



ARTIGO | ARTICLE

## Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*

*Semen cryopreservation of the dusky grouper Epinephelus marginatus*

Eduardo Gomes Sanches<sup>1</sup>

Idili da Rocha Oliveira<sup>2</sup>

Pedro Carlos da Silva Serralheiro<sup>1</sup>

### RESUMO

Este trabalho teve a finalidade de desenvolver um protocolo de crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. Em três experimentos foram analisados os efeitos de três diluentes (pH 6,1; 7,8 e 8,2), quatro diluições (1:0; 1:1; 1:2 e 1:3), seis concentrações de crioprotetor dimetilsulfóxido (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5%) e cinco velocidades de congelamento (90, 60, 45, 30 e 15°C.min<sup>-1</sup>) sobre a motilidade e o tempo de motilidade espermáticas no sêmen crioconservado. O sêmen foi congelado em vapor de nitrogênio empregando-se palhetas criogênicas, e posteriormente mantido em nitrogênio líquido. O tratamento que propiciou maior motilidade e tempo de motilidade espermáticas ( $p < 0,05$ ) foi aquele proporcionado pelo emprego do diluente B (pH 7,8), na proporção de 1:3 (v/v), com crioprotetor (dimetilsulfóxido) a 5% e em uma velocidade de congelamento de 60°C.min<sup>-1</sup>. Estes resultados possibilitaram a implantação do primeiro banco de sêmen da garoupa-verdadeira no Brasil.

**Palavras-chave:** Crioconservação. Sêmen. *Epinephelus marginatus*. Garoupa-verdadeira. Reprodução. Maricultura.

### ABSTRACT

*This study aimed to develop a semen cryopreservation protocol for the dusky grouper, Epinephelus marginatus. In three separate experiments, the effects of*

<sup>1</sup> Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte. R. Joaquim Lauro Monte Claro Neto, 2275, Itaguá, 11680-000, Ubatuba, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: E.G. SANCHES. E-mails: <esanches@pesca.sp.gov.br>, <idili@pesca.sp.gov.br>, <carlos@pesca.sp.gov.br>.

<sup>2</sup> Instituto de Pesca, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul. Cananéia, SP, Brasil.

three diluents (pH 6.1, 7.8 and 8.2), four dilutions (1:0; 1:1; 1:2 and 1:3), six concentrations of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide (0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 and 12.5%) and five freezing speeds (90, 60, 45, 30 and 15°C.min<sup>-1</sup>) on the motility and time of sperm motility on the cryopreserved semen were analyzed. The semen was frozen in nitrogen vapor using cryogenic slats, and was subsequently transferred to liquid nitrogen. The highest sperm motility rate and time of motility ( $p < 0.05$ ) were achieved by combining diluent (pH 7.8), in a 1:3 (v/v) proportion, with a 5% concentration of cryoprotector (dimethyl sulfoxide) and freezing speed of 60°C.min<sup>-1</sup>. These results enabled the implantation of the first semen bank in Brazil for the dusky grouper.

**Key words:** Cryopreservation. Semen. *Epinephelus marginatus*. Dusky grouper. Reproduction. Mariculture.

## INTRODUÇÃO

No Brasil a piscicultura marinha ainda é incipiente, embora a atividade venha ganhando impulso nos últimos anos a partir da consolidação dos resultados de pesquisas desenvolvidas por diversas universidades e instituições de pesquisa e despertando um grande interesse junto à iniciativa privada (Sanches, 2007).

O litoral brasileiro dispõe de vastos recursos para propiciar o desenvolvimento desta atividade, entretanto, a oferta de formas jovens vem sendo o fator que restringe este desenvolvimento (Cerqueira, 2005). Da mesma forma, Sanches et al. (2006) apontaram a dificuldade de obtenção de formas jovens como um dos maiores entraves para o cultivo desta espécie, ao demonstrarem a viabilidade econômica do cultivo da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) em tanques-rede, no litoral sudeste do Brasil. Cox et al. (2006) também destacaram que a produção de larvas e formas jovens é essencial para o desenvolvimento e a sustentabilidade da piscicultura marinha. Frente ao exposto, é sugestiva a necessidade de desenvolvimento de pesquisas na área de reprodução de peixes marinhos em busca de tecnologia para a solução deste problema.

Segundo Rocha & Costa (1999) o gênero *Epinephelus* apresenta onze espécies com registro de ocorrência para a costa brasileira, sendo que a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* é destacada por sua grande importância comercial nas regiões sudeste e sul do Brasil. Machado et al. (2003) apontaram que esta espécie apresenta importância

do ponto de vista econômico e turístico (grande interesse na pesca esportiva e no mergulho contemplativo) e outros autores ressaltaram a garoupa-verdadeira como uma candidata para a piscicultura marinha (Marino et al., 2000; Sanches, 2006).

