



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL (RECURSOS
HÍDRICOS)**

OSCAR PACHECO PASSOS NETO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS 17 β -
ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL NO DESENVOLVIMENTO DA TILÁPIA DO
NILO (Piscis)**

**FORTALEZA
2020**

OSCAR PACHECO PASSOS NETO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS 17 β -
ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL NO DESENVOLVIMENTO DA TILÁPIA DO
NILO (Piscis)

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil (Recursos Hídricos) da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil (Recursos Hídricos). Área de concentração Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Suetônio Bastos Mota

Coorientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos

FORTALEZA
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P322a Passos Neto, Oscar Pacheco.
Avaliação do efeito dos desreguladores endócrinos 17beta-estradiol e 17alfa-etinilestradiol no desenvolvimento da tilápia do Nilo (Piscis) / Oscar Pacheco Passos Neto. – 2020.
118 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Suetônio Bastos Mota.
Coorientação: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.
1. Poluentes emergentes. 2. Oreochromis niloticus. 3. Disruptores endócrinos. 4. Interferentes endócrinos. 5. Estrogênios ambientais. I. Título.

OSCAR PACHECO PASSOS NETO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS 17 β -
ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL NO DESENVOLVIMENTO DA TILÁPIA DO
NILO (Piscis)

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil (Recursos Hídricos) da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil (Recursos Hídricos). Área de concentração Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 29 de janeiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Suetônio Bastos Mota (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marisete Dantas de Aquino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Cléa Brito de Figueirêdo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dr. Pedro Henrique Augusto Medeiros
Instituto Federal de Educação do Ceará

Aos meus pais Oscar Júnior e Carmensita
Passos
À minha esposa Daniele Marques
À minha filha Isis Marques Passos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e acima de tudo, agradeço aos meus pais, Oscar Pacheco Passos Júnior e Carmensita Matos Braga Passos, por terem propiciado a mim a educação que me preparou para tudo que enfrentei até hoje na vida.

À minha esposa, Daniele Ferreira Marques, por ter feito os papéis de mãe, pai e dona da casa em todas as vezes que tive que me ausentar.

Ao meu orientador, professor Francisco Suetônio Bastos Mota, por ter acreditado em mim, pela paciência e pela compreensão em relação às falhas que ocorreram ao longo dessa caminhada.

Ao meu co-orientador, professor André Bezerra dos Santos, pela confiança e pelo apoio no Laboratório de Saneamento (LABOSAN).

À professora Dr. Marisete Dantas de Aquino por ter compartilhado um pouco do seu conhecimento durante as disciplinas do Curso de Doutorado e por ter aceitado o convite para participar da presente Banca de Defesa de Doutorado.

À Dra. Maria Cléa de Brito Figueirêdo por ter aceitado o convite para participar da presente Banca de Defesa de Doutorado.

Ao professor Dr. Pedro Henrique Augusto Medeiros por ter aceitado o convite para participar da presente Banca de Defesa de Doutorado.

Ao professor José Roberto Feitosa Silva, por ter me cedido espaço no Laboratório de Histologia e Reprodução Animal (LAHRA), por ter compartilhado comigo uma pequena fração de todo seu conhecimento em histologia e por ter participado do Exame de Qualificação da presente tese.

Ao professor Emanuel Soares dos Santos por ter participado da banca de qualificação da presente tese.

Ao Técnico em Histologia Animal e Vegetal Robson de Jesus Mendes por toda paciência e pelos valiosos ensinamentos durante a preparação das secções histológicas do material aqui apresentado.

Ao colega José Gilmar da Silva do Nascimento por todo apoio e ensinamentos referentes ao uso do HPLC.

A todos os meus orientandos que passaram pelo Laboratório de Recursos Aquáticos, em especial àqueles que se encontram no grupo neste momento, por ordem de antiguidade: Sabrina Rodrigues, Rodrigo Braga, Ikaro Xavier, Fabíola de Araújo, Jonnathan Wenderson, Eugênio de Castro e Danilo Oliveira. Eu não teria conseguido sem vocês!

“Assim como em música não é necessário saber ler uma partitura para apreciar a beleza de uma sinfonia, tampouco é necessário compreender equações matemáticas complexas para poder apreciar a beleza da ciência”
(Marcelo Gleiser)

RESUMO

Desreguladores endócrinos são substâncias exógenas que possuem a capacidade de alterar uma ou várias funções do sistema endócrino com efeitos adversos à saúde de um organismo saudável. O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a ação dos desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) no desenvolvimento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram desenvolvidos quatro experimentos nos quais foram avaliadas as concentrações hormonais de 250, 500 e 1.000 ng L⁻¹ com tempo de exposição de 4 semanas (Experimento 01); 250, 500 e 1.000 µg L⁻¹ com tempo de exposição de 4 semanas (Experimento 02); 160 µg L⁻¹ com tempo de exposição de 4 semanas (Experimento 03) e 160 µg L⁻¹ com tempo de exposição variando de 1 a 4 semanas (Experimento 04). Após o término do período de exposição hormonal, a água de cada unidade experimental foi totalmente renovada e os indivíduos mantidos em água limpa para que se desenvolvessem. Ao final deste período os animais foram eutanasiados por insensibilização em gelo, para extração das gônadas, preparação das lâminas e observação sob microscópio de luz. Ao final do experimento foi possível constatar que os hormônios e as concentrações hormonais avaliadas afetaram distintamente os parâmetros de desempenho zootécnico peso, comprimento, fator de condição e sobrevivência. Indivíduos intersexo foram observados nos tratamentos com cada um dos hormônios. Além disto, foram observadas malformações nos indivíduos dos tratamentos, principalmente na região da cabeça. Com os dados coletados na presente pesquisa é possível concluir que a presença dos compostos químicos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol afetam severamente o desenvolvimento e a diferenciação sexual da tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Poluentes emergentes. *Oreochromis niloticus*. Disruptores endócrinos. Interferentes endócrinos. Estrogênios ambientais.

ABSTRACT

Endocrine disruptors are exogenous substances that can impair one or more functions of the endocrine system and cause adverse effects to the health of a healthy organism. The main goal of this study was to evaluate the effect of the endocrine disruptors 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinyl estradiol (EE2) on the development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). There were performed 4 experiments in which different hormonal concentrations were tested: 250, 500 and 1,000 ng L⁻¹ over an exposure period of 4 weeks (Experiment 01); 250, 500 and 1,000 μ g L⁻¹ over an exposure period of 4 weeks (Experiment 02); 160 μ g L⁻¹ over an exposure period of 4 weeks and 160 μ g L⁻¹ in a exposure period varying from 1 to 4 weeks. After the period of hormonal exposure, water from each experimental units was completely renewed and individuals kept in clean water for development. At the end of this period, animals were euthanized by ice desensitization for gonad extraction, slide preparation, and observation by using an optical microscope. At the end of the experiment, the results indicated that the type of hormone and hormone concentration differentially affected the zootechnical performance parameters, weight, length, condition factor and survival. Intersex individuals were observed in treatments of both hormones. In addition, malformations were observed in individuals submitted to treatments, mainly in the head region. Thus, the presence of the chemical compounds 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol severely affected the development and sexual differentiation of Nile tilapia.

Keywords: Emerging pollutants. *Oreochromis niloticus*. Endocrine disruptors. Endocrine disrupting compounds or chemicals. Exogenous endocrine-active chemicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação das estruturas químicas do hormônio natural 17 β -estradiol e do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol.....	28
Figura 2 -	Principais grupos de contaminantes de preocupação emergente (CEC).....	29
Figura 3 -	Representação esquemática ilustrando alterações no sistema endócrino pela ação de desreguladores endócrinos. a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista.....	32
Figura 4 -	Principais rotas de contaminação dos corpos hídricos e de exposição dos seres vivos com contaminantes de preocupação emergente (CEC).....	33
Figura 5 -	Exemplar de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) produzida na Estação de Aquicultura Professor Doutor Raimundo Saraiva da Costa do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará.....	41
Figura 6 -	Exemplares adultos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>). A: exemplar macho. B: exemplar fêmea.....	43
Figura 7 -	Anatomia externa da papila urogenital da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>). A: exemplar macho. B: exemplar fêmea..	44
Figura 8 -	Aspecto externo de gônadas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>). A: gônadas de um exemplar fêmea (ovário). B: gônadas de um exemplar macho (testículo).....	45
Figura 9 -	Representação dos cruzamentos de tilápia Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) para produção de supermacho. A: cruzamento entre uma fêmea normal e um macho normal; B: cruzamento entre uma neofêmea e um macho normal; C: cruzamento entre um supermacho e uma fêmea normal.....	46
Figura 10 -	Vista panorâmica da bancada do Laboratório de Recursos Aquáticos na qual foram dispostas as unidades experimentais (aquários de 40 L) utilizadas para exposição hormonal de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) durante a presente pesquisa. As setas indicam a tubulação de aeração.....	55

Figura 11 - Oxímetro (Instrutherm, MO-900) utilizado para medição da concentração de oxigênio dissolvido e da temperatura da água de criação da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) durante os período de exposição hormonal aos hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) e de crescimento.....	56
Figura 12 - Sistema de tratamento de água com radiação ultravioleta (UV) para inativação dos hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) utilizados durante o período de exposição da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>). A seta indica o reator UV...	57
Figura 13 - Sequência de incisões e remoção das vísceras para acesso às gônadas da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) exposta aos hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2). A: peixe intacto. B: incisão na região posterior. C: incisões nas regiões ventral e anterior. D: remoção da musculatura e das vísceras.....	59
Figura 14 - Representação esquemática do delineamento experimental do Experimento 01.....	60
Figura 15 - Processador ultrassônico (Cristófoli) utilizado para auxiliar na solubilização dos hormônios 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol em água purificada para elaboração das soluções estoque.....	63
Figura 16 - Representação esquemática do delineamento experimental, da preparação da solução estoque e da administração da dose hormonal do Experimento 02.....	63
Figura 17 - Incubadora cilindro-cônica com fluxo ascendente de água acionada por bomba de ar (air lift) utilizada no Experimento 02 para eclosão de ovos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) estocados em diferentes concentrações hormonais de 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol.....	64
Figura 18 - Representação esquemática do delineamento experimental, da preparação da solução estoque e da administração da dose hormonal do Experimento 03.....	67

Figura 19 - Representação esquemática do delineamento experimental, da preparação da solução estoque e da administração da dose hormonal do Experimento 04.....	70
Figura 20 - Equipamento utilizado para identificação e quantificação dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em diferentes concentrações.....	71
Figura 21 - Curva de decaimento da concentração hormonal no Experimento 02 para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol a partir das concentrações planejadas de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 1 semana.....	79
Figura 22 - Curva de decaimento da concentração hormonal no Experimento 03 para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol a partir da concentração inicial de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 1 semana.....	80
Figura 23 - Equação, coeficiente alométrico (b) e coeficiente de determinação (R^2) da relação peso x comprimento de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L^{-1} ; 500 ng L^{-1} e 1.000 ng L^{-1} dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	84
Figura 24 - Equação, coeficiente alométrico (b) e coeficiente de determinação (R^2) da relação peso x comprimento de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 03. Exposição à concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	88
Figura 25 - Equação, coeficiente alométrico e coeficiente de determinação (R^2) da relação peso x comprimento de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 04. Exposição à concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol.....	89
Figura 26 - Secções histológicas de testículo normal de macho sexualmente maduro de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 04. A-D) Diferentes aumentos e detalhes de um testículo na fase Apto a liberar esperma.....	94

Figura 27 -	Secções histológicas de um ovário normal de fêmea de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 04. A-C) Diferentes aumentos e detalhes de um ovário na fase Apto à desova.....	95
Figura 28 -	Secção histológica da gônada de uma tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) intersexo do Experimento 04.....	95
Figura 29 -	Porcentagem de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) com algum tipo de malformação observados no Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L ⁻¹ ; 500 ng L ⁻¹ e 1.000 ng L ⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Colunas com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa (F=7,1771; p=0,0015). As barras representam o desvio padrão.....	100
Figura 30 -	Exemplares de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 02. A: Indivíduo normal; B e C indivíduos com malformação.....	101
Figura 31 -	Porcentagem de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) com algum tipo de malformação observados no Experimento 03. Exposição à concentração de 160 µg L ⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Colunas com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa (F=30,4997; p<0,0001). As barras representam o desvio padrão.....	101
Figura 32 -	Porcentagem de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) com algum tipo de malformação observados no Experimento 04. Exposição à concentração de 160 µg L ⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol por períodos de 1; 2; 3 e 4 semanas.....	102
Figura 33 -	Tipos de malformações encontradas em juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) na presente pesquisa. Exposição aos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fases reprodutivas de machos de Teleostei de água doce.....	39
Tabela 2 -	Fases reprodutivas de fêmea de Teleostei de água doce.....	40
Tabela 3 -	Qualidade microbiológica da água de esgoto sanitário para utilização em aquicultura.....	48
Tabela 4 -	Diretrizes do PROSAB para usos de esgotos sanitários em piscicultura ⁽¹⁾	49
Tabela 5 -	Característica do esgoto efluente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia de Água e Esgoto do Ceará (Cagece) utilizada no Centro de Pesquisa sobre Tratamento de Esgoto e Reúso de Água para realização de pesquisas envolvendo criação de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	50
Tabela 6 -	Porcentagem de amônia não ionizada para água doce em função do pH e da temperatura.....	57
Tabela 7 -	Cronograma do Experimento 02 para coleta de amostra de água para teste de concentração e elaboração da curva de decaimento hormonal para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol.....	64
Tabela 8 -	Cronograma do Experimento 03 para coleta de amostra de água para teste de concentração e elaboração da curva de decaimento hormonal para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol.....	67
Tabela 9 -	Hormônio, sigla, concentração hormonal [Hormônio] e tempo de exposição hormonal (TEH) utilizados para a composição da nomenclatura adotada para os tratamentos do Experimento 04....	69
Tabela 10 -	Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO ₂ ⁻), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH ₃) da água de criação de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L ⁻¹ ; 500 ng L ⁻¹ e 1.000 ng L ⁻¹ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	73

Tabela 11 - Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 02. Exposição às concentrações de $250 \mu\text{g L}^{-1}$; $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	74
Tabela 12 - Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 03. Exposição à concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	75
Tabela 13 - Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 04. Exposição à concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	75
Tabela 14 - Parâmetros zootécnicos da primeira biometria de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250ng L^{-1} ; 500ng L^{-1} e 1.000ng L^{-1} dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média \pm desvio padrão. Valores com diferentes letras minúsculas e maiúsculas sobre-escritas na mesma coluna apresentam diferença significativa para os critérios concentração hormonal e hormônio, respectivamente ($p < 0,05$).....	82

