUTE, E. M. Método para a sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 4. 1993, Porto Alegre, Brasil, *Anais...Porto Alegre: UFRGS*, 1993. p. 100 – 103.
- CARRILLO, M. A. *Indução à tetraploidia em tilápia nilótica, Oreochromis niloticus utilizando-se choque térmico*. 2004. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- BABIKER, M. M.; IBRAHIM, H. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. *J. Fish Biol.*, Oxford – England, v. 14, p. 437 – 448, 1979.
- BEARDMORE, J. A. *et al.* Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, p. 283 – 301, 2001.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Avaliação de rações fareladas e micropelletizadas para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) – desempenho e efetividade da reversão sexual. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 197 – 201, 2004a.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por banhos de imersão e o andrógeno dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 209 - 215, 2004b.
- BORGES, A. M. *et al.* Produção de populações monossexo macho de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 40, n. 2, p. 153 – 159, 2005.
- CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão de sexo em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, TREWAVAS, 1983, induzida por 17- alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 56, n. 2, p. 249 - 262, 1996.
- CAVALCANTE, J. M. M. *et al.* Avaliação de método alternativo na determinação da proporção sexual de alevinos de tilápia por esmagamento gonadal em lâmina/lamínula em comparação ao método do acetato-carmim. In: IX SEMANA UNIVERSITÁRIA – XIII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2004, Fortaleza. *Anais...Fortaleza: UECE*, 2004. CD-ROM
- CHMILEVSKYI, D. A. Effect of reduced temperature on oogenesis of the mouthbrooder, *Oreochromis mossambicus*, 2. Effect on fish twenty – two days after hatching. *Journal of Ichthyology*, v. 35, n. 1, p. 72 – 80, 1995.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Spawning frequency, fecundity, egg size and ovarian histology in groups of *Tilapia zilli* maintained upon two distinct food ration sizes from first-feeding to sexual maturity. *Aquat. Living Resour.*, Stirling - Scotland, v. 12, n. 1, p. 11 –22, 1999.

DESPREZ, D. *et al.* Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 216, p. 55 – 65, 2003.

EL GAMAL, A. A. *et al.* Induction of triploid and tetraploid in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 30, p. –269 - 275, 1999.

GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An acetate-carmim squash technique for sexing juvenile fishes. *The progressive Fish-Culturist*, v. 36, p. 56, 1974.

GUERRERO III, R. D.; GUERRERO, L. A. Effects of androstenedione and methyltestosterone on *Oreochromis niloticus* fry treated for sex reversal in outdoor net enclosure. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 4., 1997, Orlando, Florida, 1997. v. 12, p. 772 – 777.

HAYASHI, C. *et al.* Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 21, n. 3, p. 733 – 737, 1999.

KUBITZA, F. *Nutrição e alimentação dos peixes*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 74p, 1997.

LEONHARDT, J. H. Efeitos da reversão sexual em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). 1997. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

LOVELL, T. *Nutrition and feeding of fish*. New York: Van Nostrand and Reinhold, 1988.

MACINTOSH, D. J.; LITTLE, D. C. Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.) *Broodstock management and larval quality*. Stirling: Institute of Aquaculture – University of Stirling, cap. 12, p. 277 – 320, 1995.

MAINARDES-PINTO, C. S. R. *et al.* Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -metilttestosterona. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, n. 3, p. 654 – 659, 2000.

MAKINO, L. C. Comunicação pessoal, 2005. (liliancrism02@yahoo.com.br).

MEURER, F. *et al.* Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *R. Bras. Zootec.*, v. 31, n. 2, p. 566 - 573, 2002.

MEURER, F. *et al.* Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *R. Bras. Zootec.*, v. 32, n.2, p. 262 – 267, 2003.

MEURER, F. *et al.* Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 81 – 85, 2005.

MONTICELLI, C. J. *et al.* Efeito da granulometria do milho, da área por animal e do sexo sobre o desempenho de suínos em crescimento e terminação. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 25, n. 6, p. 1150 – 1162, 1996.

MOYA, C. F. *et al.* Avaliação histológica do desenvolvimento bucal e sua cronologia para testar a eficiência de diferentes granulometrias da ração no desempenho de larvas de tilápias do Nilo. *Acta Scientiarum* (artigo submetido), Maringá, 2005.

NAKAMURA, M. *et al.* Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology*, California, v. 281, p. 362 - 372 , 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirement of fish. Washington, DC: National Academy Press, 1993.

NEUMANN, E. Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* e uma híbrida *Oreochromis* sp. 2004. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PALLER, V. G. V.; GUERRERO III, R. D. Histological effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation of *Oreochromis niloticus* L. fry. *Asia Life Sciences*, Philippines, v. 10, n. 1, p. 55 – 68, 2001.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 138, p. 1 – 22, 1995.

PEZZATO, L. E. Alimentação de peixes – Relação custo benefício. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. *Anais....*Porto Alegre: SBZ, 1999. p. 109.

PHELPS, R. P.; CERESO, G. The effect of confinement in hapas on sex reversal and growth of *Oreochromis niloticus*. *J. Appl. Aquac.* Canadá, v. 1, n. 4, p. 73 – 81, 1992.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Reversão sexual de tilápias em tanques de terra. In: *Manual de produção em aqüicultura*. Flórida: University Auburn, 52 p., 1990.

SANCHEZ, L. E. F.; HAYASHI, C. Effect of feeding frequency on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fries performance during sex reversal in hapas. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 4, p. 871 – 876, 2001.

SOARES, C. M. *et al.* Diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas peletizadas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) em fase de crescimento. Desempenho e digestibilidade aparente. *Zootecnia Tropical*, Maracay, v. 21, n. 3, p. 275 – 287, 2003.

TACHIBANA, L. *et al.* Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305 – 311, 2004.

VERA CRUZ, E. M.; MAIR, G. C. Conditions for effective androgen sex-reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 237 – 248, 1994.

VOLPATO, G. L. *et al.* Heterogeneous growth in fish: some data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about causal mechanisms. *Boletim de Fisiologia Animal*, São Paulo, v. 13, p. 7 – 22, 1989.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validação da técnica do acetato-carmim para avaliar o sexo de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1., p. 133-139, 2002.

ZANOTTO, D. L. *et al.* Granulometria do milho na digestibilidade das dietas para suínos em crescimento e terminação. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 428 – 436, 1995.

Apêndice II

Solução anestésica a base de Benzocaína a 0,1%:

Dissolver 1,0 grama de Benzocaína em 10 ml de álcool etílico e depois adicionar a mistura em 10 litros de água;

Solução de formol tamponado a 10%:

900 ml de água deionizada;

100 ml de formol;

4,0 g de fosfato de sódio monobásico;

4,5 g de fosfato de sódio dibásico;

Dissolva completamente os sais em 500 ml de água destilada. Adicione o formol, misture bem e depois acerte o pH a 7,4. Feito isto, adicione o restante da água destilada na solução.

Solução fixadora de Bouin (para 1,05 litros):

75% ou 750 ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico;

25% ou 250 ml de formol;

5% ou 50 ml de ácido acético glacial.

Misture muito bem todos os componentes.

Solução de acetato-carmim (GUERRERO e SHELTON, 1974):

0,5 grama do corante índigo carmim;

100 ml de solução de ácido acético a 45% (55 ml de água deionizada + 45 ml de ácido acético glacial);

Misture os reagentes e deixe ferver por 5 minutos até dissolver completamente o corante. Armazene a solução em frasco escuro e deixe esfriar a temperatura ambiente.