De acordo com Marino et al. (2003) o valor comercial da garoupa-verdadeira estimulou a sobrepesca deste recurso, sendo que a partir de 1995, passou a ser incluído na lista de peixes ameaçados (*Berne Convention, Annex 3 - Protocol for Mediterranean Biodiversity*). Recentemente, Fennessy (2006) também afirmou que *E. marginatus* é considerada, nos dias atuais, uma espécie ameaçada e, por isso, incluída na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN).

A garoupa-verdadeira, como os demais membros da subfamília Epinephelinae, é uma espécie hermafrodita protogínica, ou seja, matura inicialmente como fêmea e em dado momento de seu desenvolvimento sofre inversão sexual (Liao, 1993; Zabala et al., 1997). Dada a complexidade do processo de inversão sexual associada a fatores como a estrutura sócio-demográfica desses peixes, a obtenção de machos torna-se um problema para a realização da reprodução em cativeiro (Tucker & Fitzgerald, 1994; Sadovy & Colin, 1995; Barreiros, 1998).

A dificuldade da disponibilidade de reprodutores da espécie é agravada pelo comportamento de formação de haréns com poucos machos e muitas fêmeas. A ocorrência dos machos predomi-

nantemente em profundidades maiores que 30 metros o que dificulta a captura e reduz a sobrevivência dos indivíduos capturados (Grier & Neiding, 2000).

A crioconservação do sêmen é uma técnica empregada em mais de 200 espécies de peixes (sendo 40 delas marinhas), contribuindo significativamente para o controle da reprodução na piscicultura moderna (Gwo, 2000; Tierch, 2000). Esta técnica foi considerada por Cloud *et al.* (1990) de especial interesse para espécies ameaçadas de extinção, por possibilitar a preservação da estrutura genética da população. Já Gwo (2000) e Grier & Neiding (2000) vêem a crioconservação como uma ferramenta importante para o cultivo de peixes da família Serranidae, pois permite a formação de bancos de sêmen e viabiliza a reprodução em condições de cativeiro.

Embora possa ser uma interessante estratégia, poucos trabalhos (Withler & Lim, 1982; Chao *et al.*, 1992; Gwo, 1993; Miyaki *et al.*, 2005) tem focado a crioconservação do sêmen de espécies dessa família.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tipo de diluente, do nível de diluição, da concentração de crioprotetor e da velocidade de congelamento no sucesso da crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira, contribuindo para a reprodução da espécie em cativeiro e permitindo a implantação de um banco de sêmen da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesca, em Ubatuba (SP) (23 27'04''S e 45 02'48''W). Um exemplar macho de garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* foi capturado, em dezembro de 2006, por meio de linha e anzol e transportado até o laboratório. O exemplar, com 1,12m e 32kg, encontrava-se sexualmente maduro e espermante. Esta condição merece destaque por ter sido a primeira captura de um exemplar macho com sucesso, registrada no Brasil, e a primeira oportunidade de se estudar *in vivo* o sêmen deste serranídeo.

O sêmen fresco foi avaliado em relação ao volume, à densidade, à motilidade e ao tempo de motilidade espermática. O sêmen foi extraído do exemplar mediante leve massagem abdominal, com o uso de seringas plásticas de 5mL, envoltas em papel opaco (para evitar a incidência de luz sobre as amostras).

Após a anotação do volume do sêmen colhido, o material contido na seringa foi transferido para um único frasco plástico opaco graduado (0,5mL) de 20mL e mantido imerso em recipiente com água na temperatura de 26°C (mesma temperatura em que era mantido o exemplar de *E. marginatus* no laboratório).

A densidade espermática foi estimada após a diluição do sêmen em duas etapas, até atingir a diluição final de 1:10<sup>4</sup>. Na primeira etapa uma alíquota de 10µL de sêmen foi adicionada a 990µL de solução de formol salino (5mL de solução de formaldeído e 95mL de água marinha a 35‰). Na segunda etapa (momento da realização da contagem), o sêmen foi novamente diluído, na mesma solução e mesmo fator de diluição. A seguir, a contagem foi feita em câmara de Neubauer Improved (1mm<sup>3</sup>), sob microscopia óptica de contraste de fase e aumento de 200 vezes.

A motilidade espermática (porcentagem de células da amostra que apresentam movimento) e o tempo da motilidade espermática (duração do movimento celular, em segundos) foram estimadas em seguida à coleta de sêmen. Ambas foram realizadas em microscópio óptico com contraste de fase (aumento de 400x), após mistura de uma alíquota de 15µL de sêmen fresco com igual volume de água marinha 35‰, em uma lâmina de vidro, sobre a qual foi colocada uma lamínula. A valorização da motilidade foi baseada na estimativa da porcentagem de células móveis no campo microscópico focalizado, seguindo uma escala arbitrária de 0% a 100% (Salisbury & Vandemark, 1964). O tempo de motilidade espermática foi cronometrado (em segundos) desde o momento em que se iniciou a mistura do sêmen com a água marinha (ativação) até o momento em que todas as células se imobilizaram. O tempo de motilidade espermática foi

aferido com a mesma amostra preparada para se observar a motilidade espermática. O tempo de ativação foi de dez segundos. Para cada tratamento foram congeladas seis palhetas plásticas seladas com álcool polivinílico (replicatas) em botijão criogênico contendo vapor de nitrogênio ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), seguindo as etapas enumeradas em Wayman & Tiersch (2000).