<p>Tabela 15 - Parâmetros zootécnicos da segunda biometria de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média±desvio padrão. Valores com diferentes letras minúsculas e maiúsculas sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença significativa para os critérios concentração hormonal e hormônio, respectivamente (p<0,05).....</p>	83
<p>Tabela 16 - Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 02. Exposição às concentrações de 250 µg L⁻¹; 500 µg L⁻¹ e 1.000 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Porcentagem de eclosão (EC), peso (P), comprimento total (CT) e sobrevivência (S). Média±desvio padrão.....</p>	85
<p>Tabela 17 - Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 03. Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média±desvio padrão. Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença significativa (p<0,05).....</p>	87
<p>Tabela 18 - Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 04. Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol por períodos de 1; 2; 3 e 4 semanas. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média±desvio padrão.....</p>	89

Tabela 19 - Classificação da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 01 quanto as suas características gonadais (macho, fêmea e intersexo). Exposição às concentrações de 250 ng L ⁻¹ ; 500 ng L ⁻¹ e 1.000 ng L ⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	91
Tabela 20 - Classificação da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 03 quanto as suas características gonadais (macho, fêmea e intersexo). Exposição à concentração de 160 µg L ⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.....	92
Tabela 21 - Classificação da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) do Experimento 04 quanto as suas características externas (macho, fêmea e indefinido) e gonadais (macho, fêmea e intersexo). Exposição à concentração de 160 µg L ⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol por períodos de 1; 2; 3 e 4 semanas.	93
Tabela 22 - Caracterização e identificação dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostra de água e biofilme em sistema de cultivo de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ordem cronológica das etapas envolvidas no desenvolvimento da presente pesquisa.....	55
Quadro 2	Protocolo completo para a preparação das secções histológicas para visualização sob microscópio óptico de gônadas de juvenis tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
b	Coefficiente de alometria
CE	Ceará
CT	Comprimento total
DAE	Dias após a eclosão
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEHA	Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental
DEP	Departamento de Engenharia de Pesca
DES	Dietil-estilbestrol
E2	17 β -estradiol
EAC	<i>Exogenous endocrine-active chemicals</i>
ED	<i>Endocrine disruptors</i>
EDC	<i>Endocrine disrupting compounds or chemicals</i>
EE2	17 α -etinilestradiol
et al.	E outros
ETE	Estação de tratamento de esgoto
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromathografy</i>
IPCS	<i>International Programme for Chemical Safety</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KA	Fator de condição alométrico
LABOSAN	Laboratório de Saneamento
LAHRA	Laboratório de Histologia e Reprodução Animal
LARAq	Laboratório de Recursos Aquáticos
ln	Logaritmo natural
NAT	Nitrogênio amoniacal total
OD	Oxigênio dissolvido
P	Peso
pH	Potencial hidrogeniônico
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNEP	<i>United Nations Environment Program</i>
US EPA	<i>United States of Environmental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

mg L ⁻¹	Miligramo por litro
ng L ⁻¹	Nanograma por litro
µg L ⁻¹	Micrograma por litro
°C	Graus Celsius
L	Litro
L min ⁻¹	Litros por minuto
h	Hora
min	Minuto
%	Porcentagem
®	Marca registrada
mL	Mililitro
g	Gramas
cm	Centímetro
mg	Miligramo
mm	Milímetro
mL min ⁻¹	Mililitros por minuto
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Objetivos.....	26
1.1.1	<i>Objetivo Geral</i>	26
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Sistema endócrino e os hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol.....	27
2.2	Contaminantes de preocupação emergente (CEC).....	28
2.2.1	<i>Desreguladores endócrinos</i>	30
2.2.2	<i>Mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos</i>	31
2.2.3	<i>Principais fontes de desreguladores endócrinos</i>	33
2.2.4	<i>Efeitos causados pela exposição aos desreguladores endócrinos</i>	34
2.3	Principais aspectos da gametogênese em peixes.....	37
2.4	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	40
2.4.1	<i>Breve histórico da introdução e da produção</i>	41
2.4.2	<i>Dimorfismo sexual</i>	43
2.4.3	<i>Produção de lotes monossexo para fins comerciais</i>	45
2.5	Reúso de águas residuárias na aquicultura.....	46
2.6	Legislação referente à qualidade de água.....	49
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1	Local de realização da pesquisa e aquisição dos espécimes	54
3.2	Experimentos desenvolvidos.....	54
3.3	Procedimentos comuns a todos os experimentos.....	55
3.3.1	<i>Alimentação e manutenção da qualidade da água</i>	55
3.3.2	<i>Histologia</i>	58
3.4	Experimento 01 – Avaliação dos efeitos do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo nas concentrações de 250 ng L ⁻¹ ; 500 ng L ⁻¹ e 1.000 ng L ⁻¹	60
3.4.1	<i>Delineamento experimental</i>	60
3.4.2	<i>Análise estatística dos dados</i>	61

3.5	Experimento 02 – Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol e do 17α-etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo nas concentrações de 250 µg L ⁻¹ ; 500 µg L ⁻¹ e 1.000 µg L ⁻¹	62
3.5.1	<i>Preparação da solução estoque e administração da dose hormonal.....</i>	62
3.5.2	<i>Teste de concentração e curva de decaimento hormonal.....</i>	64
3.5.3	<i>Delineamento experimental e análise dos dados.....</i>	64
3.6	Experimento 03 – Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol e do 17α-etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo na concentração de 160 µg L ⁻¹	66
3.6.1	<i>Preparação da solução estoque e administração da dose hormonal.....</i>	66
3.6.2	<i>Teste de concentração e curva de decaimento hormonal.....</i>	67
3.6.3	<i>Delineamento experimental e análise estatística dos dados.</i>	67
3.7	Experimento 04 – Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol e do 17α-etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo na concentração de 160 µg L ⁻¹ durante intervalos de tempo variados: 1, 2, 3 e 4 semanas.....	69
3.8	Metodologia analítica para mensuração dos hormônios.....	70
3.9	Análise microbiológica do ambiente experimental.....	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1	Parâmetros de qualidade de água.....	73
4.2	Teste de concentração e curva de decaimento hormonal.....	78
4.3	Parâmetros de desempenho zootécnico da tilápia do Nilo....	81
4.4	Histologia.....	91
4.5	Morfologia.....	99
4.6	Análise microbiológica do biofilme formado nos aquários....	105
5	CONCLUSÕES.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

Hipóteses prevendo alterações no funcionamento do organismo de algumas espécies animais expostas a determinadas substâncias químicas tóxicas já existiam desde o início do século XX (GHISELLI; JARDIM, 2007; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014). Entretanto, nas últimas décadas este assunto tem recebido atenção de cientistas, agências ambientais e organizações internacionais, o que tem causado um número crescente de publicações que relatam o aumento da incidência de disfunções no sistema endócrino de seres humanos e nas demais espécies animais (LAURENSEN *et al.*, 2014), principalmente nas que possuem uma relação estrita ou íntima com a água.

Os primeiros indícios cientificamente relatados de que substâncias com potencial de desreguladores endócrinos afetavam a vida silvestre foram verificados na década de 1980 com a observação de características femininas em espécimes machos de aves que colonizam a região dos Grandes Lagos, que ocupam parte do território dos Estados Unidos e do Canadá (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006). Desde então, pesquisadores ao redor do mundo têm observado efeitos semelhantes em outros tipos de animais como anfíbios (PHUGE; GRAMAPUROHIT, 2015), répteis, moluscos (BORYSKO; ROSS, 2014) e peixes (WOODS; KUMAR, 2011).

Além do desenvolvimento de características femininas em indivíduos macho, que geram produção anormal de vitelogenina, baixa contagem espermática e aparecimento de peixes intersexo, os desreguladores endócrinos podem também atuar negativamente sobre os sistemas nervoso e imune, causar distúrbios comportamentais e afetar a homeostase dos organismos de uma maneira geral (CZARNY *et al.*, 2017). Desta forma, é imperativo que estudos nesta área sejam desenvolvidos a fim de que possam embasar discussões que possam resultar em políticas públicas futuras sobre qualidade de água no tocante à presença desses poluentes emergentes.

Por fazerem parte de um grupo de compostos coletivamente conhecidos como poluentes emergentes, os desreguladores endócrinos ainda são pouco estudados e suas ações sinérgicas no meio ambiente são totalmente desconhecidas para a maioria dos compostos (NIEMUTH; KLAPER, 2015). Entretanto, alguns pesquisadores que se dispuseram a investigar a ação conjunta de alguns destes compostos chegaram à conclusão de que os efeitos metabólicos não podem ser

previstos com base nos efeitos individuais de cada composto (CHEN *et al.*; 2007; HU *et al.*; 2014; JORDAN *et al.*; 2012).

Dentre estes desreguladores endócrinos, o esteroide estrogênico natural, 17 β -estradiol (E2), e o esteroide estrogênico sintético, 17 α -etinilestradiol (EE2), são os mais estudados, por estarem entre as substâncias mais disseminadas no meio ambiente (CZARNY *et al.*, 2017). Ainda segundo estes autores, alguns destes compostos (E2, por exemplo) estão presentes normalmente na urina de animais e sua concentração depende do sexo, do *status* hormonal, existência de gravidez e fase do ciclo menstrual. Já formas sintéticas, como o EE2, estão presentes em pílulas contraceptivas e medicamentos à base de hormônios.

Além do E2 e do EE2, substâncias com potencial de desreguladores endócrinos incluem fitoestrogênios (FERREIRA, 2013) e substâncias químicas sintéticas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ZHANG *et al.*, 2016), pesticidas (Da CUÑA *et al.*, 2016), detergentes (CRAGO *et al.*, 2015), fármacos (NIEMUTH; KLAPER, 2015), organoclorados (VUTUKURU *et al.*, 2016), alquilfenóis (JANICKI; KRUPINSKI; DLUGONSKI, 2016), bisfenol A e ftalatos (SOHN *et al.*, 2016).

A ação feminizante de desreguladores endócrinos de ação estrogênica tem sido observada em peixes que habitam rios próximos a grandes centros urbanos em diversos locais do mundo (DAMMANN *et al.*, 2011; MEIJIDE *et al.*, 2016; TETREAUULT *et al.*, 2011). Adicionalmente, ensaios laboratoriais têm confirmado que doses consideravelmente baixas de hormônio, da ordem de micrograma por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$) e nanograma por litro (ng L^{-1}), são capazes de acarretar prejuízos no desenvolvimento de várias espécies de peixes (LANGE *et al.*, 2001; LEI *et al.*, 2014; NIEMUTH; KLAPER, 2015).

Pessoa *et al.* (2012) encontraram concentrações de E2 e EE2 da ordem de ng L^{-1} em planta de estação de tratamento de esgoto (ETE) localizada na Região Metropolitana de Fortaleza-CE. Contudo, estudos realizados em outros estados do Brasil demonstram que tais concentrações podem chegar à ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ na água superficial de corpos hídricos próximos a grandes centros urbanos (CAMPANHA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas têm havido um importante incremento nos esforços por parte de pesquisadores (BORYSKO; ROSS, 2014; DAMMANN *et al.*, 2011; PHUGE; GRAMAPUROHIT, 2015) e de entidades ligadas ao meio ambiente, como a *United States of Environmental Protection Agency* (US EPA), a *International Union of*

Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a *World Health Organization* (WHO) e a *United Nations Environment Program* (UNEP), no sentido de identificar, quantificar e avaliar os efeitos de substâncias com potencial de desreguladores endócrinos e seus efeitos nos seres vivos, incluindo os seres humanos. Os dados gerados nas pesquisas desenvolvidas estão sendo utilizados para propor modificações nas diretrizes referentes ao tratamento da água, como é o caso da *European Commission*, que incluiu o 17β -estradiol e o 17α -etinilestradiol na lista prioritária de compostos de interesse (EC, 2012).

Ademais, a desigualdade na distribuição de água no planeta, o crescente aumento populacional e a constante degradação dos recursos hídricos existentes por ação antrópica têm impulsionado cada vez mais pesquisadores a buscar alternativas para a produção de alimento de qualidade, como é o caso da utilização de esgoto sanitário na produção agrícola (BASTOS *et al.*; 2003) e de pescado (AQUINO; GRADVOHL; SANTOS, 2007). Neste sentido, espécies como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), devido suas características alimentares e resistência quanto aos parâmetros de qualidade de água, têm sido escolhidas como espécies alvo. Os trabalhos envolvendo a criação da tilápia do Nilo em esgoto sanitário vão desde a produção de formas jovens (SANTOS *et al.*; 2009a), passando pela engorda (SANTOS *et al.*; 2009b) e pela qualidade final do produto após o ciclo produtivo (FONTENELE; SANTOS; MOTA, 2013) até a viabilidade econômica do negócio (SANTOS *et al.*; 2015).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é atualmente produzida em mais de 80 países (FAO, 2018) e por ser uma espécie bastante robusta e prolífera pode ser encontrada facilmente no ambiente. Por este motivo, foi a espécie escolhida de modo que seja possível uma comparação com trabalhos futuros que venham a ser desenvolvidos em outros países e até mesmo no Brasil.

Devido ao exposto, estudos que avaliem os efeitos de desreguladores endócrinos em ambiente controlado são necessários, pois tornam possível a avaliação destes compostos de forma isolada.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

O objetivo principal da presente tese foi investigar a efeito dos desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) no desenvolvimento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

1.1.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito dos desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) em diferentes concentrações no desenvolvimento gonadal da tilápia do Nilo;
- b) Investigar a ação dos desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) no desenvolvimento gonadal da tilápia do Nilo após diferentes tempos de exposição;
- c) Verificar o impacto de diferentes concentrações dos desreguladores 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) no tempo de incubação e na porcentagem de eclosão de larvas de tilápia do Nilo;
- d) Examinar o efeito dos desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) em diferentes concentrações no desenvolvimento morfológico da tilápia do Nilo;
- e) Avaliar a ação dos desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) no desenvolvimento morfológico da tilápia do Nilo após diferentes tempos de exposição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema endócrino e os hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol

O sistema endócrino é constituído por um conjunto de órgãos que apresentam como função primordial a produção de substâncias denominadas de hormônios, que são lançadas na corrente sanguínea e atuam em uma região do corpo diferente daquela onde foi produzido (BIRKET; LESTER, 2003). Este sistema é responsável por modular todas as atividades biológicas normais de um ser vivo, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo de forma geral (MANAHAN, 2003).

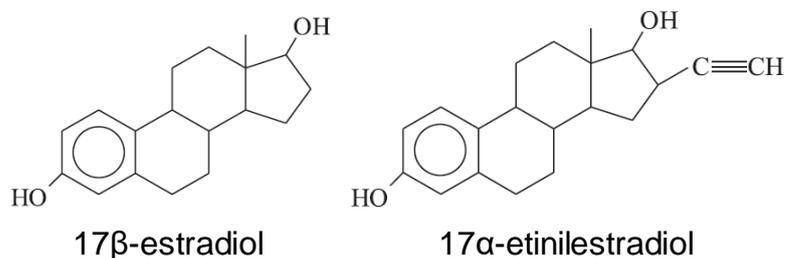
Os hormônios são, portanto, os mensageiros químicos responsáveis pela comunicação entre os locais de produção e ação sendo reconhecidos pelas células-alvo por meio de estruturas proteicas específicas chamadas de receptores. Uma das características dos hormônios é que eles são capazes de expressar suas atividades em quantidades extremamente baixas. Um grupo específico de hormônios são os hormônios sexuais, os quais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos: 1) hormônios sexuais femininos, também conhecidos como estrógenos; 2) hormônios sexuais masculinos ou andrógenos; e 3) hormônios da gravidez ou progestógenos (BIRKET; LESTER, 2003; MANAHAN, 2003).

