

1 **Efeito do sistema de incubação sobre a viabilidade de embriões de**
2 ***Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) em condições laboratoriais***

3
4 Wladimir Thiago de Paula Polese^{1,2,‡}, Renan Gustavo Rodrigues da Luz^{1,2},
5 Thayzi de Oliveira Zeni^{1,3}, Giorgi Dal Pont^{1,4} e Antonio Ostrensky^{1,5}

6
7
8 ¹Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, Departamento de
9 Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

10 ²Graduando em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do
11 Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

12 ³Doutorando do Programa de pós-graduação em Zoologia, Departamento de Ciências
13 Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

14 ³Doutorando do Programa de pós-graduação em Zootecnia, Departamento de
15 Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

16 ⁴Professor Adjunto, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná,
17 Curitiba, Paraná, Brasil.

18
19
20
21
22
23
24

*Artigo redigido de acordo com as normas da revista "Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology".

‡Autor para correspondência: wladthiago@gmail.com

1 **Abstract**

2 The successfully production of any species of fish depends on the
3 comprehension of its biology, that includes specific characteristics of the
4 fertilization process that interfere in the hatching rate of the *larvae*. Despite
5 many fresh water species being used for laboratory purposes, there are few
6 information about Brazilian native species. The aim of the this study was
7 compare effects of reproductive period on the the releasing of the
8 matrixes`soocytes under the hormonal induction procedure and evaluate, in
9 laboratory, the effects of the usage of two types of hatching systems on the
10 *Astyanax altiparanae* embryo`s viability. One of the hatching system was made
11 out of polyenthlene terephthalate (PET) bottles, and the other one out of beaker
12 cups. The experiments were conducted between the months of March and May
13 of 2015 and consisted of selecting the players for posterior hormonal induction
14 with carp hypophysis solution. After the induction, the animals were submitted
15 to 200 degrees hour and then the fecundation of the oocytes was made, after
16 that the eggs were allocated in the hatchers in 1 g of eggs per liter of water. The
17 fecundation rate was evaluated between 5 and 6 hours after the hormonal
18 induction and, the hatching rate was measured 18 after the fecundation rate
19 was taken. Both the fecundation, hatching and occurrence of defective *larvae*
20 didn`t show statistic difference between the treatments, however, differences
21 occurred in the previous rates between the experiments 1,2 and 4 compared to
22 the experiment 5, justified for the end of the reproductive period associated with
23 the reduction of temperature and photoperiod.

24

25

1 **Introdução**

2 No Brasil, apesar da imensa biodiversidade de peixes nativos, a maioria
3 das espécies dulcícolas utilizadas para aquicultura são exóticas (Resende et
4 al., 2010). Essa máxima também se aplica para espécies de peixes utilizadas
5 em ensaios laboratoriais. Uma espécie nativa que apresenta diversas
6 características morfológicas e reprodutivas interessantes, do ponto de vista da
7 sua utilização como isca viva (Metzener et al., 2004), para consumo humano, e
8 utilização em pesquisas laboratoriais, é o *Astyanax altiparanae*. Popularmente
9 conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, é uma espécie de pequeno porte
10 que apresenta período reprodutivo prolongado, de setembro a março (Vazzoler,
11 1996, Nakatani et al., 2001). Além disso, apresenta crescimento rápido,
12 podendo chegar à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade
13 (Garutti & Britski, 2000, Nakatani et al., 2001), fato este que também viabiliza e
14 facilita sua produção e utilização em laboratório (Dal Pont, 2012).

15 O sucesso na produção de qualquer espécie de peixe depende da
16 compreensão de sua biologia. Isso inclui características específicas do
17 processo de fertilização e desenvolvimento embrionário. Uma vez que o
18 desenvolvimento ontogenético durante o processo de fecundação, embrionário
19 e nos primeiros estádios larvais é bastante complexo e acelerado, a ocorrência
20 de alterações nesses processos influenciarão diretamente nas taxas de
21 fertilização dos ovócitos, eclosão das larvas (Matkovic et al., 1985) e,
22 conseqüentemente, no sucesso da espécie no ambiente ou no número de
23 exemplares obtidos em condições laboratoriais.

24 As características físicas e químicas da água também se caracterizam
25 como parâmetros essenciais para a larvicultura (Calado et al., 2008). Tais

1 características precisam estar em perfeito equilíbrio com as exigências da
2 espécie a ser produzida, permitindo, assim, o desenvolvimento dos embriões
3 (Woynarovich & Horváth, 1983). Nesse sentido, em condições laboratoriais, a
4 utilização de incubadoras de menor porte pode auxiliar no aumento da taxa de
5 eclosão, devido ao maior controle do fluxo de renovação de água (Calado et
6 al., 2008). Por outro lado, é fundamental que a pressão exercida pela coluna
7 d'água e a profundidade da incubadora estejam de acordo com as
8 necessidades da espécie, pois podem causar estresse limitando a natação
9 vertical das larvas.

10 Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi comparar o efeito do
11 período reprodutivo sobre a liberação de ovócitos de matrizes submetidas ao
12 processo de indução hormonal e avaliar, em laboratório, o efeito da utilização
13 de dois sistemas de incubação sobre a viabilidade de embriões de *A.*
14 *altiparanae*.