Visando-se avaliar o efeito de diferentes fatores (tipos de diluente, diluição, concentração de crioprotetor e velocidade de congelamento) foram montados três experimentos de crioconservação de sêmen descritos a seguir:

*Experimento 1 - efeito do diluente e fator de diluição:* De acordo com Babiak et al. (2000), afirmaram que esquemas fatoriais se aplicam aos experimentos de crioconservação, para este experimento foi desenvolvido um modelo fatorial envolvendo as três soluções diluidoras de sêmen (A, B, C) e quatro proporções do volume de diluente adicionadas ao sêmen 1:0, 1:1, 1:2, 1:3 (v/v). As soluções diluidoras de sêmen com diferentes composições iônicas e pH (Tabela 1) foram baseadas na composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos, com valores de pH ajustados para 6,1; 7,8 e 8,2. A concentração do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) foi fixada em 10% e a velocidade de congelamento em  $60^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos. Para cada tratamento foram congeladas 6 réplicas.

*Experimento 2 - determinação da concentração de crioprotetor:* Neste experimento testou-se diferentes concentrações do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO). Foram estabelecidas seis concentrações

(zero, 2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0% e 12,5%). Para este experimento foi empregada a solução diluidora C. A proporção de sêmen para diluente foi de 1:3. A velocidade de congelamento foi  $90^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e o tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi 60 segundos. Para cada tratamento foram congeladas 6 réplicas.

*Experimento 3 - determinação da velocidade de congelamento:* Para a definição da velocidade de congelamento mais adequada para a conservação das características do sêmen testaram-se velocidades de: 15, 30, 45, 60 e  $90^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para a obtenção das diferentes velocidades, as palhetas foram confeccionadas manualmente a partir de tubos de plástico criogênico, com diâmetro interno de 4mm, utilizados rotineiramente na inseminação artificial de bovinos, de modo a conter os seguintes volumes: 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25mL. Os tubos foram cortados, em seu comprimento, mantendo inalterado seu diâmetro, em tamanhos adequados para armazenar diferentes volumes de sêmen diluído, para que, durante o resfriamento, pudessem refletir as velocidades de congelamento examinadas neste estudo. Cada palheta foi selada em uma das extremidades com tampão formado de algodão hidrófilo - álcool polivinílico em pó - algodão hidrófobo. A determinação das velocidades foi realizada previamente, antes do início deste experimento, em amostras de sêmen e diluidores, em palhetas teste, com auxílio de um par termoeletrônico. A amplitude de variação de temperatura considerada foi entre  $26^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para este experimento o sêmen foi

**Tabela 1.** Composição química das soluções diluidoras.

Diluentes	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	(g/L)		
				MgCl <sub>2</sub>	NaHPO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
A (pH =6,1)	7,89	1,19	0,20	0,4266	-	-
B (pH =7,8)	6,50	3,00	0,30	-	0,2000	-
C (pH =8,2)	7,89	1,19	0,22	0,7253	0,0805	0,84

NaCl (Cloreto de Sódio), KCl (Cloreto de Potássio), CaCl<sub>2</sub> (Cloreto de Cálcio), MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio), NaHPO<sub>4</sub> (Fosfato de Sódio), NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de Sódio).

diluído com a solução diluidora C. A proporção de sêmen para diluente foi de 1:3 e a concentração de DMSO fixada em 10%. O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos. Para cada tratamento foram congeladas 6 réplicas.

Após 180 dias de congelamento, todas as palhetas de todos os experimentos foram descongeladas em água (26°C), durante 2 minutos, para nova aferição da motilidade e do tempo de motilidade espermática. Ambos serviram para avaliar a eficácia do congelamento em função dos fatores envolvidos em cada tratamento testado.

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o *Statistical Analyses System (SAS)*, o *SAS/STAT*, versão 6.11 (1990). A significância das diferenças obtidas entre os tratamentos em cada experimento foram obtidas pelo método ANOVA, usando procedimentos paramétricos, com base no teste de variação múltipla de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exemplar capturado apresentava um comprimento total de 112cm, pesando 32kg. A primeira coleta do sêmen gerou um volume de 12mL. Na análise das características da qualidade do sêmen fresco observou-se uma densidade de  $M=2,9$  DP=  $0,4 \times 10^9$  células/mL, com uma motilidade de 100% e um tempo de motilidade de  $M= 3300$  DP= 456 segundos (médias obtidas de seis leituras).