O 17β -estradiol (E2) é um estrogênio pertencente à classe dos estrenos e é considerado um dos principais hormônios produzidos no corpo humano, exercendo papel fundamental no controle do ciclo menstrual (ZHA *et al.*, 2008). Este hormônio apresenta fórmula química $C_{18}H_{24}O_2$, solubilidade em água a $25^{\circ}C$ de $12.960 \mu g L^{-1}$ e meia vida que pode variar de dois a nove dias, a depender das condições ambientais (LINTELMANN *et al.*, 2003).

O 17α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético derivado do estradiol utilizado principalmente em medicamentos contraceptivos e em tratamentos de reposição hormonal (ZHA *et al.*, 2008). Este hormônio apresenta fórmula química $C_{20}H_{24}O_2$, solubilidade em água a $25^{\circ}C$ de $483 \mu g L^{-1}$ e meia vida que pode variar de 4 a 6 dias (LINTELMANN *et al.*, 2003).

As estruturas químicas do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol podem ser visualizadas na Figura 1.

Figura 1 – Representação das estruturas químicas do hormônio natural 17β-estradiol e do hormônio sintético 17α-etinilestradiol.



Fonte: Ghiselli; Jardim (2007).

O E2 e o EE2 têm recebido atenção especial dos pesquisadores e das agências ambientais e organizações internacionais pois, apesar de apresentarem meia-vida curta, são contínua e diariamente lançados em efluentes domésticos, conferindo-lhes um caráter de resistência. Além disto, são compostos extremamente bioativos, estão associados a vários tipos de cânceres, e os métodos convencionais de tratamento de esgoto não os removem eficientemente (GHISELLI; JARDIM, 2007; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

2.2. Contaminantes de preocupação emergente (CEC)

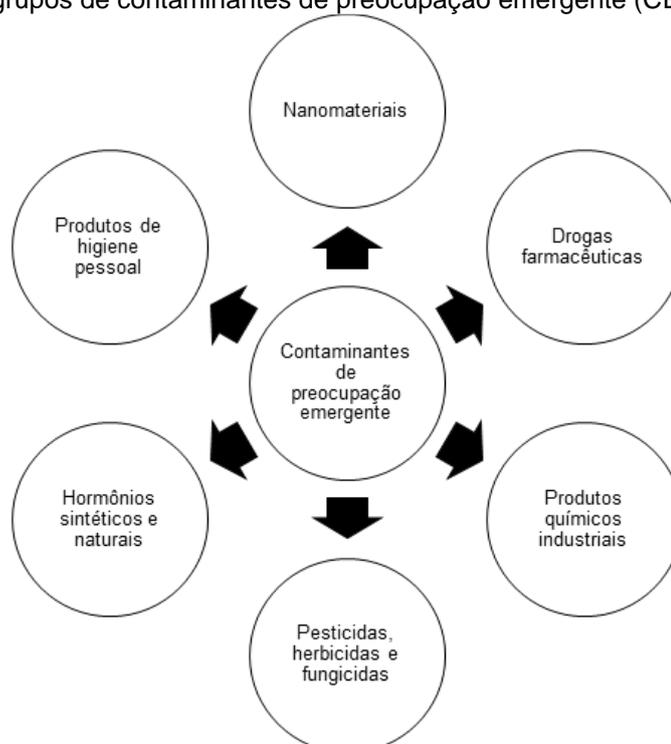
Sauvé e Desrosiers (2014) atribuem a Rachel Carson, em seu livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) de 1962, a consciência atual que se tem sobre os danos que substâncias químicas, como os pesticidas, e em especial o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), podem causar ao meio ambiente. Carson levantou a hipótese de que o uso indiscriminado de DDT para eliminar mosquitos e outras pragas causou a morte e o desaparecimento de uma grande quantidade aves. Mais tarde, a ciência provou que ela estava certa e o DDT acabou sendo banido de muitos países. Desde então, as pesquisas vêm demonstrando que uma atenção especial deve ser dada a uma grande variedade de compostos devido a seus efeitos deletérios na saúde dos animais, incluindo a espécie humana, e do meio ambiente.

Contaminantes de preocupação emergente (*contaminants of emerging concern* – CEC), também conhecidos como poluentes emergentes ou microcontaminantes orgânicos, recebem esta denominação devido ao fato das informações toxicológicas e ambientais disponíveis para os compostos que fazem parte deste grupo serem escassas, insuficientes ou contraditória (SOUZA *et al.*; 2019).

Estes autores enfatizam ainda, que emergente é a preocupação com o impacto ambiental destes compostos e não os compostos em si, pois os alquifenóis etoxilados, por exemplo, são utilizados há mais de 70 anos e os hormônios estrogênicos naturais são excretados por diversas espécies de animais.

Após ampla revisão sobre substâncias contaminantes emergentes, Sauvé e Desrosiers (2014), definem tais compostos como substâncias naturais ou compostos químicos manufacturados recentemente descobertos ou que já estejam presentes no meio ambiente e cuja toxicidade ou persistência provavelmente alterem de maneira significativa o metabolismo dos seres vivos. Os autores argumentam, ainda, que estes químicos devem ser mantidos com *status* de CEC enquanto houver pouca informação disponível na literatura científica ou pouca documentação sobre os riscos potenciais que podem causar. A Figura 2 sumariza os principais grupos de contaminantes de preocupação emergente.

Figura 2 – Principais grupos de contaminantes de preocupação emergente (CEC).



Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2019)

Este grupo de poluentes inclui uma ampla gama de substâncias como fitoestrogênios (FERREIRA, 2013), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ZHANG *et al.*, 2016), pesticidas (Da CUÑA *et al.*, 2016), substâncias utilizadas em produtos de limpeza e higiene pessoal (surfactantes como os alquifenóis, fragrâncias,

antissépticos como o triclosan etc.) (CRAGO *et al.*, 2015; JANICKI; KRUPINSKI; DLUGONSKI, 2016; SOUZA *et al.*; 2019), fármacos (analgésicos, antibióticos, antilipêmicos, anti-inflamatórios dentre outros) (NIEMUTH; KLAPER, 2015; SOUZA *et al.*; 2019), organoclorados (VUTUKURU *et al.*, 2016), bisfenol A e ftalatos (SOHN *et al.*, 2016), hormônios naturais excretados pelos humanos (estriol, estrona e 17β -estradiol) e hormônios sintéticos utilizados em pílulas anticoncepcionais (17α -etinilestradiol) (SOUZA *et al.*; 2019; ZHA *et al.*, 2008).

2.2.1. Desreguladores endócrinos

Alguns CEC artificiais, como os fármacos 17α -etinilestradiol e metformina, o plastificante bisfenol-A e o surfactante nonilfenol e alguns naturais como o 17β -estradiol, o estriol e a estrona têm a propriedade de mimetizar hormônios estrogênicos e alterar o funcionamento do sistema endócrino, sendo, por isso, chamados de desreguladores endócrinos (SOUZA *et al.*; 2019).

Muitas definições têm sido utilizadas para caracterizar desreguladores endócrinos. Os conceitos têm evoluído ao longo do tempo e conforme novas descobertas são feitas acerca de suas origens e das ações que desempenham nos organismos que afetam.

Segundo a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA, 1998), desreguladores endócrinos são agentes exógenos que interferem com a síntese, a secreção, o transporte, a ligação, a ação ou a eliminação de hormônios naturalmente produzidos pelo indivíduo.

O Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme for Chemical Safety – IPCS*) em conjunto com o Japão, Estados Unidos, Canadá e União Européia (CEC, 1999), atestam que desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde de um organismo saudável, sua descendência ou subpopulações.

Vários pesquisadores definem um desregulador endócrino com base nos seus efeitos, pois trata-se de uma substância química que, mesmo presente em concentrações extremamente baixas ($\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1}), é capaz de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino, causando câncer, prejudicando os

sistemas reprodutivos e provocando outros efeitos adversos (PHILLIPS; HARRISON, 1999; LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Dentre as definições apresentadas, é possível observar alguns pontos em comum: 1) trata-se de uma substância química exógena; 2) está presente em concentrações extremamente baixas; e 3) interfere no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo seres humanos (BIRKETT; LESTER, 2003; BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Essas substâncias são mundialmente denominadas de *endocrine disruptors* (ED), *endocrine disrupting compounds or chemicals* (EDC) ou, ainda, *exogenous endocrine-active chemicals* (EAC) (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007; VADJA *et al.*, 2011). A tradução para a língua portuguesa tem gerado algumas denominações diferentes e ainda não padronizadas, uma vez que há poucos grupos de pesquisadores brasileiros trabalhando com essa temática (GHISELLI; JARDIM, 2007). Podem ser encontradas denominações como disruptores endócrinos, desreguladores endócrinos (denominação adotada na presente pesquisa), interferentes endócrinos e estrogênios ambientais (BAIRD, 2002; BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os desreguladores endócrinos podem ser classificados, de acordo com a sua origem, em naturais e sintéticos (BILA; DEZOTTI, 2007). Outra classificação desses compostos é quanto sua ação biológica, podendo ser denominados de agonistas ou de antagonistas. Os desreguladores endócrinos agonistas mimetizam um determinado hormônio. Já os antagonistas ligam-se aos receptores de hormônios, bloqueando as atividades dessas substâncias (BIRKETT; LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003).

2.2.2. Mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos

A homeostase é a tendência do corpo normal em manter estados de equilíbrios, sendo alcançado por coordenação de um conjunto complexo de processos fisiológicos por meio de comunicação química e/ou elétrica entre tecidos que apresentam respostas apropriadas. Os hormônios desempenham um papel central nessa comunicação e, dessa forma, são fundamentais para a manutenção da homeostase (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008).

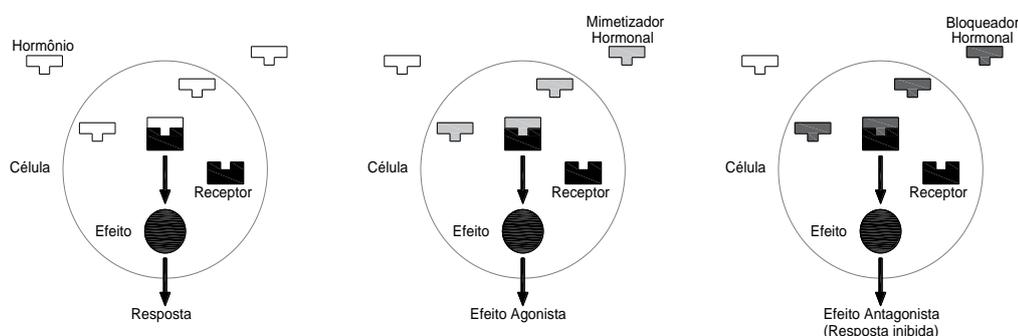
A ação de um determinado hormônio inicia-se por meio da sua ligação a um receptor específico, no interior de uma célula. O complexo resultante liga-se a regiões específicas do DNA presente no núcleo da célula, o que determina a ação dos genes (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Certas substâncias químicas podem também se ligar ao receptor hormonal e, conseqüentemente, mimetizar ou bloquear a ação do próprio hormônio (BAIRD, 2002; LINTELMANN *et al.*, 2003).

A alteração no sistema endócrino ocorre quando o desregulador interage com os receptores hormonais, modificando a sua resposta natural. Dois processos distintos podem ser desencadeados: 1) a substância química pode se ligar ao receptor hormonal e produzir uma resposta, atuando então como um mimetizador, efeito agonista; 2) a substância química se liga ao receptor e nenhuma resposta é produzida, efeito antagonista (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Na Figura 3 indicam-se de forma esquemática os mecanismos de alteração no organismo pela ação de desreguladores endócrinos.

Figura 3 – Representação esquemática ilustrando alterações no sistema endócrino pela ação de desreguladores endócrinos. a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista.



Fonte: Ghiselli; Jardim (2007).

Muitos desreguladores endócrinos competem com o estradiol (hormônio sexual feminino produzido naturalmente pelo organismo) pelos receptores de estrogênio. Outros competem com a diidrotestosterona (hormônio sexual masculino produzido naturalmente pelo organismo) pelos receptores de androgênio. Portanto, estas substâncias exercem efeitos de feminização (conhecidas como estrogênicas) ou masculinização (conhecidas como androgênicas) sobre o sistema endócrino (BIRKETT; LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003).

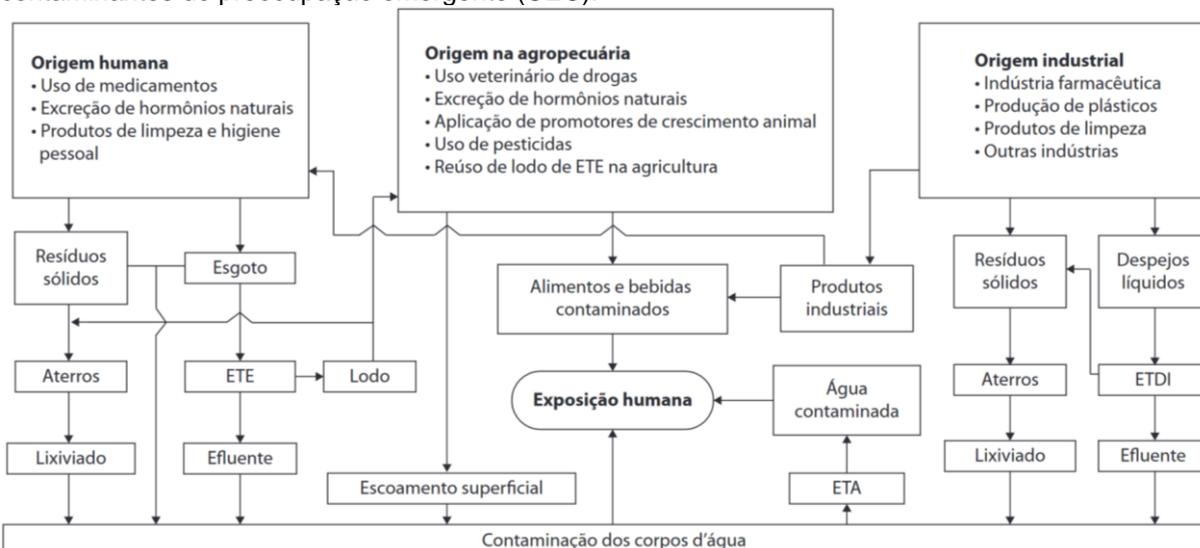
2.2.3. Principais fontes de desreguladores endócrinos

As fontes de desreguladores endócrinos, assim como dos demais poluentes de maneira geral, podem ser classificadas em dois grandes grupos: pontuais e não pontuais.