15 **Material e Métodos**

16 ***Aquisição e manutenção dos peixes***

17 Exemplos de *A. altiparanae* foram adquiridos na Central de
18 Abastecimento do Paraná S/A (Ceasa), em Curitiba, PR, Brasil, e transportados
19 em sacos plásticos contendo 1/3 de água e 2/3 de oxigênio, até o Laboratório
20 de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de
21 Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná
22 (UFPR) em Curitiba, PR. No laboratório, os animais foram submetidos a
23 manejo profilático (imersão em solução de sal iodado 6 g/L por duas horas) e
24 aclimatados às condições de temperatura e pH dos tanques de aclimação.

1 Após aclimatação, os peixes foram transferidos para tanques de
2 manutenção (1000L), equipados com sistema fechado de filtragem física e
3 biológica. Os tanques de manutenção possuíam aeração constante e
4 temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Diariamente, os animais foram alimentados,
5 *ad libitum*, com ração comercial extrusada, contendo 45% de proteína bruta.

6

7 ***Sistema de recirculação de água***

8 Dois sistemas de recirculação de água foram construídos para a
9 execução dos experimentos. Cada sistema possuía uma caixa central (70L)
10 equipada com filtros mecânicos e biológicos, aquecedor de 300 watts (BOYU,
11 Taiwan), filtro com luz ultravioleta e bomba submersa (SB2000, Sarlobetter,
12 Brasil) que realizava recirculação de água para seis aquários de vidro (40L), os
13 quais possuíam aeração constante. Durante os períodos experimentais, um
14 dos sistemas era utilizado para o acondicionamento de machos e fêmeas,
15 separadamente, e posterior fecundação dos ovos, e o outro sistema era
16 utilizado para verificação da eficiência das incubadoras testadas.

17

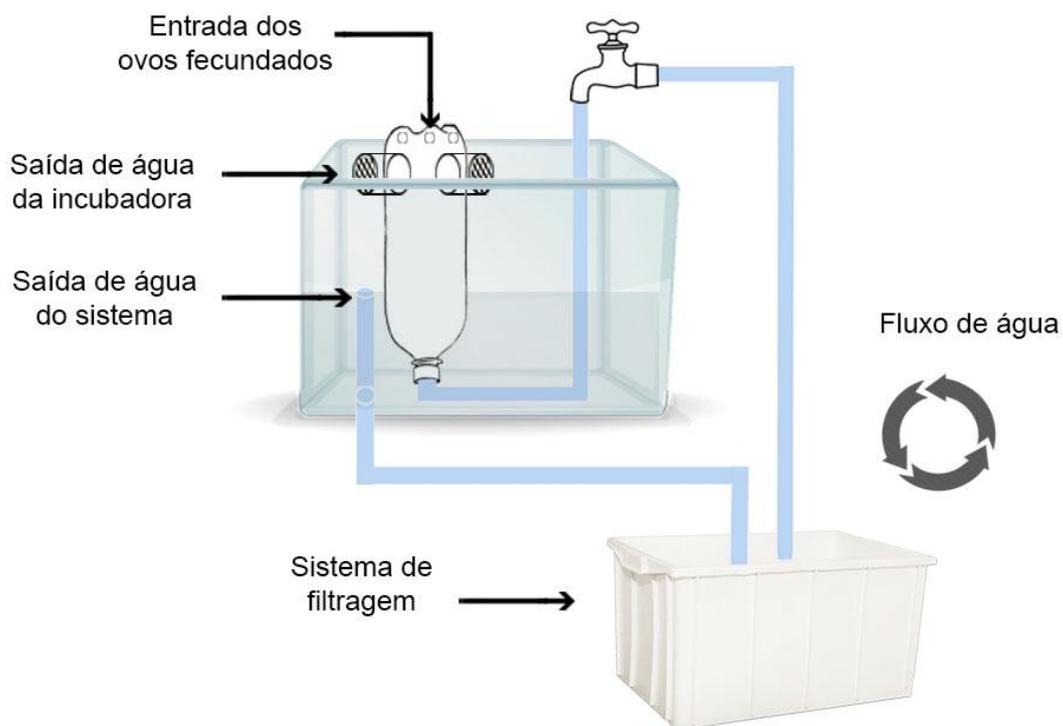
18 ***Sistemas de incubação***

19 Os sistemas de incubação foram confeccionados a partir de garrafas de
20 politereftalato de etileno, também conhecido como PET. Para isso, foram
21 utilizadas garrafas descartáveis transparentes, com volume total de 2L. A parte
22 superior da garrafa foi utilizada como base da incubadora. Nesta, foi acoplado
23 um suporte (adaptador para cano PVC) para dar sustentação ao protótipo.
24 Além de sustentação, o adaptador PVC foi conectado ao sistema de

1 recirculação de água, permitindo a entrada, circulação e renovação de água
2 dentro da incubadora.