*Experimento 1 - efeito do diluente e fator de diluição:* Os valores obtidos para a motilidade do sêmen indicaram que o comportamento da motilidade média entre os diluentes nas diferentes diluições não foi significativo ( $p=0,746$ ), entretanto, considerando-se isoladamente o fator diluição, a motilidade média foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Os resultados de comparação entre as médias são apresentados na Tabela 2.

Os resultados mostraram que a diferença da motilidade espermática média do sêmen de *E. marginatus* não foi estatisticamente significativa a partir da diluição 1:1 ( $p > 0,05$ ) e que apenas quando não ocorreu diluição (1:0) as motilidades médias são inferiores as demais relações ( $p < 0,05$ ).

Os valores obtidos para o tempo de motilidade espermática do sêmen demonstraram que o tempo médio de motilidade espermática comportou-se de forma diferente entre os diluentes ( $p=0,002$ ). Os resultados de comparação entre as médias são apresentados na Tabela 3.

Na Tabela 3, pode-se observar que o tempo de motilidade no diluente B e na relação 1:3 apresentou maior média do que as demais combinações de diluições e diluentes ( $p < 0,05$ ).

*Experimento 2 - determinação da concentração de crioprotetor:* A concentração de crioprotetor DMSO de 5,0% apresentou melhor desempenho na crioconservação do sêmen de *E. marginatus*, em termos de motilidade (%) e em tempo de motilidade (segundos) espermáticas, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação às demais concentrações (Tabela 4).

**Tabela 2.** Médias (M) e desvios-padrão (DP) da motilidade espermática (expressos em porcentagem) de *Epinephelus marginatus* submetidos a diferentes diluentes e diferentes diluições (n= 60). Ubatuba (SP), 2007.

Diluentes	Diluições							
	1 : 0		1 : 1		1 : 2		1 : 3	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
A	3,3	2,9 <sup>b</sup>	91,7	5,8 <sup>a</sup>	96,7	2,9 <sup>a</sup>	91,7	5,8 <sup>a</sup>
B	3,3	2,9 <sup>b</sup>	88,3	5,8 <sup>a</sup>	88,3	5,8 <sup>a</sup>	88,3	5,8 <sup>a</sup>
C	3,3	2,9 <sup>b</sup>	86,7	2,9 <sup>a</sup>	91,7	5,8 <sup>a</sup>	91,7	5,8 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias e desvios-padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Médias (M) e desvios-padrão (DP) do tempo de motilidade espermática (expressos em segundos) de *E. marginatus* submetidos a diferentes diluentes e diferentes diluições (n= 60). Ubatuba (SP), 2007.

Diluentes	Diluições							
	1 : 0		1 : 1		1 : 2		1 : 3	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
A	139	48 <sup>c</sup>	2515	280 <sup>b</sup>	3285	373 <sup>ab</sup>	3331	561 <sup>ab</sup>
B	139	48 <sup>c</sup>	2624	500 <sup>b</sup>	2672	518 <sup>b</sup>	4126	505 <sup>a</sup>
C	139	48 <sup>c</sup>	2883	432 <sup>b</sup>	3040	436 <sup>ab</sup>	2505	77 <sup>ab</sup>

<sup>a-b</sup> Médias e desvios-padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Médias e desvios-padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (segundos) de *Epinephelus marginatus* submetido a diferentes concentrações de crioprotetor DMSO (n=36). Ubatuba (SP), 2007.

DMSO (%)	Motilidade (%)		Tempo de motilidade (s)	
0,0	3,3	2,9 <sup>e</sup>	238,3	135,3 <sup>d</sup>
2,5	46,7	2,9 <sup>c</sup>	1463,7	110,3 <sup>c</sup>
5,0	96,7	2,9 <sup>a</sup>	3355,0	141,5 <sup>a</sup>
7,5	78,3	5,8 <sup>b</sup>	2609,0	191,7 <sup>b</sup>
10,0	36,7	2,9 <sup>cd</sup>	1533,3	526,0 <sup>c</sup>
12,5	26,7	2,9 <sup>cd</sup>	340,0	159,0 <sup>d</sup>

<sup>a-e</sup> Médias e desvios-padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Médias (M) e desvios-padrão (DP) da motilidade (%) e do tempo de motilidade (segundos) de *Epinephelus marginatus* submetido a diferentes velocidades de congelamento (n= 30). Ubatuba (SP), 2007.