As fontes pontuais apresentam um local de entrada no meio ambiente bem caracterizado, geralmente por meio dos cursos d'água, podendo-se citar como uma das principais fontes de desreguladores endócrinos no ambiente aquático as descargas de efluentes industriais (BIRKETT; LESTER, 2003) e esgotos domésticos (BIRKETT; LESTER, 2003; SOWERS *et al.*, 2009), tendo sido demonstrado em todo o mundo que estes efluentes concentram mensuráveis produtos farmacêuticos, produtos para cuidados pessoais e hormônios naturais e sintéticos, todos potenciais desreguladores endócrinos (NAKADA *et al.*, 2004; SNYDER, 2008).

Os esgotos domésticos se caracterizam por meio do lançamento de água cinzas (derivada dos chuveiros, lavatórios e lavanderias), águas negras (excretas de indivíduos que podem conter medicamentos de uso oral e hormônios naturais) e descarte de medicamentos e produtos químicos não usados ou com prazo de validade expirado (SOUZA *et al.*; 2019). Na Figura 4 observa-se, de forma esquemática, as principais rotas pelas quais os CEC podem chegar aos corpos hídricos e entrar em contato com os seres humanos e demais organismos vivos.

Figura 4 – Principais rotas de contaminação dos corpos hídricos e de exposição dos seres vivos com contaminantes de preocupação emergente (CEC).



Fonte: Aquino, Brandt e Chernicharo (2013). ETE: estação de tratamento de esgoto. ETDI: estação de tratamento de despejos industriais; ETA: estação de tratamento de água.

As fontes não pontuais ou difusas são definidas como fontes que não apresentam um ponto de entrada bem caracterizado no meio ambiente. As deposições atmosféricas e os escoamentos superficiais são bons exemplos de fontes não pontuais (BIRKETT; LESTER, 2003).

Devido este fato, desreguladores endócrinos são encontrados nas águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, solos, efluentes e lodo biológico das estações de tratamento de esgoto (ETE) e água potável. São continuamente introduzidos no meio ambiente em concentrações detectáveis e podem afetar a qualidade da água, a saúde dos ecossistemas e, potencialmente, impactar o suprimento de água potável (BILA; DEZOTTI, 2007).

Reis Filho, Araújo e Vieira (2006) evidenciam que os desreguladores endócrinos são substâncias que, mesmo estando presentes em pequenas concentrações, são capazes de desencadear efeitos sobre os sistemas em que são introduzidos e, por este motivo, também recebem a denominação de microcontaminantes orgânicos. A quantificação de desreguladores endócrinos na água pode ser considerada como um dos maiores desafios da química analítica, primeiramente devido à complexidade das matrizes ambientais, em segundo lugar por causa da baixa concentração. Além do mais, os processos analíticos típicos envolvem diversas etapas, como processos de filtração, extração, eluição e injeção.

Em países europeus foi verificado que os estrogênios naturais (17β -estradiol e estrona) e sintéticos (17α -etinilestradiol) são responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica detectada em efluentes de ETE (DESBROW *et al.*, 1998; JOBLING *et al.*, 1998; RODGERS-GRAY *et al.*, 2001).

Estes compostos são contínua e diariamente lançados no esgoto, não sendo completamente removidos nas ETE pelos métodos tradicionais de tratamento, merecendo, assim, uma atenção especial. Desta forma, podem ser encontrados nas águas superficiais, potencialmente utilizadas como suprimento de água potável, apresentando um risco constante aos humanos e às demais espécies (BILA; DEZOTTI, 2007; JOBLING *et al.*, 1998).

2.2.4. Efeitos causados pela exposição aos desreguladores endócrinos

As primeiras hipóteses sobre os efeitos dos desreguladores endócrinos foram levantadas na década de 1980 (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006), quando

foi observado desenvolvimento de características femininas em machos de aves marinhas coloniais da região dos Grandes Lagos (Estados Unidos e Canadá), expostos a agrotóxicos (SETAC, 2000).

Também foi verificado, nessa época, que aligatores do Lago Apopka, na Flórida, poderiam ter sido afetados pela exposição a agrotóxicos. Observou-se que os indivíduos machos apresentavam mudanças nos seus aparelhos reprodutivos, influenciando nas taxas de reprodução desses indivíduos, tendo como causa disso a exposição ao dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), proveniente de um derramamento deste produto químico de uma indústria local (SETAC, 2000).

Segundo Manahan (2003), diversos são os efeitos desencadeados pelos desreguladores endócrinos, em especial hormônios sexuais, sobre a biota, dentre os quais podem ser citados: alterações nas taxas de fecundidade, fertilização e eclosão; modificações comportamentais como agressividade e movimentação; histopatologias, principalmente no fígado, gônadas e rins; imunodepressão; desenvolvimento de indivíduos intersexo, que é o desenvolvimento de características sexuais de ambos os sexos em um único indivíduo; inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais e a completa indução sexual. Rogers, Metz e Yong (2013) salientam que quanto mais cedo no estágio de desenvolvimento dos indivíduos a exposição ocorrer maiores serão as consequências para os próprios organismos, podendo influenciar, inclusive, as gerações futuras. Isto é particularmente preocupante em espécies aquáticas cujo desenvolvimento embrionário e larval se dá em contato direto com a água.

Tem sido observado que peixes nativos que vivem em áreas contaminadas por desreguladores endócrinos, principalmente os oriundos de descargas municipais, estão apresentando alterações nos seus sistemas reprodutivos (JOBILING *et al.*, 1998; MILLS; CHICHESTER, 2005).

Peixes com gônadas intersexo têm sido observados em amostras coletadas a jusante do ponto de descarga de ETE em diversas regiões, desde o início da década de 2000, incluindo Itália (VIGANÒ *et al.*, 2001), Estados Unidos (WOODLING *et al.*, 2006) e Canadá (TETREAULT *et al.*, 2011).

Woodling *et al.* (2006), objetivando avaliar os efeitos de desreguladores endócrinos em peixes da espécie *Catostomus commersoni*, nativos de rios do Estado do Colorado, Estados Unidos, identificaram a presença de gônadas intersexo em peixes coletados a jusante do ponto de descarga de uma ETE, assim como indivíduos machos com gônadas apresentando desenvolvimento de células germinativas

femininas, indivíduos de ambos os sexos com desenvolvimento gonadal atrasado, além de outras anomalias em testículos e ovários. Estes pesquisadores informam ainda que a diferenciação sexual induzida por desreguladores endócrinos pode contribuir para um menor número de indivíduos machos de peixes a jusante de uma ETE.

Vadja *et al.* (2011) relataram a formação de gônadas intersexo, redução da quantidade de esperma e elevação dos níveis de vitelogenina no plasma sanguíneo em peixes machos da espécie *Catostomus commersoni*, os quais vivem em rios que recebem efluentes de ETE na cidade de Boulder, no Estado do Colorado, Estados Unidos.

Além das alterações relativas ao aparelho reprodutivo, pesquisadores também têm relatado que alguns compostos desreguladores endócrinos, incluindo substâncias estrogênicas com o E2 e o EE2, provocam alterações morfológicas. Tais deformidades incluem cabeça pequena, abdômen distendido (ascite) e coluna vertebral torta (escoliose e lordose) (BOUDREAU *et al.*, 2004). Estudos laboratoriais têm demonstrado desde o final da década de 1980 e início de 1990 que exposição de embriões e larvas de peixes a vários tipos de poluentes presentes no ambiente acarretam no desenvolvimento de alterações morfológicas, baixa sobrevivência e retardo no desenvolvimento (von WESTERNHAGEM, 1988; WEIS; WEIS, 1989).

Além de peixes, aves e répteis, pesquisas demonstram que anfíbios e moluscos também são afetados pela presença de desreguladores endócrinos. Phuge e Gramapurohit (2015) expuseram uma espécie de sapo (*Euphlyctes cyanophlyctis*) a propionato de testosterona (TP; hormônio masculino) e E2 nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante toda a fase larval incluindo o período de metamorfose. Os pesquisadores observaram população 100% masculina em todas as concentrações utilizando TP e populações 100% femininas em todas as concentrações que continham E2.

Borysko e Ross (2014) observaram que os moluscos gastrópodes *Nassarius burcardi* e *N. jonisii* apresentaram diminuição da taxa de eclosão das larvas quando mantiveram os reprodutores por 16 semanas em água com concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ do hormônio 17 α -etinilestradiol.

Nos seres humanos, a fase do desenvolvimento fetal é bastante crítica à exposição de desreguladores endócrinos. Um exemplo mais claro dos efeitos causados em fetos foi o uso do potente estrogênio sintético dietil-estilbestrol (DES)

em mulheres grávidas, entre os anos de 1948 a 1970. Este fármaco era prescrito por médicos para evitar abortos espontâneos e promover o crescimento fetal. Mais tarde, descobriu-se que as crianças nascidas de mulheres que fizeram uso desse medicamento, quando atingiam a puberdade, apresentaram disfunção no sistema reprodutivo, gravidez anormal, redução na fertilidade, desordem no sistema imunológico e muitas desenvolveram câncer vaginal (BILA; DEZOTTI, 2007).

2.3.Principais aspectos da gametogênese em peixes

Na maioria dos Teleostei (peixes ósseos), o desenvolvimento gonadal é cíclico e sazonal. Ao longo de cada ciclo reprodutivo, a renovação das células germinativas, sua diferenciação, desenvolvimento, maturação e liberação resultam em alterações gonadais que caracterizam diferentes fases reprodutivas (QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER, 2013).

A gametogênese das células germinativas de linhagem feminina tem início no epitélio das lamelas ovarianas a partir das ovogônias (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2002). As ovogônias são designadas quanto ao seu grau de diferenciação em ovogônia-A (indiferenciada) e ovogônia-B (diferenciada). As ovogônias-A apresentam-se envoltas pelos processos citoplasmáticos das células epiteliais pré-foliculares formando cistos que se distribuem de forma descontínua no epitélio germinativo (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011). Dentro destes cistos, as ovogônias-A passam pelo processo de diferenciação celular evoluindo para ovogônia-B. Estas últimas se dividem por sucessivas mitoses formando um conjunto de células interconectadas por pontes citoplasmáticas denominado de cisto da linhagem germinativa (PEPLING; CUEVAS; SPRADLING, 1999).

Dentro dos cistos da linhagem germinativa, as ovogônias-B passam pelo processo de meiose dando origem aos ovócitos. Durante a meiose, entretanto, o processo estaciona em diplóteno tardio, momento no qual ocorre a quebra das pontes citoplasmáticas pelas células pré-foliculares e a consequente individualização do ovócito, originando o folículo ovariano (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011). No interior do folículo, os ovócitos se desenvolvem, acumulam vitelo e maturam (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2009). A ovulação ocorre pelo local onde o folículo ovariano e o epitélio lamelar do ovário se encontram e a meiose, que só é retomada

no final da maturação, se completa após a fertilização (QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER, 2013).

A gametogênese das células germinativas de linhagem masculina tem início no epitélio dos túbulos seminíferos a partir das espermatogônias-A (GRIER; URIBE-ARANZÁBAL; PATIÑO, 2002). Estas gônias apresentam-se envoltas pelos processos citoplasmáticos das células de Sertoli formando os espermatocistos (SCHULZ *et al.*, 2010).

Contudo, de forma diferente do que acontece nas fêmeas, para a maior parte dos peixes ósseos macho, a meiose e a diferenciação dos gametas se completam no interior dos cistos (SCHULZ *et al.*, 2010).

Quagio-Grassiotto e Wildner (2013) propuseram uma caracterização das fases reprodutivas para machos (TABELA 1) e fêmeas (TABELA 2) de Teleostei de água doce baseada na proposta de Brown-Peterson *et al.* (2011) *apud* Quagio-Grassiotto e Wildner (2013) originalmente elaborada para Perciformes marinhos. Os autores salientam que o tempo de cada fase é espécie-dependente, que esquemas de classificação histológica desenvolvidas de espécies individuais podem ser acrescentadas como subfases dentro de cada fase definida e que os critérios listados para as fases podem variar, ainda, de acordo com a estratégia reprodutiva e a temperatura da água.

Tabela 1 – Fases reprodutivas de machos de Teleostei de água doce.

Fase	Características: macroscópica e microscópica
Imaturo: Nunca liberou esperma.	Testículos pequenos, translúcidos e filiformes. Somente espermatogônias indiferenciadas presentes. Lúmen dos túbulos imperceptível.
Desenvolvimento: Testículos começando a crescer e desenvolver.	Testículos pequenos, mas facilmente identificáveis. Início da espermatogênese e formação dos espermatocistos. Espermatogônias diferenciadas, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes iniciais e mesmo finais podem estar presentes no interior dos espermatocistos. Espermatozoides presentes no lúmen dos túbulos seminíferos ou ductos espermáticos. Epitélio germinativo contínuo ao longo de todo o testículo. Subfase “Desenvolvimento inicial” Apenas espermatogônias e espermatócitos primários presentes nos espermatocistos.
Apto a liberar esperma: Os peixes encontram-se aptos a liberar esperma neste ciclo, tanto em termo de desenvolvimento como fisiológicos.	Testículos grandes, firmes e opacos. Espermatozoides presentes no lúmen dos lóbulos/túbulos seminíferos e/ou ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes) podem estar presentes nos espermatocistos ao longo do epitélio seminífero/germinativo que pode ser contínuo ou descontínuo. Características do epitélio germinativo nessa fase: Inicial – epitélio contínuo ao longo de todo o testículo; Intermediária – epitélio descontínuo nas proximidades do ducto espermático; Final – epitélio descontínuo por todo o testículo. Subfase “Liberação ativa de esperma” Esperma liberado sob suave pressão do abdômen.
Regressão: Término da liberação de esperma.	Testículos pequenos e flácidos, esperma não liberado sob pressão. Presença de espermatozoides residuais no lúmen dos túbulos seminíferos e/ou ductos espermáticos. Espermatocistos contendo espermatídes não liberadas, dispersos pelo epitélio seminífero. Proliferação das espermatogônias e regeneração do epitélio germinativo podem ter início.
Regeneração: Maduro sexualmente, reprodutivamente inativo.	Testículos pequenos, filiformes. Lúmen dos túbulos seminíferos não detectável ou discreto. Espermatogônias em proliferação por todo testículo. Epitélio seminífero contínuo. Espermatocistos podem estar ausentes. Espermatozoides residuais ocasionalmente presentes no lúmen dos lóbulos/túbulos seminíferos e ducto espermático.

Fonte: Adaptada de Quagio-Grassiotto e Wildner (2013).

Tabela 2 – Fases reprodutivas de fêmea de Teleostei de água doce.