3 Próximo ao topo da incubadora, ou base da garrafa PET, foram feitas
4 duas aberturas onde foram fixados dois canos de PVC (5cm) que permitia a
5 saída de água. Para evitar a perda dos embriões, foi fixada a saída de água
6 redes de material plástico com malha de 0,5mm. Próximo ao topo da
7 incubadora também foram feitos dois furos, pelos quais foram anexados fios de
8 aço galvanizado para auxiliar a sustentação da incubadora dentro do aquário.
9 Também foram feitos pequenos furos no topo da incubadora por onde, durante
10 a execução dos experimentos, os ovos fecundados foram inseridos com auxílio
11 de pipeta Pasteur.

12 Após a confecção e instalação no aquário, cada incubadora PET
13 apresentou volume interno de 1,7L (Figura 1).

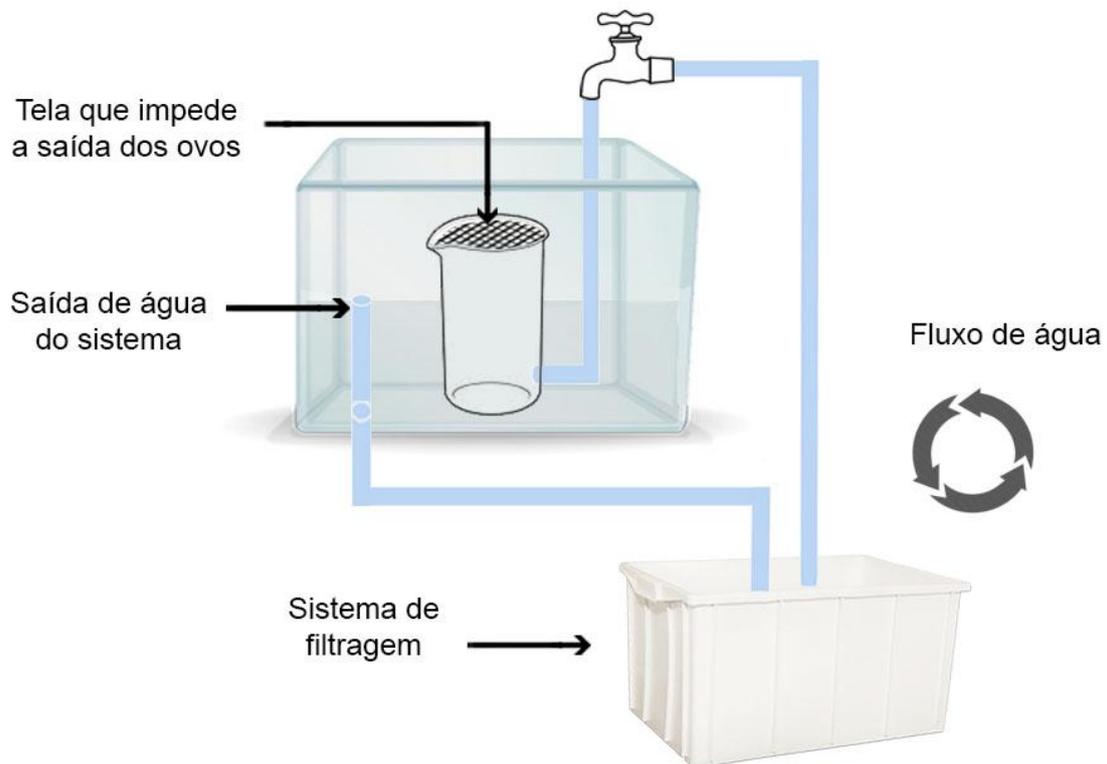


14

1 Figura 1. Ilustração da incubadora utilizada, construída com garrafas PET. Sistema de
2 incubação inserido em aquário de vidro acoplado a sistema de recirculação de água.

3

4 Além das incubadoras PET, também foi utilizado outro sistema,
5 construído a partir de copos tipo béquer de polipropileno, com capacidade de
6 1,3L, comumente utilizados em laboratório. Pela região inferior lateral, cada
7 béquer foi conectado ao sistema de circulação de água e, na abertura superior,
8 foi fixada uma malha de 0,5mm a fim de proporcionar adequada renovação de
9 água sem perda dos embriões (Figura 2).



10

11 Figura 2. Ilustração do sistema de incubação, construído a partir da adaptação de copo tipo
12 béquer. Sistema de incubação inserido em aquário de vidro acoplado a sistema de recirculação
13 de água

14

1 **Seleção de reprodutores**

2 A sexagem dos animais foi realizada pela verificação da aspereza ao
3 toque apresentado na nadadeira anal dos machos em detrimentos às fêmeas.
4 Já a escolha dos indivíduos submetidos ao processo de indução hormonal foi
5 realizada por meio da identificação de características morfológicas
6 relacionadas ao estágio de desenvolvimento gonadal: machos apresentando
7 abdômen bem desenvolvido e fêmeas apresentando ventre abaulado e poro
8 urogenital dilatado e avermelhado.