Volume (mL)	Velocidade	Motilidade		Tempo de motilidade(s)	
	°C.min <sup>-1</sup>	%	%	M	M
0,25	90	86,7	5,8 <sup>a</sup>	2850,7	133,4 <sup>ab</sup>
0,50	60	91,7	5,8 <sup>a</sup>	3335,0	237,9 <sup>a</sup>
0,75	45	76,7	2,9 <sup>ab</sup>	2277,7	197,4 <sup>bc</sup>
1,00	30	61,7	15,3 <sup>b</sup>	1899,7	637,8 <sup>c</sup>
1,25	15	78,3	7,6 <sup>ab</sup>	2286,7	301,4 <sup>bc</sup>

<sup>a-c</sup> Médias e desvios-padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

*Experimento 3 - determinação da velocidade de congelamento:* os resultados deste experimento indicaram que as velocidades de congelamento 90°C.min<sup>-1</sup> e 60°C.min<sup>-1</sup> apresentaram os melhores desempenhos, de acordo com os valores de motilidade e tempo de motilidade espermáticas, sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre elas (Tabela 5).

Em reprodutores de grande porte e com poro genital isolado durante o procedimento de colheita, a pressão manual do abdômen exercida para a liberação do sêmen pode resultar em quantidades variáveis de urina e fezes, alterando o volume total.

A colheita do sêmen de *E. marginatus* diretamente do poro genital com seringas (5mL/0,2) possibilitou eliminar esse material indesejado, mostrando-se uma técnica a ser adotada neste procedimento. A contaminação do sêmen, principalmente por urina, pode aumentar em até 80% no volume resultante, refletindo significativamente na qualidade do produto coletado (Rana, 1996).

Neste estudo a densidade espermática encontrada foi de M= 2,9 DP= 0,4 x 10<sup>9</sup> células/mL. Estes valores são ligeiramente inferiores ao reportado para a espécie por Spedicato et al. (1995), de 4,7 a 8,6 x 10<sup>9</sup>, embora contrastem com a menor densidade obtida por Kuo et al. (1988) em *Epinephelus fario* de 8,0 x 10<sup>7</sup> células/mL.

A motilidade e o tempo de motilidade vêm sendo correlacionadas com a fertilidade do sêmen desde os primórdios das técnicas de fertilização dos peixes (Rana, 1996). Diversos autores destacaram a correlação positiva entre a motilidade espermática e a taxa de fertilização (Mounib et al., 1968; Harvey, 1982; Chereguini et al., 2001; Horváth et al., 2006), destacando a importância destes parâmetros na avaliação dos processos de crioconservação de sêmen de peixes.

O sêmen de *E. marginatus* examinado, após o processo de crioconservação, mostrou uma alta porcentagem de células móveis (96,7%), indicando

que as técnicas empregadas neste estudo foram adequadas na preservação da qualidade espermática. Os valores de motilidade, obtidos neste estudo, foram superiores aos encontrados no sêmen de *Epinephelus malabaricus* por Chao *et al.* (1992) com valores de 40,0% a 60,0%, de *Epinephelus moara* com 42,0% a 52,0% (Miyaki *et al.*, 2005), de *Dicentrarchus labrax* (Fauvel *et al.*, 1999), de *Centropomus undecimalis* (Tiersch *et al.*, 2004) ambos com taxa de motilidade ao redor de 80,0% e ao obtido por Riley *et al.* (2004) com o *Lutjanus campechanus*, ao redor de 95,0%.

Os valores médios do tempo de motilidade espermática obtidos para *E. marginatus*, de 3300 segundos, foram muito superiores aos obtidos para várias outras espécies de peixes marinhos, ao redor de 500 segundos (Billard, 1978), embora valores elevados de tempo de motilidade espermática também tenham sido reportados por Chao *et al.* (1992) para *E. malabaricus*, superiores a 4500 segundos.

Segundo Gwo (2000), quando o sêmen é exposto a temperaturas criogênicas, as características seminais são duramente afetadas e somente podem ser preservadas se, antes do início do congelamento, o sêmen for diluído em soluções adequadas.

De acordo com Foote (1975), um diluente deve apresentar as seguintes funções: prover nutrientes como fonte de energia, possuir um efeito tampão para prevenir mudanças bruscas no pH resultantes do metabolismo dos espermatozoides, manter a pressão osmótica apropriada e inibir o crescimento bacteriano. Legendre & Billard (1980) acrescentam a estas funções uma elevada condutividade térmica e a solubilidade ao crioprotetor.

Muitos diluentes empregados na crioconservação de sêmen de peixes marinhos baseiam-se na sua composição e no plasma sanguíneo e/ou seminal (Rana, 1996). Diversos autores (Lahnsteiner *et al.*, 1997; Chereguini *et al.*, 2001) reportaram uma significativa correlação entre o pH do plasma seminal e a motilidade espermática, sugerindo que o pH possa ser uma importante característica do plasma seminal que influencie a motilidade espermática.