Fase	Características: macroscópica e microscópica
Imaturo: Nunca desovado.	Ovários pequenos, muitas vezes claros, vasos sanguíneos não distinguíveis. Apenas ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário presentes, sem atresia. Parede do ovário fina e pouco espaço entre os ovócitos.
Desenvolvimento: Ovários em início ou em desenvolvimento, não prontos para desovar.	Ovários em expansão, vasos sanguíneos tornando-se mais evidentes. Ovócitos em crescimento primário; com alvéolos corticais e em início de vitelogênese presentes. Não evidência de folículos desovados ou ovócitos completamente desenvolvidos. Alguns ovócitos atrésicos podem estar presentes. Subfase “Desenvolvimento inicial”: Apenas ovócitos em crescimento primário e aqueles com alvéolos corticais estão presentes. Em espécies com fecundidade indeterminada: ovócitos em vitelogênese intermediária estão presentes.
Apto à desova: Os peixes encontram-se aptos para desovar neste ciclo, tanto em termos de desenvolvimento, como fisiológicos.	Ovários grandes, vasos sanguíneos evidentes. Ovócitos individuais visíveis macroscopicamente. Presença de ovócitos vitelogênicos finais/completamente desenvolvidos. Algumas atresias e folículos desovados tardios podem estar presentes. Em espécies de <i>Fecundidade determinada</i> : Predominância de ovócitos vitelogênicos finais. Em espécies de <i>Fecundidade indeterminada</i> : Prevalencem os ovócitos vitelogênicos intermediários e finais (com ou sem evidência de desova anterior/presença de folículos pós-ovulatórios); ou ovócitos vitelogênicos iniciais com evidência de desova anterior (presença de folículos pós-ovulatórios). Subfase “Desova ativa”: Presença de ovócitos em maturação final, ovulando ou folículos pós-ovulatórios. Não ocorre hidratação intrafolicular.
Regressão: Término da desova.	Ovários flácidos, vasos sanguíneos proeminentes. Folículos atrésicos e folículos pós-ovulatórios presentes. Ovócitos com alvéolos corticais e/ou em vitelogênese podem estar presentes.
Regeneração: Maduro sexualmente, reprodutivamente inativo.	Ovários pequenos, parede ovariana espessa, vasos sanguíneos reduzidos. Presença apenas de ovogônias, ovócitos profásicos iniciais e ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário. Vasos sanguíneos dilatados, folículos atrésicos ou folículos pós-ovulatórios em degeneração podem estar presentes.

Fonte: Adaptada de Quagio-Grassiotto e Wildner (2013).

2.4. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Cichlidae ou ciclídeo é a maior família de peixes em termos numéricos existente no planeta. Dentre os ciclídeos, existem cerca de 70 espécies que são designadas mundialmente pelo nome popular de *tilápia* (tilápia em português) e todas elas pertencem a três gêneros: *Oreochromis*, *Tilapia* e *Sarotherodon*. (ZIMMERMANN, 1999)

De acordo com Kubitza (2011), a tilápia do Nilo (FIGURA 5) adulta é onívora com tendência herbívora. Contudo, durante o desenvolvimento desde a fase larval, os indivíduos consomem diferentes itens alimentares. Durante o período larval, esta espécie alimenta-se basicamente de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton). Durante o crescimento são incluídos novos itens alimentares como seres bentônicos, algas, pequenas plantas aquáticas, detritos orgânicos e pequenos animais tais como anelídeos (poliquetas e minhocas), micro crustáceos e insetos aquáticos, além do plâncton.

Figura 5 – Exemplar de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) produzida na Estação de Aquicultura Professor Doutor Raimundo Saraiva da Costa do *Campus* do Pici da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: Autor (2020)

2.4.1. Breve histórico da introdução e da produção

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é originária do continente africano e foi oficialmente introduzida no Brasil em 1971 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) na cidade de Pentecoste, estado do Ceará. O objetivo do DNOCS foi a produção de formas jovens para fins de soltura em reservatórios públicos da Região Nordeste e para fomento da produção em cativeiro. Esta linhagem importada no início da década de 1970 ficou conhecida como Bouaké, cidade da Costa do Marfim, África, de onde vieram os peixes (ZIMMERMANN, 1999).

Além da linhagem Bouaké, outras três linhagens merecem destaque no Brasil. A segunda importação oficial de matrizes de tilápia ocorreu em 1996 com espécimes vindos da Tailândia para a cidade de Londrina (PR), linhagem conhecida como Tailandesa ou Chitralada (ZIMMERMANN, 1999). Em 2002, foi introduzida pela

Piscicultura Aquabel a linhagem GST (GenoMar Supreme Tilapia) desenvolvida pela empresa Genomar, linhagem mais conhecida como Tilápia Supreme (CYRINO *et al.*, 2004). No ano 2005 foi introduzida em Maringá (PR) a linhagem conhecida como GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) proveniente da Malásia.

Após superadas algumas questões técnicas referentes à produção comercial, a tilápia teve rápida aceitação tanto pelos produtores, devido a características como rusticidade, rápido crescimento, fácil reprodução em cativeiro durante todo o ano, boa resistência em relação aos parâmetros de qualidade de água, aceita adensamento, se alimenta de ração artificial desde a fase de larva; quanto pelo mercado consumidor devido boa qualidade da sua carne de cor branca, textura firme, sabor suave e presença de poucos espinhos. Além destas características, o Brasil possui amplo território, grande disponibilidade hídrica, forte mercado interno, produção elevada de grãos (utilizados na fabricação da ração) e apresenta clima tropical (compatível com o clima da região originária da tilápia).

Segundo a FAO (2018), a tilápia do Nilo é atualmente produzida em 87 países e foi a quarta espécie mais produzida no mundo no ano de 2016 (4,2 milhões de toneladas), ficando atrás apenas da carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*), da carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e da carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Segundo os dados apresentados pela Peixe BR (2019), o Brasil destaca-se na produção mundial de tilápia do Nilo ocupando quarta colocação com uma produção de 400.280 toneladas em 2018, ficando atrás da China (1,93 milhão de toneladas), Indonésia (1,35 milhão de toneladas) e Egito (900 mil toneladas). Comparado ao ano anterior, 2017, houve um incremento de 11,9% na produção de tilápia do Nilo. Nesse mesmo ano, o Nordeste produziu cerca de 78.800 toneladas ficando a sua frente a região Sul (160.900 toneladas) e a região Sudeste (116.500 toneladas).

O Ceará, que no início da década de 2000 liderava a produção nacional de tilápia do Nilo, chegando a produzir 18 mil toneladas em 2004, produziu 4.900 toneladas de tilápia do Nilo em 2018, ocupando apenas a 12ª colocação no *ranking* nacional (PEIXE BR, 2019). Fatores como prolongados períodos de estiagem e o consequente baixo volume dos açudes foram decisivos para esta produção baixa.

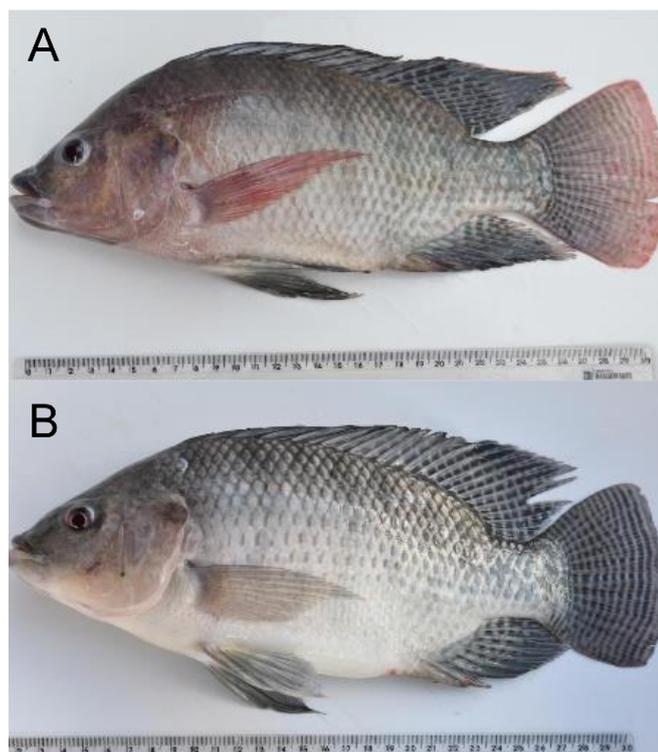
2.4.2. Dimorfismo sexual

Assim como grande parte dos ciclídeos, a tilápia do Nilo apresenta dimorfismo sexual, que são características externas que permitem distinguir machos de fêmeas. Algumas destas características são uteis como indicativo do sexo ao qual o indivíduo pertence enquanto outras estão presentes em apenas um dos sexos.

Um exemplar macho típico de tilápia do Nilo sexualmente maduro apresenta coloração avermelhada na região ventral do corpo incluindo as nadadeiras peitorais, pélvicas, anal e caudal. Estes indivíduos apresentam a cabeça proporcionalmente maior em relação ao corpo e boca proeminente. Além disto, os machos costumam ser maiores, tanto em comprimento quanto peso, que as fêmeas de mesma idade.

A fêmea, por outro lado, costuma ser menor que o macho e apresenta ventre variando de branco a amarelado, nadadeira peitoral incolor e nadadeiras pélvicas, anal e caudal cinzas. Exemplares fêmea apresentam a cabeça proporcionalmente menor em relação ao tamanho do corpo e boca pouco proeminente (FIGURA 6).

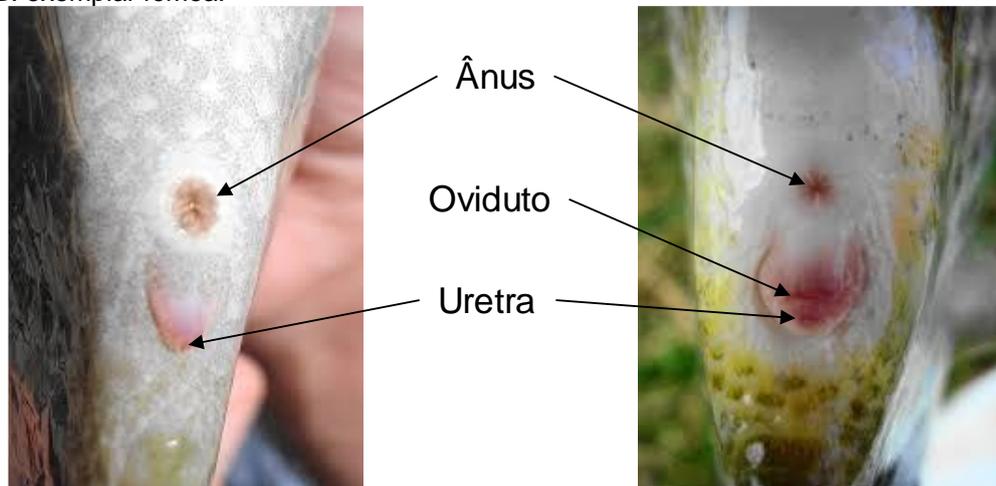
Figura 6 – Exemplares adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A: exemplar macho. B: exemplar fêmea



Fonte: <http://recursospesqueiros.mc.ifrn.edu.br>

Entretanto, a característica externa inequívoca quanto ao sexo do indivíduo está na conformação da papila urogenital e no número de orifícios que ela apresenta, conforme pode ser observado na Figura 7. No macho, a papila urogenital apresenta formato afilado em forma aproximada de letra “V” e apresenta apenas dois orifícios, o ânus e a uretra. Na fêmea, a papila apresenta formato aproximadamente redondo e nela é possível observar três orifícios, o ânus, a uretra, assim como nos machos, e o oviduto. Além disto, a papila urogenital da fêmea apresenta-se avermelhada na época do acasalamento.

Figura 7 – Anatomia externa da papila urogenital da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A: exemplar macho. B: exemplar fêmea.



Fonte: <https://core.ac.uk/download/pdf/15434611.pdf>

Quanto às características internas, é possível distinguir facilmente indivíduos maduros. Nas fêmeas é possível observar as gônadas (ovários) bem desenvolvidas com presença de ovócitos visíveis macroscopicamente com uma coloração amarela bem evidente. Nos machos, as gônadas (testículos) são menores e apresentam coloração esbranquiçada (FIGURA 8).

Figura 8 – Aspecto externo de gônadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A: gônadas de um exemplar fêmea (ovário). B: gônadas de um exemplar macho (testículo)



Fonte: Autor (2020)

2.4.3. Produção de lotes monossexo para fins comerciais

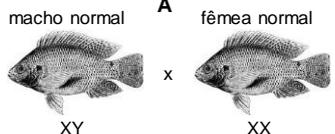
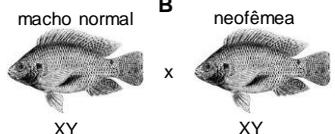
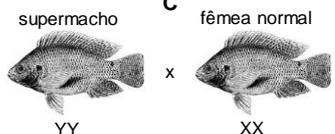
Até a década de 1990 as iniciativas de produção comercial de tilápia do Nilo do Brasil obtiveram pouco sucesso devido à ausência de conhecimento e a difusão das técnicas de incubação artificial e, principalmente, devido ao desconhecimento de técnicas de produção de lotes masculinos por meio da indução hormonal, também conhecida como masculinização (KUBITZA, 2003).

A técnica de maculinização de diversas espécies de tilápia por meio de ingestão de ração contendo hormônio masculino é conhecida mundialmente desde a década de 1970 (GUERRERO, 1975). Este autor avaliou com sucesso a utilização de três andrógenos, o acetato de dihidrotestosterona, o 17α -etiniltestosterona e 17α -metiltestosterona, sendo este último o mais amplamente utilizado atualmente.

Guerrero (1975) afirma ainda que para que o processo de indução hormonal seja efetivo, este deve ser iniciado nos primeiros dias de vida dos indivíduos e durar entre 30 e 50 dias, período no qual ocorre a diferenciação das características e estruturas reprodutivas externas, como coloração, desenvolvimento de nadadeiras e adornos, e internas, como desenvolvimento de testículos e ovários.

Outra forma, porém, menos difundida, de produção de lotes 100% masculinos é por meio da produção de machos com carga genética YY, conhecido como supermacho (FIGURA 9).

Figura 9 – Representação dos cruzamentos de tilápia Nilo (*Oreochromis niloticus*) para produção de supermacho. A: cruzamento entre um macho normal e uma fêmea normal; B: cruzamento entre um macho normal e uma neofêmea; C: cruzamento entre um supermacho e uma fêmea normal.

Geração Parental													
F1	XX	XX	XY	XY	XX	XY	XY	YY	XY	XY	XY	XY	
Proporção	50% fêmea		50% macho		25% fêmeas	50% macho	25% supermacho	75% macho					100% macho

Fonte: Autor (2020)

Segundo Turra *et al.* (2010), a primeira etapa para a formação de supermachos é a feminização de larvas indiferenciadas para produzir fêmeas fenotípicas XY (neofêmea), utilizando o hormônio 17β -estradiol. O cruzamento de uma neofêmea (XY) com um macho normal (XY) gera as seguintes proporções genotípicas: 25% de fêmeas normais (XX), 50% de machos normais (XY) e 25% de supermachos (YY). O cruzamento de um supermacho (YY) com uma fêmea normal (XX) gera uma prole com 100% de machos normais (XY).