9 Para cada fêmea foi calculado o fator de condição (FC), para
10 identificação da viabilidade reprodutiva. O fator de condição geralmente
11 relaciona a massa e o comprimento de indivíduos, indicando as condições
12 nutricionais, ou nesse caso, reprodutiva da espécie (Lima-Junior & Goitein,
13 2000). O FC foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$14 \qquad \qquad \qquad FC = (P/CT^3) \times 100$$

15 Onde:

16 P = peso da fêmea em gramas

17 CT = comprimento total em centímetros

18

19 **Indução hormonal e obtenção dos embriões**

20 Cinco experimentos independentes foram realizados entre os meses de
21 março (1º= 21/03/2015), abril (2º= 20/04/2015, 3º= 30/04/2015) e maio (4º=
22 01/05/2015; 5º= 14/05/2015) para a comparação e avaliação da ocorrência de
23 liberação dos ovócitos e dos sistemas de incubação. Para isso, em cada
24 experimento, cerca de quatro horas antes do procedimento de indução

1 hormonal, os reprodutores foram sexados, selecionados e acondicionados no
2 sistema de recirculação de água.

3 No procedimento de indução hormonal, os reprodutores foram
4 anestesiados, individualmente, em solução de óleo de cravo (35µl/L) (Vicente,
5 2014), pesados e medidos sendo, posteriormente, realizada injeção
6 intraperitoneal de solução de extrato hipofisário de carpa (100µl/g de peso
7 vivo)(Baldisserotto, 2013).

8 Imediatamente após a indução, e ainda sob efeito anestésico, todas as
9 fêmeas passaram por processo de sutura do poro urogenital, segundo
10 metodologia descrita por (Lima et al., 2013). A realização da sutura possibilita a
11 padronização do momento de liberação dos ovócitos. Após a sutura, os peixes
12 foram acondicionados em aquários de vidro (40L), na proporção três machos e
13 uma fêmea, onde foram mantidos por 200 horas/grau. Ao final desse período
14 as suturas foram retiradas para liberação e fecundação dos ovócitos.

15 Após a liberação dos ovócitos, os animais foram mantidos no aquário
16 por mais 15 minutos, para garantir que os machos fossem estimulados a
17 realizar a fecundação. Ao final desse período, para evitar a predação dos
18 embriões, os reprodutores foram transferidos para tanque de recuperação
19 (1000L).

20 Após a fecundação, os embriões foram sifonados, filtrados (malha 0,5
21 mm) e agrupados em um *pool* de diferentes fêmeas. Após a formação do *pool*,
22 amostras foram pesadas para acondicionamento nas incubadoras PET e
23 béqueres. Foi utilizada uma densidade de 1g de embriões por litro de água
24 (Sato et al., 2006). Para determinação da taxa de fertilização dos ovos, foram
25 coletadas amostras de 100 embriões por repetição de cada tratamento, entre 5

1 e 6 horas após a fertilização. Em cada amostragem, todos os ovócitos
2 fecundados foram contabilizados.

3 A taxa de eclosão foi avaliada 24 horas após a fertilização (Nakatani et
4 al., 2001). Nas amostras (100 unidades/repetição) coletadas foram
5 contabilizadas as larvas eclodidas viáveis. Além do número de larvas eclodidas
6 viáveis, foram contabilizadas as larvas que apresentavam deformidades
7 morfológicas e/ou natação errática (Okamoto, 2004).

8 ***Qualidade da água dos sistema***

9 Durante a realização dos experimentos, amostras (100ml) de água foram
10 coletadas diretamente das incubadoras PET e béqueres, anteriormente ao
11 acondicionamento dos ovos. Foi mensurada a temperatura (°C), pH (pHmetro
12 AZ86505) e a concentração de oxigênio dissolvido (mg/L) dissolvido (mg/L)
13 (oxímetro digital, YSI 550A), nitrito e nitrogênio na forma de amônia total (N-AT
14 = $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) (Apha, 1995). Além disso, foi calculada a concentração de
15 nitrogênio na forma de amônia gasosa (N-NH₃) de acordo com a metodologia
16 descrita por Ostrensky et al. (1992).

17 Os mesmos parâmetros de água foram mensurados ao final do período
18 experimental, após a análise da taxa de eclosão, para avaliação de possíveis
19 alterações nos parâmetros de qualidade de água.

20

21 ***Análises estatísticas***

22 Após a organização em planilhas Excel[®] os dados foram submetidos a
23 análise estatística pelo *software* Statistica[®] 7.0. Para determinação do padrão

1 de distribuição, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de
2 Shapiro-Wilk. Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 Análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey (dados
4 paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos) foram
5 utilizados para a comparação dos dados de fertilidade entre os diferentes
6 experimentos. Os tratamentos foram comparados pelo teste t e Mann-Whitney
7 quando apresentaram distribuição paramétrica ou não-paramétrica,
8 respectivamente (Zar, 1984).

9

10 Resultados

11 Dentre os parâmetros de qualidade de água mensurados, somente a pH
12 apresentou variação significativa ($p < 0,05$) entre o início e o final do
13 experimento (Tabela1), apresentando água com pH mais próximo a
14 neutralidade após o período de incubação.

15 Tabela1. Média \pm desvio padrão dos parâmetros de qualidade (pH, nitrogênio na forma de
16 amônia total [N-AT= $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$], nitrogênio na forma de amônia gasosa [AG= N-NH_3], nitrito,
17 oxigênio dissolvido [O_2] e temperatura) de água dos diferentes sistemas utilizados para a
18 incubação de embriões de *Astyanax altiparanae* em laboratório.