O melhor desempenho para motilidade e tempo de motilidade espermáticas foi obtido com o uso do diluente B com pH ajustado em 7,8 e diluição de 1:3 (v/v). Este resultado concorda com Peleteiro *et al.* (1996) que ressaltaram que na composição dos diluentes para peixes marinhos, o pH e a capacidade de tamponamento merecem atenção especial. Estes mesmos autores afirmaram que diluentes com pH ajustado entre 7,8 e 8,5 (alcalinos) e adequadamente tamponados com substâncias inorgânicas, como fosfatos e/ou bicarbonatos de sódio e/ou de potássio, têm apresentado melhor desempenho na preservação da viabilidade dos espermatozoides, ao contrário de diluentes sem capacidade de tamponamento e com pH ácido ou próximo ao neutro. Ao estudar a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus*, Chao *et al.* (1992) obtiveram sucesso ao empregar um diluente tamponado para pH 8,0, demonstrando a importância do pH básico para a manutenção das características do sêmen. Segundo Gwo (2000) o emprego de diluentes tamponados objetiva impedir que metabólitos produzidos pelos espermatozoides, acumulados no decorrer do processo de congelamento, provoquem mudanças no pH do sêmen, com efeitos deletérios às células espermáticas.

A diluição do sêmen antes do congelamento tem sido recomendada em peixes de água doce e marinhos para otimizar a viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento (Scott & Baynes, 1980). A proporção de sêmen: diluente pode variar de 1:1 a 1:20 (Peleteiro *et al.*, 1996; Suquet *et al.*, 2000) porém, na maioria dos estudos conclui-se por proporções de diluição de 1:3 a 1:6 (Mc Andrew *et al.*, 1993).

Dreanno *et al.* (1997) testaram quatro diluições (1:1, 1:2, 1:4 e 1:9) no sêmen do linguado *Scophthalmus maximus*, não observando diferenças significativas entre elas na motilidade e no tempo de motilidade espermática. Withler & Lim (1982) reportaram resultados promissores com o emprego de uma diluição de 1:24 para sêmen de *E. tauvina*, contrariando o exposto por Gwo (2000) de que altas diluições poderiam estar vinculadas à queda na

sobrevivência dos espermatozóides, aparentemente pela exaustão das células espermáticas provocada pelo “efeito diluição”. Miyaki *et al.* (2005) empregaram proporções de 1:2 e 1:4 na crioconservação do sêmen de *E. moara*, não obtendo diferenças significativas entre as mesmas.

Mazur (1970) afirmou que os efeitos da variação contínua do pH, nos meios intra e extracelular, sobre os espermatozóides, dependem da velocidade de resfriamento empregada ao sêmen. Uma velocidade relativamente baixa predisporia as células a uma perda rápida de água, com desidratação e redução do tamanho e posteriormente, do pH. Por outro lado, uma velocidade muito rápida pode não dispor às células o tempo necessário para concluir o fluxo de água e o equilíbrio dos solutos, favorecendo, ainda, a formação de cristais de gelo no seu interior. Em estudos posteriores, Mazur (1977) demonstrou que durante o descongelamento, o gelo pode se recristalizar, formando blocos maiores que podem danificar/romper as membranas celulares.

De acordo com Suquet *et al.* (2000), a velocidade de congelamento em peixes marinhos pode variar de 8 a 99°C.min<sup>-1</sup>, sendo realizada em duas etapas: a primeira em vapor de nitrogênio e a segunda em nitrogênio líquido. Os resultados deste experimento indicaram que as velocidades de congelamento 90°C.min<sup>-1</sup> e 60°C.min<sup>-1</sup> apresentaram os melhores desempenhos, sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre elas. Porém, pela praticidade e pela maior capacidade de armazenamento de sêmen das palhetas de 0,50mL (que proporcionam a velocidade de congelamento de 60°C.min<sup>-1</sup>), recomenda-se o seu emprego na crioconservação do sêmen de *E. marginatus* em detrimento às palhetas de 0,25mL (que proporcionam a velocidade de congelamento de 90°C.min<sup>-1</sup>).

Withler & Lim (1982) obtiveram resultados adversos empregando a velocidade de 25°C.min<sup>-1</sup> para sêmen de *E. tauvina*. Os resultados obtidos na presente pesquisa concordaram com os obtidos por Chao *et al.* (1992) que, estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus*, obtiveram os melhores resultados ao empregar a velocidade de conge-

lamento de 60°C.min<sup>-1</sup>. Miyaki *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes ao empregar a mesma velocidade na crioconservação do sêmen de *E. moara*.

Os crioprotetores empregados para o sêmen de peixes marinhos foram revisados por Suquet *et al.* (2000) e Gwo (2000). O dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido considerado de baixa toxicidade e eficiente na ação de proteger os espermatozóides durante o resfriamento, reduzindo a formação de gelo por meio da diminuição do ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo (Peleteiro *et al.*, 1996). Segundo Chao & Liao (2001) o DMSO é um dos crioprotetores mais amplamente empregado no congelamento de sêmen. Embora de ação não completamente elucidada, sabe-se que o DMSO interage com os fosfolípidos estruturais da membrana da célula espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo de 0°C (Thirumala *et al.*, 2006).