2.5. Reúso de águas residuárias na aquicultura

Segundo Mota, Aquino e Santos (2007), o reúso de água pode ser classificado como direto e indireto. Reúso direto é quando os efluentes, após devidamente tratados, são encaminhados diretamente de seu ponto de descarga até o local do reúso, que pode ser interno (reciclagem) ou externo ao local onde são produzidos. São exemplos de reúso direto: irrigação, dessedentação de animais, aquicultura dentre outros.

Ainda segundo estes autores, o reúso indireto, por outro lado, pode ser feito de forma planejada ou não planejada. O primeiro ocorre quando os efluente, depois de devidamente tratados são descarregados de forma planejada nos corpos de água superficiais ou subterrâneos, para serem utilizados a jusante em sua forma diluída e de maneira controlada. O reúso indireto não planejado ocorre quando a água, já utilizada uma ou mais vezes em alguma atividade humana, é descartada no meio ambiente e novamente utilizada, em sua forma diluída, de maneira não intencional.

Segundo definição da FAO (2018) entende-se por aquicultura a criação de organismos estritamente aquáticos ou que passam pelo menos uma fase da vida na

água ou que possuem uma relação de dependência com a água. Como exemplos de aquicultura tem-se a criação de peixes (piscicultura), moluscos (malacocultura), crustáceos (carcinicultura), vegetais aquáticos (algicultura no caso específico das algas), crocodilianos (crocodilo, jacaré, aligador e gavial), tartarugas, anfíbios (ranicultura, criação de rãs), mamíferos aquáticos, dentre outros. Ainda segundo esta entidade, para que a atividade seja classificada como aquicultura, é necessário que haja alguma forma de manejo regular como estocagens de novos indivíduos, alimentação, proteção contra predadores, acompanhamento do desenvolvimento, monitoramento e manutenção da qualidade da água etc. Por fim, para que seja uma atividade aquícola, o empreendimento deve possuir um dono, seja ele um indivíduo, uma associação, uma empresa ou o governo.

A aquicultura possui como seu principal insumo a água. Com a desigualdade existente na distribuição de água no mundo, e em particular no Brasil, associada ao crescimento populacional e à degradação de sua qualidade devido a atividades antrópicas, a aquicultura com a reutilização da água proveniente de esgotos sanitários constitui fonte alternativa de produção de proteína a baixo custo, além de funcionar como uma forma de reciclagem de nutrientes (AQUINO; GRADVOHL; SANTOS, 2007).

Bastos *et al.* (2003) salientam que deve haver, como garantia da sustentabilidade da atividade, preocupação constante com a natureza do esgoto ou do efluente tratado sobre a qualidade da água destinada à produção de pescado e sobre a qualidade do produto final. Os autores elencam como pontos importantes a serem observados a carga orgânica sobre os níveis de oxigênio dissolvido, a toxicidade da salinidade, a concentração de amônia e os metais pesados. Sá (2012) ainda acrescenta que transparência, pH, temperatura, nitrito e alcalinidade são parâmetros importantes que devem ser acompanhados e corrigidos na criação de qualquer espécie aquática. Contudo, atualmente é de extrema importância acrescentar a esta lista prioritária de parâmetros os poluentes emergentes, em especial os desreguladores endócrinos, a exemplo do que foi feito pela *European Commission* (EC, 2012).

Do ponto de vista microbiológico, a Organização Mundial da Saúde – OMS (*World Health Organization – WHO*) apresenta um guia que traça diretrizes para o uso seguro de efluente em aquicultura. O objetivo principal é identificar os perigos, definir os riscos que eles representam para os grupos vulneráveis e propor medidas que

reduzam ou eliminem tais riscos. Na Tabela 3 podem ser observados os níveis de qualidade microbiológica para a aquicultura em água de reúso recomendados pela OMS (WHO, 2006).

Tabela 3 – Qualidade microbiológica da água de esgoto sanitário para utilização em aquicultura.

Meio	Ovos viáveis de trematóides (Incluindo ovos de esquistossoma quando for o caso) (número por 100 mL ou grama de sólidos totais ^a)	<i>E. coli</i> (média aritmética por 100 mL ou por grama de sólidos totais ^{a,b})	Ovos de helmintos (média aritmética por litro ou por grama de sólidos totais ^{a,c})
Consumidores			
Água do tanque/viveiro	Não detectável	$\leq 10^4$	≤ 1
Esgoto sanitário	Não detectável	$\leq 10^5$	≤ 1
Excretas tratados	Não detectável	$\leq 10^6$	≤ 1
Musculatura do peixe	Cercária infectável não detectável ou não infectável.	Especificações da Codex ^d	Não detectável
Trabalhadores e comunidade local			
Água do tanque/viveiro	Não detectável ^e	$\leq 10^3$	≤ 1
Esgoto sanitário	Não detectável ^e	$\leq 10^4$	≤ 1
Excretas tratados	Não detectável ^e	$\leq 10^5$	≤ 1

Fonte: Adaptado de WHO (2006)

^aAs excretas são medidas em gramas de sólidos totais (peso seco); 100 mL de esgoto sanitário/excreta contem aproximadamente 1 a 4 gramas de sólidos totais;

^bA média aritmética deve ser determinada ao longo do ciclo produtivo. Exemplo, um valor médio $\leq 10^4$ para *E. coli* em 100 mL deve ser atingido em, pelo menos, 90% das amostras para que valores maiores (10^5 ou 10^6 de *E. coli* em 100 mL, por exemplo) sejam tolerados;

^cA média aritmética deve ser determinada ao longo do ciclo produtivo. Exemplo, um valor médio ≤ 1 ovo por litro deve ser atingido em, pelo menos, 90% das amostras para que valores maiores (>10 ovos por litro, por exemplo) sejam tolerados;

^dCodex *Alimentarius Commission* não especifica a carga microbiológica na musculatura do peixe; em vez disso recomenda a adoção dos princípios da Avaliação de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na produção e no consumo.

No Brasil, o Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB) elaborou diretrizes para uso de esgotos sanitários em piscicultura (TABELA 4) baseadas nas publicações da OMS, no estado da arte do conhecimento sobre remoção de patógenos por meio do tratamento de esgotos e no conhecimento acumulado sobre a qualidade sanitária de peixes criados em esgoto sanitário, inclusive em edições anteriores do próprio PROSAB (BASTOS; BEVILACQUA, 2006).

Tabela 4 – Diretrizes do PROSAB para usos de esgotos sanitários em piscicultura⁽¹⁾.

Ponto de amostragem	CT _{er} 100 mL ⁻¹ (2)	Ovos de helmintos L ⁻¹	
		Nematóides intestinais humanos ⁽³⁾	Trematóides
Afluente ao tanque de piscicultura	≤ 1 x 10 ⁴	≤ 1	ND
No tanque de piscicultura	≤ 1 x 10 ³	≤ 1	ND

Fonte: Bastos e Bevilacqua (2006).

(1) Para uso do esgoto tratado em piscicultura não há padrão explícito de DBO, DQO e SST, sendo as concentrações efluentes uma consequência das técnicas de tratamento compatíveis com a qualidade microbiológica estipulada. Entretanto recomendam-se taxas de aplicação superficial nos tanques de piscicultura da ordem de 10-20 kg DBO ha⁻¹ dia⁻¹ e 4 kg N ha⁻¹ dia⁻¹. Deve-se observar que a amônia livre é tóxica aos peixes em níveis a 2-5 mg N L⁻¹;

(2) Coliformes termotolerantes; média geométrica, alternativa e preferencialmente pode-se determinar *E. coli*;

(3) Média aritmética.

Segundo Santos *et al.* (2014) a utilização de água de reúso para a criação de organismos aquáticos deve ser considerada dada as características de sustentabilidade que tal uso pode conferir a atividade. Além disto, ainda segundo os autores, na busca pelo uso racional da água é possível reutilizar e, assim, disponibilizar maior volume de água de melhor qualidade para usos ditos nobres, como abastecimento humano, por exemplo.

A questão do reúso ganha ainda mais força quando se observam os números da produção mundial de pescado apresentados pela FAO (2018). Segundo esta entidade, a aquicultura sozinha foi responsável pela produção de aproximadamente 80,0 milhões de toneladas de pescado em 2016, o que representou 47% da produção total de 171 milhões de toneladas.

Quando da escolha da espécie a ser utilizada em aquicultura com água de reúso, é importante realizar uma análise combinada cruzando as características do efluente antes e depois de um possível tratamento com as características da espécie no que diz respeito, principalmente, às exigências quanto a qualidade de água e quanto aos hábitos alimentares.

Santos e Silva (2007) relatam que o esgoto doméstico é composto por 99,9% de água e 0,1% de matéria orgânica, sabões, alvejantes, papel, plástico, detergente, desinfetante e areia, além de concentrações consideráveis de nutrientes, como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), o que possibilita o desenvolvimento de grande biomassa algal.

A Tabela 5 mostra a composição típica do esgoto que foi utilizado para realização de pesquisas no âmbito do Prosab 5, Tema 2, envolvendo a criação de tilápia do Nilo em esgoto doméstico tratado (MOTA *et al.*; 2009). Os experimentos

foram realizados no Centro de Pesquisa sobre Tratamento de Esgoto e Reúso de Águas, situado na estação de tratamento de esgoto da Cagece (Companhia de Água e Esgoto do Ceará), localizada no município de Aquiraz, estado do Ceará. O esgoto utilizado na pesquisa foi o efluente final de um sistema de tratamento em lagoas de estabilização em série, composto por uma lagoa anaeróbia, uma facultativa e duas de maturação.

Tabela 5 – Característica do esgoto efluente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia de Água e Esgoto do Ceará (Cagece) utilizada no Centro de Pesquisa sobre Tratamento de Esgoto e Reúso de Água para realização de pesquisas envolvendo criação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Parâmetro	N	Valor médio
pH	13	7,8
Condutividade (mS/cm)	13	727
RAS (mmol/L)	13	3,8
Sódio (mg/L)	3	53,7
Cálcio (mg/L)	3	45,4
Magnésio (mg/L)	3	28,0
Potássio (mg/L)	6	26,2
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	11	148
Cloretos (mg Cl ⁻ /L)	4	93
DBO (mg/L)	5	37
DQO total (mg/L)	10	112
DQO filtrada (mg/L)	6	51
ST (mg/L)	5	521
SST (mg/L)	4	15
STD (mg/L)	4	548
Amônia (mg N-NH ₃ /L)	3	7,7
Fósforo (mg/L)	7	12,8
Coliformes totais (NMP/100mL)	6	6,5 x 10 ²
<i>E. coli</i> (NMP/100 mL)	5	77,3
Ovos de helmintos (ovos/L)	5	0,4
Turbidez (UT)	11	29,6

Fonte: Mota *et al.* (2009)

N: número de mostras; RAS: razão de absorção de sódio; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; DQO: demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SST: sólidos suspensos totais; STD: sólidos totais dissolvidos.

Desta forma, na seleção da espécie de organismo aquático a ser utilizado, convém utilizar indivíduos que sejam capazes de consumir a biomassa algal e as partículas de matéria orgânica convertendo-as em crescimento somático. As espécies de peixes mais utilizadas na aquicultura com água de reúso são algumas espécies de carpa (*Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* e *Ctenopharyngodon idella*) e de tilápia (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis mossambicus* e *Oreochromis hornorum*).

Santos *et al.* (2009b) desenvolveram uma pesquisa na qual demonstraram que a tilápia do Nilo é capaz de aproveitar de forma efetiva a biomassa presente em

tanques de piscicultura abastecidos com água proveniente de uma ETE. O esgoto doméstico utilizado na pesquisa foi tratado passando por uma lagoa anaeróbia, uma facultativa e duas de maturação. Os pesquisadores adotaram três tratamentos: 1) oferta de ração de acordo com as orientações do fabricante; 2) oferta de 50% da ração recomendada pelo fabricante; e 3) sem oferta de ração. Os resultados mostraram que o peso final dos peixes foi superior para o tratamento com oferta de 50% da ração, seguido pelos tratamentos sem ração e com oferta de 100% da ração recomendada.

Fontenele, Santos e Mota (2013) demonstraram, por meio da avaliação do índice de *rigor mortis* (IRM), que a carga microbiana presente na tilápia do Nilo criada em esgoto doméstico tratado não influenciou no frescor do produto final. Os tratamentos avaliados pelos autores foram combinações de com e sem depuração e abatidos com eugenol e por hipotermia. Fontenele, Santos e Mota (2013) salientam, ainda, que segundo os níveis de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes o pescado apresentava condições sanitárias satisfatórias para o consumo humano segundo os critérios adotados na Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos.

Em uma pesquisa avaliando a sustentabilidade da utilização de esgotos domésticos tratados na criação do peixe ornamental molinésia (*Mollienesia* spp.), Santos (2012), avaliou a adaptação da espécie ao novo meio de criação, o desempenho zootécnico e o rendimento econômico. O autor encontrou que as melhores condições para os três quesitos avaliados foram observadas para o tratamento que utilizou o esgoto doméstico tratado diluído com água subterrânea na proporção de 1:1.

No Brasil é usual o reúso indireto não planejado, o que pode resultar na utilização de água com presença de poluentes, inclusive desreguladores endócrinos. Os criadores de organismos aquáticos devem ser alertados deste risco, devendo adotar medidas prévias de tratamento da água utilizada bem como utilizar esta água pelo maior tempo que for possível por meio da adoção de criação em sistemas de recirculação de água.

Segundo Timmons, Ebeling e Piedrahita (2009) a qualidade do pescado é tão boa quanto a da água onde ele é criado e as empresas que criam organismos aquáticos em sistemas fechados de recirculação podem controlar a qualidade da água

para assegurar um produto livre de contaminantes, diferentemente daquelas que o fazem em sistemas tradicionais abertos como viveiros e tanques-rede. Estes autores acreditam que os métodos tradicionais não são sustentáveis a longo prazo devido a fatores relacionados ao meio ambiente e sua incapacidade de garantir ao consumidor final a segurança alimentar do produto.

Um sistema de recirculação de água para criação de organismos aquáticos pode ser composto por uma série de unidades de tratamento de água, como por exemplo: remoção de sólidos, reatores biológicos para nitrificação, unidade desgaseificadora para eliminação de dióxido de carbono, incorporação de oxigênio e métodos oxidativos como radiação ultra violeta e utilização de ozônio (LEKANG, 2013).

De acordo com Lekang (2013) e Timmons, Ebeling e Piedrahita (2009), podemos destacar como principais vantagens dos sistemas de recirculação de água para criação de organismos aquáticos, além do já mencionado controle da qualidade da água: menor demanda por água; menor demanda por espaço; redução da liberação de efluentes; condições controladas para otimizar a produção; maior controle da alimentação; exclusão de predadores; menor necessidade de utilização de químicos, dentre outras.

2.6. Legislação referente à qualidade de água

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA). Este conselho tem como uma de suas competências estabelecer normas, critérios e padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente, com vistas ao uso racional dos recursos ambientais, principalmente os recursos hídricos. Neste âmbito tem-se a Resolução no 357 de março de 2005 (BRASIL, 2005) que trata do enquadramento dos corpos de água superficiais doce, salobra e salina e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Posteriormente tem-se a Resolução 430/2011 (BRASIL, 2011a) que complementa e altera a anteriormente citada, dispondo sobre condições, parâmetros e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores.