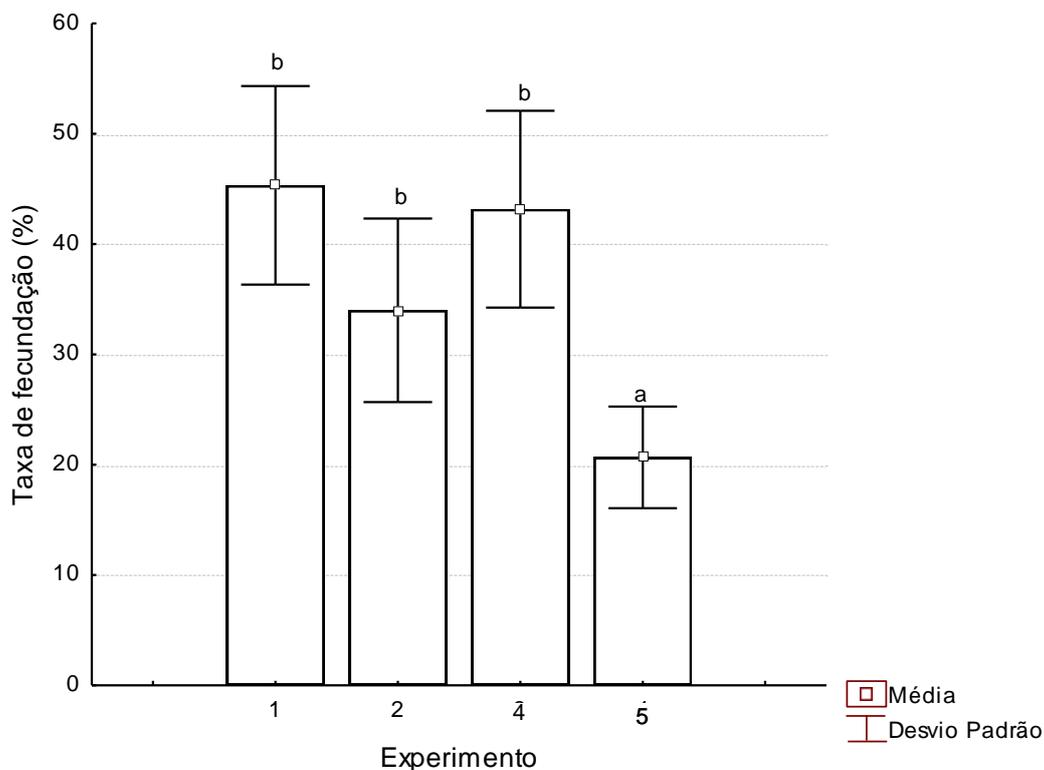
Parâmetro	Tratamento – Sistema de Incubação			
	PET		Béquer	
	Antes	Depois	Antes	Depois
pH	8,09 \pm 0,01 ^a	7,71 \pm 0,15 ^b	8,10 \pm 0,04 ^a	7,91 \pm 0,09 ^b
N-AT (mg/L)	0,046 \pm 0,002	0,051 \pm 0,0063	0,037 \pm 0,0072	0,048 \pm 0,0011
AG (mg/L)	0,003 \pm 0,0002	0,001 \pm 0,0005	0,002 \pm 0,0006	0,002 \pm 0,0004
Nitrito (mg/L)	0,03 \pm 0,0005	0,04 \pm 0,0015	0,03 \pm 0,0005	0,04 \pm 0,0018
O_2 (mg/L)	7,0 \pm 0,13	7,2 \pm 0,24	7,1 \pm 0,05	7,2 \pm 0,28
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	24,4 \pm 0,15	25,1 \pm 0,10	24,2 \pm 0,17	25,2 \pm 0,15

19

1 Das seis matrizes induzidas no terceiro experimento (30/04/15), somente
2 em duas foi observada a liberação de ovócitos. Dessa forma, não foi obtida
3 massa de ovócitos suficientes para a transferência para os sistemas de
4 incubação testados. Por esse motivo, os dados do terceiro experimento foram
5 utilizados para a determinação do FC.

6 Uma vez que os sistemas de incubação foram comparados em quatro
7 experimentos (não incluído o terceiro), ou seja, em quatro procedimentos de
8 indução hormonal diferentes, as taxas de fecundação, entre os experimentos,
9 foram comparadas (Figura3). A taxa de fecundação do quinto experimento foi
10 significativamente ($p < 0,05$) menor que a observada para os demais
11 procedimentos de indução. Por esse motivo, os resultados do experimento
12 cinco não foram considerados para a comparação dos sistemas de incubação.