Para Wayman *et al.* (1997), os melhores resultados no uso de DMSO em sêmen de peixes marinhos têm sido obtidos com concentrações variando de 10% a 20%, embora as mais utilizadas estejam entre 7% e 10% (Billard *et al.*, 1995). Mongkonpunya *et al.* (1995) afirmaram, porém, que o incremento na concentração do DMSO pode provocar redução da motilidade espermática e da vitalidade dos espermatozóides. Neste trabalho os melhores resultados foram obtidos empregando-se uma concentração de DMSO de 5% para o sêmen de *E. marginatus* similar a concentração recomendada por Leung (1987) para o robalo asiático *Lates calcarifer*. Entretanto, os resultados desta pesquisa contrastaram com os resultados obtidos por outros autores para espécies do gênero *Epinephelus*. Withler & Lim (1982) com sêmen de *E. tauvina* e Chao *et al.* (1992) estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus* que obtiveram os melhores resultados empregando uma concentração de 10% de DMSO. Gwo (1993), por sua vez, empregou uma concentração ainda mais alta, de 20%, alcançando bons resultados na crioconservação do sêmen de *E. malabaricus*. Mais estudos em diferentes espécies de *Epinephelus* são necessários para se obter uma visão mais clara sobre esta questão.



## CONCLUSÃO

O sêmen da garoupa-verdadeira *E. marginatus* pode ser crioconservado, sem perda significativa de sua qualidade, empregando-se o diluente B (pH 7,8) na proporção de 1:3 (v/v), com crioprotetor (dimetilsulfóxido) a 5% e em uma velocidade de congelamento de 60°C.min<sup>-1</sup>, proporcionada com o uso de palhetas de 0,50mL.

## REFERÊNCIAS

- Babiak, I.; Brzuska, E. & Perkowski, J. (2000). Fractional factorial design of screening experiments on cryopreservation of fish sperm. *Aquaculture Research*, 31(1):273-82.
- Barreiros, J.P. (1998). Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 5(1):81-90.
- Billard, R. (1978). Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de Colloques du CNEOX*, 8(2):59-73.
- Cerqueira, V.R. Cultivo de peixes marinhos. In: Baldisseroto, B. & Gomes, L.L. (Ed.) 2005. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM. p.369-406.
- Chao, N.H.; Tsai, H.P. & Liao, I.C. (1992). Short and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fisheries Science*, 5(1):103-116.
- Chao, N.H. & Liao, I.C. (2001). Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197(1):161-89.
- Chereguini, O.; Banda, I.G. de La; Rasines, I. & Fernandez, A. (2001). Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. *Aquaculture Research*, 32(1):133-43.
- Cloud, J.G.; Miller, W.H. & Levanduski, M.J. (1990). Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plan and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *Progressive Fish Culturist*, 52(1):51-3.
- Cox, E.; Fry, P. & Johnston, A. (2006). Mesocosm technology advances grouper culture in northern Australia. *Aquaculture Asia Magazine J.*, 36(6):34-6.
- Dreanno, C.; Suquet, M.; Quemener, L.; Cosson, J.; Fierville, F.; Normant, Y. & Billard, R. (1997). Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 48(3):589-603.
- Fauvel, C.; Savoye, O.; Dreanno, C.; Cosson, J. & Suquet, M. (1999). Characteristics of sperm of captive sea bass, *Dicentrarchus labrax* in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, 54(2):356-69.
- Fennessy, S.T. (2006) Reproductive biology and growth of the yellowbelly rockcod *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from South-East Africa. *África Journal of Marine Science*, 28(1):1-11.
- Foote, R.H. (1975). Semen quality from the bull to the freezer. *Theriogenology*, 3(1):219.
- Grier, H. & Neiding, C. (2000). Gonads and gametes of fishes. In: Tiersch, T.R. & Mazik, P.M. (Ed.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society. p.1-12.
- Gwo, J.C. (1993). Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39(2):1331-42.
- Gwo, J.C. (2000). Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Tiersch, T.R. & Mazik, P.M. (Ed.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society. p.138-60.
- Harvey, B. (1982). Cryobiology and the storage of teleost gametes. In: Goos H.J.T. & Richter, J.J. (Ed.) *Proceeding of the international symposium on the reproductive physiology of fish*. World Aquaculture Society. Wageningen, Netherlands. p.123-7.
- Horváth, A.; Urbányi, B.; Mims, S.D.; Bean, W.B.; Giomelsky, B. & Tierch, T.R. (2006). Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathala*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(4):356-62.
- Kuo, C.M.; Ting, Y.Y. & Yeh, S.L. (1988). Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74(1):113-26.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & Patzner, R.A. (1997). Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2ml and 5ml strans for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28(2):471-9.
- Legendre, M. & Billard, R. (1980). Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reproduction, Nutrition, and Development*, 20(3):1859-68.
- Leung, L.K. (1987). Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*, 64(1):243-7.
- Liao, I. C. (1993). Finfish hatcheries in Taiwan. In: LEE, C. S.; Su, M. S. & Liao, I. C. (Ed.). *Finfish hatchery in Asia: proceedings of finfish hatchery in Asia 91*. Tungkang Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, Taiwan. p.1-25.
- Machado, L.F.; Andrade, A.B.; Hostim-Silva, M. & Barreiros, J.P. (2003). Habitat use by the juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* and relative abundance, in Santa Catarina, Brazil. *Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 6(4):133-8.