Outro documento relevante que trata de qualidade de água, mas dessa vez para consumo humano, é a Portaria 2.914 do Ministério da Saúde de 12 de dezembro

de 2011 (BRASIL, 2011b), ratificada pela Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde. Este documento dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Mesmo sendo recentes, as resoluções do CONAMA e a portaria do Ministério da Saúde não contemplam os desreguladores endócrinos e os compostos de preocupação emergentes de uma forma geral. Neste quesito, o mesmo ocorre com os demais países do mundo devido a já mencionada ausência, escassez ou contraditoriedade dos dados toxicológicos apresentados até o momento. É importante ressaltar, porém, que os primeiros passos já foram dados com a inclusão de alguns destes compostos químicos, incluindo o 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol, em listas de atenção e prioritárias em alguns países como os pertencentes à União Europeia, EUA e Austrália (LIMA *et al.*; 2017).

Segundo Souza *et al.*; (2019), atualmente os estudos e o monitoramento das concentrações dos poluentes emergentes têm sido realizados por um pequeno grupo de pesquisadores e de forma muito tímida pelos prestadores de serviço de abastecimento de água. Além disto, os esforços têm se concentrado em um pequeno grupo de compostos, como alguns hormônios estrogênicos, antibióticos, anti-inflamatórios e antilipêmicos. Como motivo para a pequena quantidade de estudos realizados com poluentes emergentes, Souza *et al.* (2019) apontam a exigência de mão de obra altamente qualificada, equipamentos e infraestrutura sofisticados e a ausência de política de priorização nos editais de fomento.

Embora estes contaminantes não sejam ainda regulamentados pelas agências ambientais reguladoras, estudos relacionados com sua ocorrência, concentração e efeitos auxiliam na formação de um banco de dados que podem contribuir para a elaboração de políticas públicas futuras no tocante a manutenção da qualidade dos corpos de água no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização da pesquisa e aquisição dos espécimes

A pesquisa foi desenvolvida por meio de um trabalho conjunto entre o Laboratório de Recursos Aquáticos do Departamento de Engenharia de Pesca (LARAq/DEP), o Laboratório de Saneamento do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (LABOSAN/DEHA) e o Laboratório de Histologia e Reprodução Animal (LAHRA) do Departamento de Biologia. Todos os laboratórios citados localizam-se no *campus* do Pici da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE.

Para realização da presente pesquisa foram utilizados ovos e larvas recém eclodidas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os indivíduos foram adquiridos na Estação da Aquicultura Professor Doutor Raimundo Saraiva da Costa (DEP/UFC).

3.2. Experimentos desenvolvidos

Ao longo do período compreendido entre 23/09/2015 e 08/05/2019, foram desenvolvidos quatro experimentos: 1) Experimento 01: avaliação dos efeitos do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo nas concentrações de 250 ng L^{-1} ; 500 ng L^{-1} e 1.000 ng L^{-1} ; 2) Experimento 02: avaliação dos efeitos do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo nas concentrações de $250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; 3) Experimento 03: avaliação dos efeitos do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo na concentração de $160 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; e 4) Experimento 04: avaliação dos efeitos do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo na concentração de $160 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ durante intervalos de tempo variados: 1, 2, 3 e 4 semanas. O Quadro 1 mostra a ordem cronológica das etapas envolvidas no desenvolvimento desta pesquisa.

Quadro 1 – Ordem cronológica das etapas envolvidas no desenvolvimento da presente pesquisa

Etapa	Início	Conclusão	Período (dias)
Experimento 01	23/09/2015	20/12/2015	88
Exposição hormonal dos peixes	23/09/2015	21/10/2015	28
Período de crescimento	21/10/2015	20/12/2015	60
Experimento 02	18/09/2017	06/11/2017	49
Teste de concentração	18/09/2017	25/09/2017	7
Período de incubação dos ovos	02/10/2017	09/10/2017	7
Exposição hormonal dos peixes	09/10/2017	06/11/2017	28
Experimento 03	30/01/2018	11/07/2018	162
Teste de concentração	30/01/2018	06/02/2018	7
Exposição hormonal dos peixes	11/02/2018	11/03/2018	28
Período de crescimento	11/03/2018	11/07/2018	122
Experimento 04	05/09/2018	08/05/2019	245
Exposição hormonal dos peixes	05/09/2018	03/10/2018	28
Período de crescimento	03/10/2018	08/05/2019	217

Fonte: Autor (2020)

3.3. Procedimentos comuns a todos os experimentos

3.3.1. Alimentação e manutenção da qualidade da água

Durante o período de exposição aos hormônios 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2), que variou de uma a quatro semanas, os indivíduos foram mantidos em aquários com volume útil de 40 L (unidade experimental), iluminação artificial controlada por temporizador (fotoperíodo de 10 horas de claro e 14 horas de escuro) e aeração constante fornecida com um compressor de ar (vazão nominal de 120 L min^{-1}) conectado a diversas pedras porosas (FIGURA 10).

Figura 10 – Vista panorâmica da bancada do Laboratório de Recursos Aquáticos na qual foram dispostas as unidades experimentais (aquários de 40 L) utilizadas para exposição hormonal de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a presente pesquisa. As setas indicam a tubulação de aeração.



Fonte: Autor (2020)

A água para abastecimento dos aquários foi proveniente da companhia de abastecimento da cidade de Fortaleza, a qual permanecia reservada em um tanque de 1.000 L e mantida sob aeração vigorosa por, pelo menos, 24h, para volatilização do cloro.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia com ração em pó específica para tilápia no estágio de desenvolvimento em que se encontravam (ração em pó até 1 g e ração peletizada a partir deste tamanho, segundo recomendação do fabricante), nos horários de 09h00min, 12h00min, 14h00min e 16h30min. Inicialmente, foi ofertada a quantidade de ração especificada pelo fabricante. Ao longo do desenvolvimento dos indivíduos, esta quantidade foi ajustada de acordo com a saciedade aparente dos peixes.

Os parâmetros de qualidade de água avaliados rotineiramente foram oxigênio dissolvido (OD) e temperatura (FIGURA 11), monitorados diariamente com auxílio de um oxímetro; e pH, nitrogênio amoniacal total ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$; NAT) e nitrito (NO_2^-), medidos a cada 5 dias, com auxílio de testes colorimétricos utilizados segundo as instruções do fabricante.

Figura 11 – Oxímetro (Instrutherm, MO-900) utilizado para medição da concentração de oxigênio dissolvido e da temperatura da água de criação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante os período de exposição hormonal aos hormônios 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) e de crescimento.



Fonte: <https://www.instrutherm.net.br/medidor-de-oxigenio-dissolvido-mod-mo-900.html>

De forma indireta, partindo-se dos valores de NAT e do cruzamento dos dados de pH e temperatura (TABELA 6), foi obtida a concentração de amônia não ionizada (NH_3).

A manutenção da qualidade da água foi feita diariamente por meio de sifonamento das fezes e dos restos alimentares, sempre antes da primeira

alimentação. Este manejo foi dividido em duas etapas: 1) manutenção da qualidade da água durante a exposição hormonal; e 2) manutenção da qualidade da água após a exposição hormonal.

Tabela 6 – Porcentagem de amônia não ionizada para água doce em função do pH e da temperatura.

pH	Temperatura da água (°C)							
	18	20	22	24	26	28	30	32
6,00	0,034	0,039	0,045	0,052	0,060	0,069	0,079	0,091
6,50	0,107	0,124	0,143	0,165	0,190	0,218	0,251	0,287
7,00	0,337	0,390	0,451	0,520	0,598	0,688	0,788	0,902
7,50	1,057	1,223	1,411	1,626	1,868	2,142	2,451	2,799
8,00	3,268	3,767	4,331	4,966	5,679	6,475	7,362	8,345
8,50	9,651	11,020	12,520	14,180	15,990	17,960	20,080	22,360
9,00	25,250	28,130	31,160	34,320	37,580	40,910	44,280	47,660
9,50	51,650	55,320	58,880	62,300	65,560	68,650	71,530	74,220
10,00	77,160	79,650	81,910	83,940	85,760	87,380	88,820	90,100

Fonte: Adaptada de Timmons, Ebeling e Piedrahita (2009).

Durante a exposição hormonal a água sifonada, contendo fezes e ração não consumida, foi filtrada com auxílio de uma manta acrílica e devolvida ao seu respectivo aquário. Nesta etapa, o tempo de sifonamento foi suficiente apenas para a remoção dos detritos, não havendo controle do volume drenado. Adicionalmente, uma vez por semana, toda a água do aquário foi renovada e a dosagem hormonal readministrada. A água drenada dos aquários durante esta renovação foi depositada em um reservatório de 1.000 L e tratada com radiação ultravioleta (FIGURA 12) por uma semana antes do descarte final, segundo dados apresentados por Briket e Lester (2003) e Sornalingam, McDonagh e Zhou (2016).

Figura 12 – Sistema de tratamento de água com radiação ultravioleta (UV) para inativação dos hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) utilizados durante o período de exposição da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A seta indica o reator UV.



Fonte: Autor (2020)

Durante os procedimentos descritos nesta etapa, foi necessário a utilização de luvas de procedimento de látex, a fim de evitar o contato da pele com a água contendo hormônio.

Após o término da exposição hormonal, a água de todos os aquários foi completamente drenada e depositada em um reservatório de 1.000 L, para tratamento com UV conforme já especificado. Os aquários foram então lavados com água e sabão e abundantemente enxaguados.

Na segunda etapa, para a manutenção da qualidade da água, o volume sifonado para remoção de material particulado passou a ser descartado e o nível da unidade experimental recomposto com água nova. Desta forma, padronizou-se um percentual de 10% do volume total para a reposição diária.

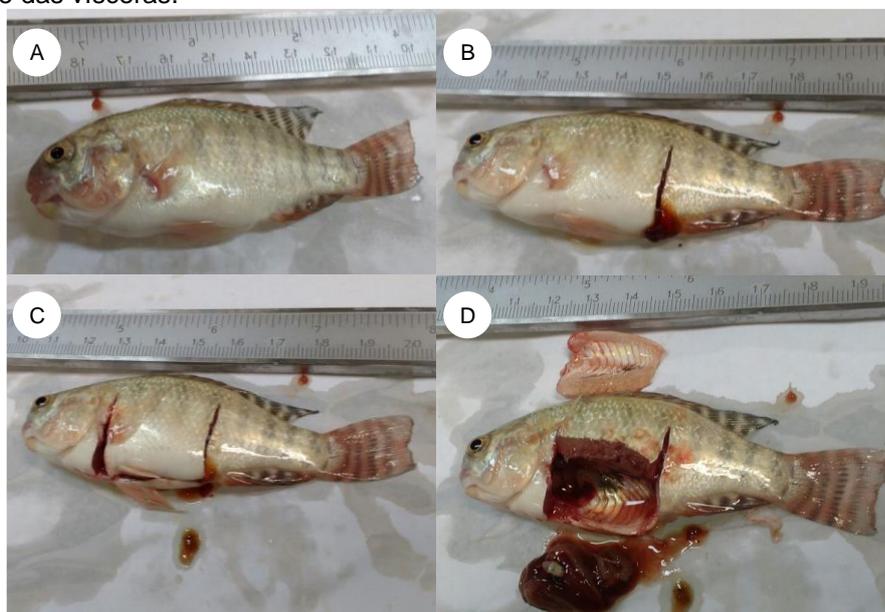
Os peixes permaneceram sob esta condição até que atingissem tamanho adequado, para que fosse possível realizar a remoção das gônadas para as análises histológicas, segundo a necessidade de cada experimento desenvolvido.

3.3.2. Histologia

Após atingirem tamanho adequado, os peixes foram eutanasiados por insensibilização em gelo, as gônadas removidas (FIGURA 13), estocadas em microcassetes histológicos, etiquetadas, submersas em solução de formalina a 10% por 24h e transferidas para álcool 70% para serem preservadas e posteriormente analisadas.

As gônadas seguiram a rotina de desidratação, diafanização, inclusão em parafina, microtomia e coloração. Foi utilizada hematoxilina e tricrômico de Gomori para melhor diferenciação dos componentes gonadais e, portanto, facilitar a identificação dos estágios de maturação das células sexuais. O protocolo de rotina histológica foi adaptado de Tolosa *et al.* (2003) e pode ser observado no Quadro 2.

Figura 13 – Sequência de incisões e remoção das vísceras para acesso às gônadas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta aos hormônios 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2). A: peixe intacto. B: incisão na região posterior. C: incisões nas regiões ventral e anterior. D: remoção da musculatura e das vísceras.



Fonte: Autor (2020)

Quadro 2 – Protocolo completo para a preparação das secções histológicas para visualização sob microscópio óptico de gônadas de juvenis tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Fase	Descrição	Tempo
Desidratação	Imersão em álcool 80%	30 min
	Imersão em álcool 90%	30 min
	Imersão em álcool 100%	30 min
Diafanização	Imersão em solução álcool:xilol (1:1)	30 min
	Imersão em xilol (Solução I)	30 min
	Imersão em xilol (Solução II)	30 min
Inclusão em parafina líquida	Imersão em parafina (Solução I)	30 min
	Imersão em parafina (Solução II)	30 min
Emblocamento	Emblocamento em parafina	-
Microtomia	Secções histológicas de 5 μ m	-
Desparafinização	Imersão em xilol (Solução I)	3 min
	Imersão em xilol (Solução II)	3 min
	Imersão em solução álcool:xilol (1:1)	2 min
Hidratação	Imersão em álcool 100%	2 min
	Imersão em álcool 95%	2 min
	Imersão em álcool 70%	2 min
	Lavar em água destilada	-
Coloração	Imersão em hematoxilina	6 min
	Lavar em água destilada	-
	Imersão em tricrômico de Gomori	18 min
	Lavar em água destilada	-
Desidratação	Imersão em álcool 70%	20 s
	Imersão em álcool 95%	20 s
	Imersão em álcool 100%	20 s
Diafanização	Imersão em xilol (Solução I)	20 s
	Imersão em xilol (Solução II)	20 s
Montagem	Montagem da lâmina	-

Fonte: Autor (2020).

3.4. Experimento 01 – Avaliação dos efeitos do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo nas concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹

3.4.1. Delineamento experimental

Neste experimento foram avaliados sete tratamentos com três repetições, totalizando 21 unidades experimentais. Em cada aquário foram estocadas 10 larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) recém-eclodidas provenientes de uma mesma desova.

Os hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. Foram avaliados o controle (tratamento 01.C) e o efeito dos hormônios em três diferentes concentrações, 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹, assim denominados: tratamentos 01.E2-250; 01.E2-500; 01.E2-1.000; 01.EE2-250; 01.EE2-500 e 01.EE2-1.000.