13



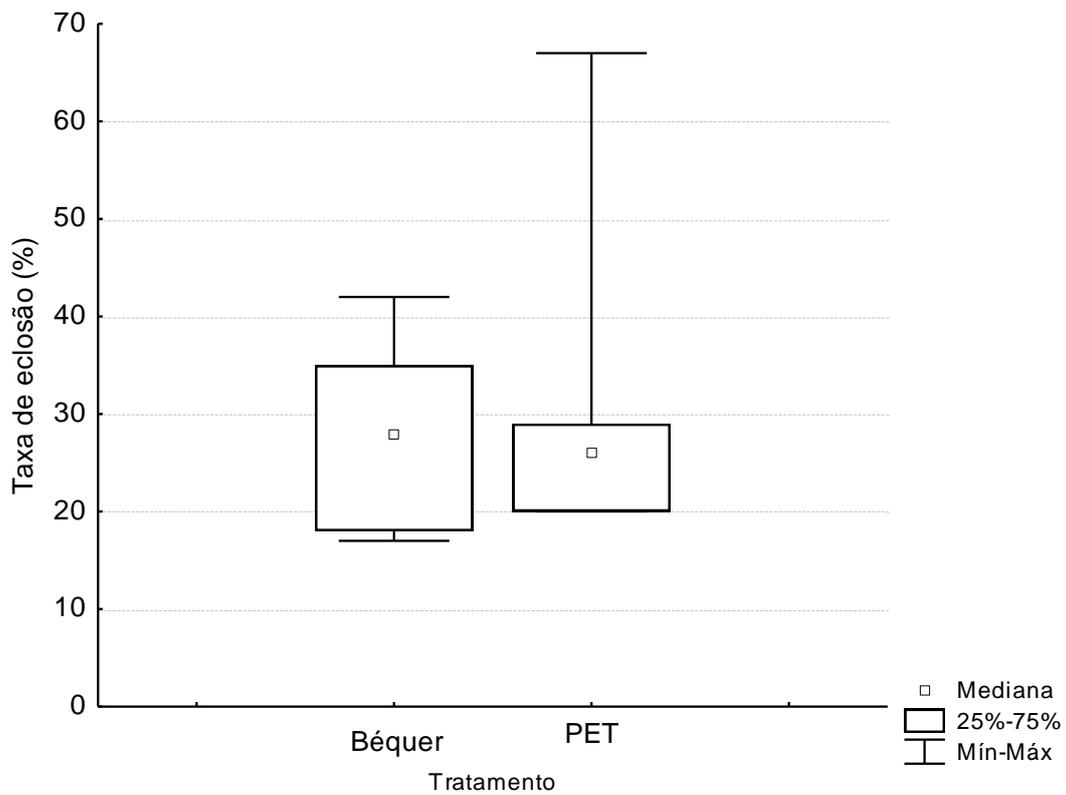
1

2 Figura3. Taxa de fecundação (média ± desvio padrão) de embriões de *Astyanax altiparanae*
 3 obtidos após indução hormonal e desova semi-natural em condições laboratoriais. Letras
 4 indicam diferenças significativas pelo teste de comparação de médias (ANOVA) seguido de
 5 post-teste de Tukey ($p < 0,05$).

6

7 A comparação das taxas de eclosão (Figura4) e de larvas defeituosas
 8 (Figura 5), entre os dois tratamentos, demonstram que não houve diferença
 9 significativa ($p > 0,05$) entre os dois sistemas de incubação testados. Tanto os
 10 sistemas construídos com PET como os construídos a partir de copos tipo
 11 béquer, apresentaram o mesmo desempenho durante o desenvolvimento
 12 embrionário de *A. altiparanae*.

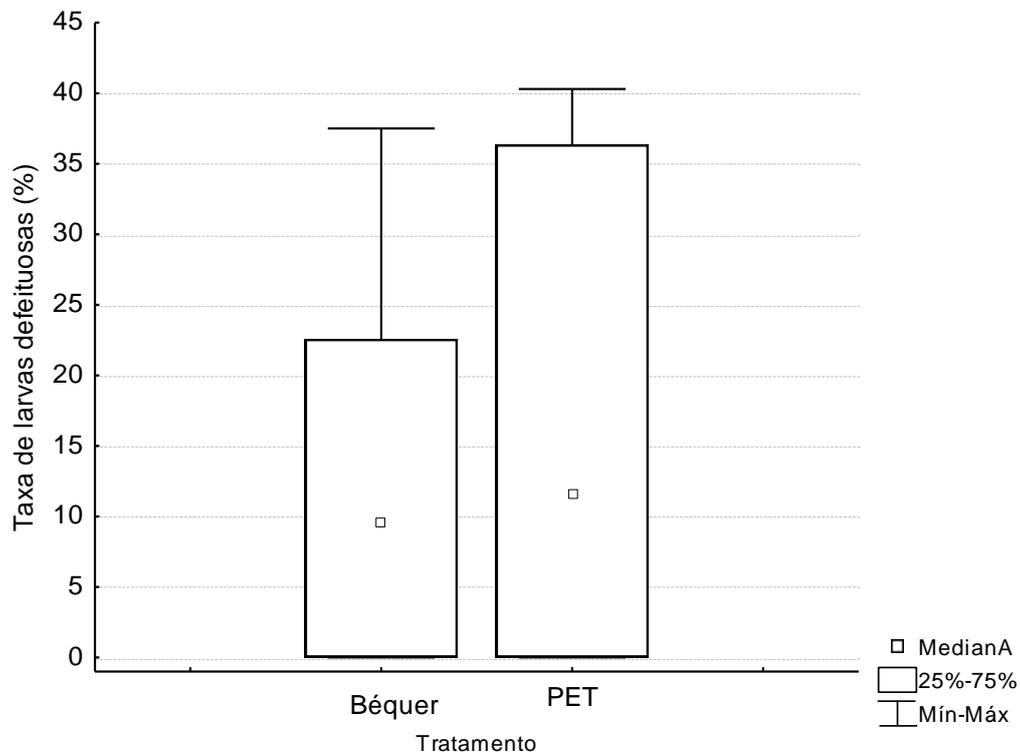
13



1

2 Figura4. Taxa de eclosão de larvas de *Astyanax altiparanae*, obtidas em laboratório, e
 3 submetidas ao processo de incubação em sistemas confeccionados com garrafas PET e copos
 4 tipo béquer. Tratamentos comparados pelo teste de Kruskal-Wallis.