- Marino, G.; Azzurro, E.; Finoia, M.G.; Messina, M.T.; Massari, A. & Mandich, A. (2000). Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterraneennes*, 47:215-25.
- Marino, G.; Panini, E.; Longobardi, A.; Mandich, A.; Finoia, M.G.; Zohar, Y. & Mylonas, C.C. (2003). Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH<sub>a</sub> implant. *Aquaculture*, 219(3):841-58.
- Mazur, P. (1970). The freezing of biological systems. *Science Cryobiology*. 168(4):939-49.
- Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14(1):251-72.
- McAndrew, B.J.; Rana, K.J. & Penman, D.J. (1993). Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: Muir, J.F. & Roberts, R.J. *Recent advances in aquaculture*. Oxford: Blackwell. v. 4. p.295-336.
- Miyaki, K.; Nakano, S.; Ohta, H. & Kurokura, H. (2005). Cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*) sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Science*, 71(2):457-8
- Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. & Tiersch, T.R. (1995). Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish. *Asian Fisheries Science*, 3(1):211-21.
- Mounib, M.S.; Hwang, P.C. & Idler, D.R. (1968). Cryogenic preservation of Atlantic cod *Gadus morhua* sperm. *Journal of the Fisheries*, 25(3):2623-32.
- Peleteiro, J.B.; Chereguini, O. & Cal, R.M. (1996). Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). *Informe Técnico Del Instituto Espanol de Oceanografía*, 162(1):1-13.
- Rana, K.J. (1996). Preservation of gametes. In: Bromage, N.R. and Roberts, R.J. *Broodstock Management and egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science. p.53-75.
- Riley, K., L., Holladay, C.G., Chesney, E.J. & Tiersch, T. R. (2004). Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, 238(1):183-94.
- Rocha, L.O.F. & Costa, P.A.S. (1999). Manual de identificação de peixes marinhos para a costa central. Rio de Janeiro: Revizee.
- Sadovy, Y. & Colin, P.L. (1995). Sexual development and sexuality in the Nassau grouper. *Journal of Fish Biology*, 46(3):961-76.
- Salisbury, G.W. & Vandemark, N.L. (1964). *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos*. Zaragoza: Acribia. 707p.
- Sanches, E.G.; Henriques, M.B. & Fagundes, L. (2006). Viabilidade econômica do cultivo da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) em tanques-rede, região Sudeste do Brasil. *Informações Econômicas*, 36(8):15-25.
- Sanches, E.G. (2006). Boas perspectivas para o cultivo de meros, garoupas e badejos no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, 16(93):44-51.
- Sanches, E. G. (2007). Piscicultura marinha no Brasil: uma alternativa de produção e conservação. *Revista Aquicultura e Pesca*, 14(4):16-22.
- Scott, A.P. & Baynes, S.M. (1980). A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 17(3):707-39.
- Spedicato, M.T.; Lembo, G.; Di Marco, P. & Marino, G. (1995). Preliminary results in breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterraneennes*, 16(1):131-48.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. & Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(1):231-43.
- Tiersch, T.R. (2000). Introduction. In: Tierch, T.R. & Mazik, P.M. (Ed). *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana: Word Aquaculture Society. p. xix-xxvi.
- Tierch, T. R., Waymann, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L. & Grier, H.J. (2004). Transport and cryopreservation of sperm of the common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research*, 35(1):278-88.
- Thirumala, S.; Campbel, W.T.; Vicknair, M.R.; Tiersch, T.R. & Devireddy, R.V. (2006). Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, 66(3):964-73.
- Tucker, J.W., Jr. & Fitzgerald, W.J. (1994). Induced spawning in two Western Tropical Pacific groupers, *Plectropomus areolatus* and *Epinephelus fuscoguttatus*, in Palau. *Asian Fisheries Science*, 7(1):57-62.
- Wayman, W.R.; Thomas, R.G. & Tiersch, T.R (1997). Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 47(4):1519-29.
- Wayman, W.R. & Tiersch, T.R (2000). Research methods for cryopreservation of sperm. In: Tiersch, T.R. & Mazik, P.M (Ed.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.264-79.
- Withler, F.C. & Lim, L.C. (1982). Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, 37(2):389-92.
- Zabala, M.; Garcia-Rubies, A.; Louisy, P. & Sala, E. (1997) Spawning behavior of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61(1):65-77.

Recebido em: 25/3/2008

Versão final reapresentada em: 17/6/2008

Aprovado em: 12/8/2008