5



1

2 Figura 5. Mediana (mínimo-máximo) da taxa de larvas defeituosas de *Astyanax altiparanae*,
 3 obtidas em laboratório, e submetidas ao processo de incubação em sistemas confeccionados
 4 com garrafas PET e copos tipo béquer. Tratamentos comparados pelo teste de Kruskal-Wallis.

5

6 No primeiro experimento, realizado em março, 100% das matrizes
 7 realizou a liberação de ovócitos após a indução hormonal. Já nos demais
 8 experimentos, apenas 45% das matrizes liberaram ovócitos. No terceiro
 9 experimento apenas 33% das fêmeas liberaram ovócitos e após a utilização do
 10 fator de condição, como critério de seleção, voltou-se a obter massa suficiente
 11 de ovócitos para continuidade dos experimentos.

12 **Discussão**

13 Os dois sistemas de incubação testados apresentaram a mesma eficácia
 14 no desenvolvimento embrionário da espécie estudada. Isso pode estar
 15 relacionado ao fato de que ambos os sistemas foram construídos de maneira a

1 promover aeração adequada dos embriões. De fato, Woynarovich, (1986)
2 considera a aeração como um dos fatores de maior importância para garantia
3 de uma taxa de eclosão elevada e da não-ocorrência de larvas defeituosas.

4 Além disso, apesar da variação do pH ao final do período experimental,
5 o valor observado (>7,0) possivelmente não foi suficientes para interferir nas
6 taxas de eclosão e larvas defeituosas observadas. A redução do pH dos
7 sistemas de incubação reflete a degradação da matéria orgânica inserida no
8 sistema (Thurston et al., 1981) (ovos e tecidos embrionário) no início dos
9 experimentos.

10 Apesar dos sistemas de incubação terem apresentado a mesma taxa de
11 eclosão, os valores observados, assim como a taxa de fecundação, podem ser
12 considerados baixos quando comparados a outros trabalhos onde incubadoras
13 de materiais alternativos foram testadas. Isso pode estar relacionado a
14 densidade de embriões utilizados.

15 A densidade testada no presente trabalho foi descrita para sistemas de
16 incubação de 20L (Sato et al., 2006), normalmente utilizados em cenários de
17 produção para fins comerciais. Nesse contexto, Calado et al. (2008), testando a
18 influência da densidade sobre a taxa de eclosão de embriões de tilápia do Nilo,
19 também em incubadoras confeccionadas a partir de garrafas PET, obteve
20 melhores resultados utilizando a densidade de 250 embriões/L. Considerando o
21 peso do embrião fecundado de, aproximadamente, 0,0002g, no presente
22 trabalho a densidade utilizada foi de aproximadamente 5.600 e 4.300
23 embriões/L nos sistemas PET e béquer, respectivamente. Dessa forma,
24 sugere-se que novos experimentos sejam conduzidos a fim de avaliar a
25 influência da densidade sobre a taxa de eclosão para os dois sistemas de

1 fecundação testados e, dessa forma, melhorar os índices reprodutivos para
2 obtenção de larvas de *A. altiparanae*.

3 A taxa de fecundação também pode ser influenciada pela manipulação a
4 qual os embriões são submetidos. Mazumder et al. (1988) e Einum & Fleming
5 (2000) observaram que a manipulação dos ovócitos e embriões teve influência
6 na taxa de fecundação da Perca Amarela (*Perca fluviatilis*) e do Salmão do
7 Atlântico (*Salmo Salar*), respectivamente.

8 A menor ocorrência na liberação de ovócitos coincide com o final do
9 período reprodutivo descrito para a espécie (Vazzoler, 1996, Nakatani et al.,
10 2001). Dessa forma, acredita-se que mesmo em condições laboratoriais
11 controladas de temperatura, os exemplares de *A. altiparanae* utilizados
12 estavam apresentando processo de regressão gonadal. Apesar desse período
13 de regressão, ao qual os machos e fêmeas estão suscetíveis, ocorrer nos
14 períodos de temperaturas mais amenas, ele também coincide com o período
15 de menor luminosidade. Por esse motivo, acredita-se que a ocorrência de um
16 maior número de fêmeas e machos em regressão do estágio de maturação
17 gonadal, nos experimentos 2, 3, 4 e 5, pode ser resultado da influência da
18 menor incidência luminosa característica dos meses mais frios.

19 Por outro lado, é importante salientar que mesmo em estágio de
20 regressão avançada, por meio do processo de indução hormonal e com a
21 utilização dos sistemas de incubação testados, foi possível a eclosão de
22 aproximadamente 28% dos embriões fecundados. Do ponto de vista de cultivo
23 esse valor pode ser considerado baixo, porém, essa taxa viabiliza a produção
24 de embriões para ensaios em condições laboratoriais.

1 Conclusão

2 Mesmo em condições laboratorias controladas de temperatura, para
3 realização de reprodução induzida em *Astyanax altiparanae*, deve-se
4 considerar a sazonalidade reprodutiva apresentada pela espécie. Ambos
5 sistemas testados, incubadora PET e copo tipo béquer, apresentaram o mesmo
6 desempenho para a incubação de embriões de *Astyanax altiparanae* em
7 condições laboratorias.

8

9 Referências

- 10 Vazzoler, A.E.M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e
11 prática. EDUEM, Maringá/PR - Brasil, 169p.
- 12 Nakatani, K., Agostinho, A.A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P.V.,
13 Makrakis, M.C. & Pavanelli, C.S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce:
14 Desenvolvimento e manual de identificação. Editora da Universidade Estadual
15 de Maringá, Maringá/PR - Brasil,
- 16 Garutti, V. & Britski, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *astyanax*
17 (teleostei: Characidae) da bacia do alto rio paraná e considerações sobre as
18 demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e
19 Tecnologia. 13(65-88).
- 20 Dal Pont, G. 2012. Toxicidade do óleo diesel para o peixe *astyanax altiparanae*.
21 Dissertao de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 112p.
- 22 Matkovic, M., Cussac, V.E., Cukier, M., Guerrero, G.A. & Maggese, M.C. 1985.
23 Desarrollo embrionario de *janeiro*(valencieness, 1840) eigenmann y
24 eigenmann, 1888 (pisces, pimelodidae). I. Segmentacin, morfognesis y
25 organognesis temprana. Rev Bras Biol. 45(1-2): 149-160.
- 26 Calado, L.L., Yasui, G.S., Filho, O.P.R., Santos, L.C.D., Shimoda, E. & Junior,
27 M.V.V. 2008. Densidades de incubacio de ovos de tilápia do nilo (*oreochromis*
28 *niloticus*) em sistema alternativo. Ciência Animal. 18(2): 75-80.
- 29 Woynarovich, E. & Horváth, L.A. 1983. A propagao artificial de peixes de
30 guas tropicais: Manual de extensão. FAO, Brasília, 220p.
- 31 Lima-Junior, S.E. & Goitein, R. 2000. Fator de condio e ciclo gonadal de
32 fêmeas de *pimelodus maculatus* (osteichthyes, pimelodidae) no rio piracicaba
33 (sp, brasil). Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo. 32(1): 87-94.
- 34 Vicente, A.L. 2014. Uso de óleos essenciais e de compostos sintticos como
35 agentes anestticos para o lambari *astyanax altiparanae* (garutti & britski,
36 2000). Dissertao de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 83p.
- 37 Baldisserotto, B. 2013. Fisiologia de peixes aplicada  piscicultura. 3a Edio.
38 Editora UFMS, Santa Maria/RS, 349p.
- 39 Lima, A.F., Moro, G.V., Kirschnik, L.N.G. & Barroso, R.M. 2013. Reproduo,
40 larvicultura e alevinagem de peixes. In: Rodrigues, A.P.O., et al. (ed.)

- 1 Piscicultura de água doce – multiplicando conhecimentos. Editora EMBRAPA
2 Brasília/DF. 427pp.
- 3 Sato, Y., Sampaio, E.V., Fenerich-Verani, N. & Verani, J.R. 2006. Biologia
4 reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de characidae
5 (osteichthyes, characiformes) da bacia do são francisco, minas gerais, brasil.
6 Rev Bras Zool. 23(1): 267-273.
- 7 Okamoto, M.H. 2004. Efeito da temperatura sobre ovos e larvas do linguado
8 paralichthys orbignyanus. Universidade Federal do Rio Grande. 27p.
- 9 Ostrensky, A., Marchiori, M.A. & Poersch, L.H. 1992. Toxicidade aguda da
10 amônia no processo produtivo de pós-larvas de *penaeus paulensis* Pérez-
11 farfante, 1967. An Acad Bras Cienc. 64(4): 383-389.
- 12 Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. 2nd. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs,
13 718p.
- 14 Thurston, R.V., Russo, R.C. & Vinogradov, G.A. 1981. Ammonia toxicity to
15 fishes. Effect of ph on the toxicity of the un-ionized ammonia species. Environ
16 Sci Technol. 15(8):37-840.
- 17 Mazumder, A., Mcqueen, D.J., Taylor, W.D. & Lean, D.R.S. 1988. Effects of
18 fertilization and planktivorous fish (yellow perch) predation on size distribution of
19 particulate phosphorus and assimilated phosphate: Large enclosure
20 experiments1. Limnol Oceanogr. 33(3): 421-430.
- 21 Einum, S. & Fleming, I.A. 2000. Selection against late emergence and small
22 offspring in atlantic salmon (*salmo salar*). Evolution. 54(2): 628-639.
- 23