Uma solução estoque de concentração de 20 mg L⁻¹ foi preparada pela diluição de 10 mg de cada hormônio em 500 mL de álcool etílico PA (solvente). Estas soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas em refrigerador a 3-4 °C. Os aquários experimentais de 40 L foram dosados com 0,5 mL; 1,0 mL e 2,0 mL da solução estoque, a fim de obter as concentrações experimentais de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹, respectivamente. Com o objetivo de assegurar que todos os tratamentos recebessem volumes iguais do solvente, foram adicionados 2,0 mL; 1,5 mL e 1,0 mL de álcool ao controle e aos tratamentos cujas concentrações foram de 250 ng L⁻¹ e 500 ng L⁻¹, respectivamente (FIGURA 14)

Figura 14 – Representação esquemática do delineamento experimental do Experimento 01

	Aquário 40 L 3x						
Tratamento	01.C	01.E2-250	01.E2-500	01.E2-1.000	01.EE2-250	01.EE2-500	01.EE2-1.000
Larvas/Aq	10	10	10	10	10	10	10
SE (mL)	0,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
AL (mL)	2,0	1,5	1,0	0,0	1,5	1,0	0,0
TOTAL (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Fonte: Autor (2020)

Larvas/Aq: número de larvas por aquário; SE: solução estoque; AL: álcool.

A exposição dos indivíduos às dosagens hormonais ocorreu durante os primeiros 28 dias de vida (4 semanas).

Após os 28 dias de exposição hormonal os peixes foram mantidos nos aquários por mais 60 dias, de modo que o peso médio dos indivíduos de todos os tratamentos atingisse pelo menos 10 g, totalizando 88 dias.

Foram realizadas duas biometrias de todo o lote, sendo a primeira 40 dias após a eclosão (DAE) e a segunda 88 DAE, aferindo-se comprimento total (cm) e peso (g), com auxílio de um paquímetro (precisão 0,002 cm) e uma balança digital (precisão 0,01 g), respectivamente.

Com os dados de peso (P) e comprimento total (CT), foi calculado o fator de condição alométrico (KA), $KA = P/CT^b$, sendo b o coeficiente de alometria obtido pela equação de regressão da relação peso-comprimento (LE CREN, 1951).

3.4.2. Análise estatística dos dados

A análise dos dados foi realizada para os parâmetros físicos e químicos da água no sistema (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, nitrito, NAT e amônia não-ionizada), para as variáveis zootécnicas (peso, comprimento e sobrevivência) e para o fator de condição alométrico. Para este fim, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), 5% de significância, considerando o efeito principal de dois grupos: hormônio e concentração hormonal. Em caso positivo, foi aplicado o teste de Tukey para a comparação das médias, utilizando a componente sistemática (1)

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

na qual: Y_{ijk} = tipo de hormônio i, concentração hormonal j e repetição k (i = 1, 2; j = 1, 2, 3; k = 1, 2, 3); μ = média populacional; α_i = efeito do tipo de hormônio i; β_j = efeito da concentração hormonal j; ε_{ijk} = erro residual.

Os valores expressos em porcentagem foram transformados em arcosseno para a aplicação do teste estatístico. Os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors para verificação da normalidade.

As análises dos dados foram realizadas usando o Programa de Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas (BioEstat, versão 5.0) a nível de significância de 5% (AYRES; AYRES JÚNIOR, 2007).

As equações da análise de regressão da relação peso-comprimento foram determinadas para cada tratamento, sendo utilizado o modelo potência do tipo, $y = Ax^b$, em que, $\ln y = a + b \ln x$ é a forma linearizada desse modelo curvilíneo, utilizando planilhas eletrônicas.

3.5. Experimento 02 – Avaliação dos efeitos do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo nas concentrações de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$

No Experimento 02 foram utilizadas 21 unidades experimentais (aquários de 40 L) para avaliação de sete tratamentos com três repetições (120 L tratamento⁻¹). Foram avaliados o controle (tratamento 02.C) e o efeito dos hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em três diferentes concentrações, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim denominados: tratamentos 02.E2-250; 02.E2-500; 02.E2-1.000; 02.EE2-250; 02.EE2-500 e 02.EE2-1.000.

3.5.1. Preparação da solução estoque e administração da dose hormonal

Para que as concentrações teóricas, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ fossem alcançadas, foram utilizados, respectivamente, 30 mg; 60 mg e 120 mg dos hormônios E2 e EE2 para cada tratamento (120 L).

Para a preparação da solução estoque, essas quantidades de hormônio (30 mg; 60 mg e 120 mg) foram diluídas em 10 mL de álcool etílico PA utilizando um erlenmeyer de 250 mL e processadas em um processador ultrassônico de 42 KHz (FIGURA 15) por 120 segundos. Em seguida, foram adicionados 200 mL de água purificada (Milli-Q) em cada erlenmeyer, totalizando 210 mL. Esta mistura foi processada em processador ultrassônico por 240 segundos.

Desta solução estoque, 70 mL foram cuidadosamente adicionados em cada unidade experimental.

Figura 15 – Processador ultrassônico (Cristófoli) utilizado para auxiliar na solubilização dos hormônios 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol em água purificada para elaboração das soluções estoque.



Fonte: Autor (2020)

Para assegurar que o controle estivesse sob as mesmas condições dos demais tratamentos, exceto pela presença do hormônio, 10 mL de álcool etílico PA foram processados no processador ultrassônico por 120 segundos em um erlenmeyer de 250 mL; 200 mL de água purificada foram adicionados e processados por 240 segundos. Desta solução, 70 mL foram adicionados a cada repetição (FIGURA 16).

Figura 16 – Representação esquemática do delineamento experimental, da preparação da solução estoque e da administração da dose hormonal do Experimento 02.

	Aquário 40 L 3x						
Tratamento	02.C	02.E2-250	02.E2-500	02.E2-1.000	02.EE2-250	02.EE2-500	02.EE2-1.000
Ovos/Aq	20	20	20	20	20	20	20
Larvas/Aq	10	10	10	10	10	10	10
Horm. (mg)	0,0	30,0	60,0	120,0	30,0	60,0	120,0
AL. (mL)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Proc. US (s)	120	120	120	120	120	120	120
MilliQ (mL)	200	200	200	200	200	200	200
Proc. US (s)	240	240	240	240	240	240	240
V/Aq (mL)	70	70	70	70	70	70	70

Fonte: Autor 2019

Ovos/Aq: números de ovos por aquário; Larvas/Aq: número de larvas por aquário; Horm.: hormônio; AL: álcool; Proc. US: processamento ultrassônico; V/Aq: volume de solução estoque para cada aquário.

3.5.2. Teste de concentração e curva de decaimento hormonal

Para o teste de concentração e para a elaboração da curva de decaimento hormonal, foram utilizados sete aquários, um referente a cada tratamento: 02.C; 02.E2-250; 02.E2-500; 02.E2-1.000; 02.EE2-250; 02.EE2-500 e 02.EE2-1.000.

Em intervalos regulares durante uma semana (TABELA 7), amostras de 500 mL de cada aquário foram retiradas para mensuração da concentração hormonal por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) conforme detalhado em seção própria.

Tabela 7 – Cronograma do Experimento 02 para coleta de amostra de água para teste de concentração e elaboração da curva de decaimento hormonal para 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol.

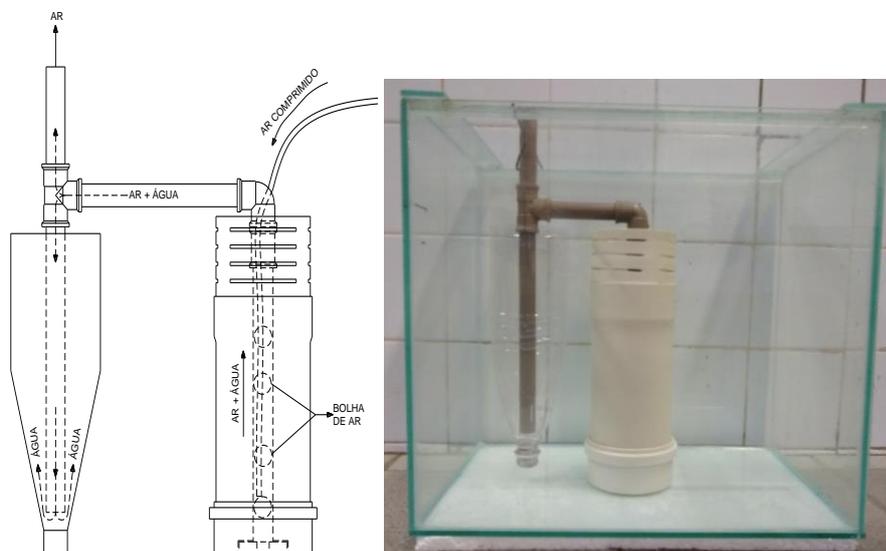
Enchimento dos aquários	Administração dos hormônios	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
15/09/2017	18/09/2017	18/09/2017	20/09/2017	22/09/2017	25/09/2017

Fonte: Autor (2020).

3.5.3. Delineamento experimental e análise dos dados

Em cada aquário foi montada uma incubadora de ovos bentônicos do tipo cilindro-cônica com fluxo ascendente de água acionada por bomba de ar (*air lift*) conforme pode ser observado na Figura 17. Em cada incubadora foram estocados 20 ovos de tilápia do Nilo.

Figura 17 – Incubadora cilindro-cônica com fluxo ascendente de água acionada por bomba de ar (*air lift*) utilizada no Experimento 02 para eclosão de ovos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estocados em diferentes concentrações hormonais de 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol.



Fonte: Autor (2020)

Dois dias após a estocagem nas incubadoras, foi feita a remoção de ovos não fecundados (não viáveis). Após a eclosão, os indivíduos ainda com saco vitelínico foram contados para o cálculo da porcentagem de eclosão em função da quantidade de ovos viáveis que permaneceram nas incubadoras. Quatro dias após a eclosão, findado o consumo das reservas vitelínicas, 10 indivíduos de cada aquário foram aleatoriamente escolhidos para permanecerem em seu respectivo aquário sob exposição hormonal por 28 dias.

A análise dos dados foi realizada para os parâmetros físicos e químicos da água no sistema (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, nitrito, NAT e amônia não ionizada). Para as variáveis zootécnicas (peso, comprimento e sobrevivência), foi aplicada estatística descritiva (média, desvio padrão, valores máximos e mínimos). Para porcentagem de eclosão, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), 5% de significância, considerando o efeito principal de dois grupos: hormônio e concentração hormonal. Em caso positivo, foi aplicado o teste de Tukey para a comparação das médias, utilizando a componente sistemática (2)

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk} \quad (2)$$

na qual: Y_{ijk} = tipo de hormônio i , concentração hormonal j e repetição k ($i = 1, 2$; $j = 1, 2, 3$; $k = 1, 2, 3$); μ = média populacional; α_i = efeito do tipo de hormônio i ; β_j = efeito da concentração hormonal j ; ε_{ijk} = erro residual.

Os valores expressos em porcentagem foram transformados em arcosseno para a aplicação do teste estatístico. Os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors para verificação da normalidade.

As análises dos dados foram realizadas usando o Programa de Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas (BioEstat, versão 5.0) a nível de significância de 5% (AYRES; AYRES JÚNIOR, 2007).

3.6. Experimento 03 – Avaliação dos efeitos do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo na concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$

No Experimento 03 foram utilizadas 16 unidades experimentais (aquários de 40 L) para a avaliação de quatro tratamentos com quatro repetições (160 L tratamento⁻¹). Foram avaliados o controle negativo (03.C-), o controle positivo (03.C+) e o efeito dos hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2), na concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$, tratamentos 03.E2-160 e 03.EE2-160.

3.6.1. Preparação da solução estoque e administração da dose hormonal

Para que a concentração desejada de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ fosse alcançada, foram utilizados 25,6 mg dos hormônios E2 e EE2 para cada tratamento hormonal (160 L).

Para a preparação das soluções estoque, 25,6 mg de cada hormônio foram diluídos em 10 mL de álcool etílico PA, utilizando um erlenmeyer de 250 mL; estas soluções foram, então, processadas em um processador ultrassônico por 120 segundos. Em seguida, foram adicionados 230 mL de água purificada (Milli-Q) em cada erlenmeyer, totalizando 240 mL. Esta mistura foi processada em processador ultrassônico por 240 segundos.

Desta solução estoque, 60 mL foram cuidadosamente adicionados em cada unidade experimental.

Para a preparação dos aquários referentes ao controle positivo (03.C+), 10 mL de álcool etílico PA foram processados no processador ultrassônico por 120 segundos em um erlenmeyer de 250 mL, 230 mL de água purificada foram adicionados e processados por 240 segundos. Desta solução, 60 mL foram adicionados a cada repetição.

A preparação das unidades experimentais referentes ao controle negativo (03.C-) se deu simplesmente pela utilização de água sem adição de qualquer substância química.

3.6.2. Teste de concentração e curva de decaimento hormonal

Para o teste de concentração e para a elaboração da curva de decaimento hormonal, foram utilizados quatro aquários, um referente a cada tratamento: 03.C-; 03.C+; 03.E2-160 e 03.EE2-160.

Em intervalos regulares durante uma semana (TABELA 8), amostras de 500 mL de cada aquário foram retiradas para mensuração da concentração hormonal por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), conforme detalhado em seção própria.

Tabela 8 – Cronograma do Experimento 03 para coleta de amostra de água para teste de concentração e elaboração da curva de decaimento hormonal para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol.

Enchimento dos aquários	Administração dos hormônios	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
29/01/2018	30/01/2018	30/01/2018	01/02/2018	03/02/2018	06/02/2018

Fonte: Autor (2020).

3.6.3. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Em cada aquário foram estocadas 12 larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) recém-eclodidas, provenientes de uma mesma desova (FIGURA 18).

Figura 18 – Representação esquemática do delineamento experimental, da preparação da solução estoque e da administração da dose hormonal do Experimento 03.

	Aquário 40 L 4x	Aquário 40 L 4x	Aquário 40 L 4x	Aquário 40 L 4x
Tratamento	03.C-	03.C+	03.E2-160	03.EE2-160
Larvas/Aq	12	12	12	12
Horm. (mg)	0,0	0,0	25,6	25,6
AL. (mL)	0,0	10,0	10,0	10,0
Proc. US (s)	-	120	120	120
MilliQ (mL)	0,0	230,0	230,0	230,0
Proc. US (s)	-	240	240	240
V/Aq (mL)	0,0	60	60	60

Fonte: Autor (2020)

Larvas/Aq: número de larvas por aquário; Horm.: hormônio; AL: álcool; Proc. US: processamento ultrassônico; V/Aq: volume de solução estoque para cada aquário.

A exposição dos indivíduos à dosagem hormonal ocorreu durante os primeiros 28 dias de vida. Após este período, os peixes foram transferidos para tanques circulares de 250 L e mantidos por mais 122 dias, totalizando 150 dias.

Ao final do período experimental, foi realizada biometria de todo o lote, aferindo-se comprimento total (cm) e peso (g), com auxílio de um paquímetro (precisão 0,002 cm) e uma balança digital (precisão 0,01 g), respectivamente.

Com os dados de peso (P) e comprimento (CT), foi calculado o fator de condição alométrico (KA), $KA = P/CT^b$, sendo b o coeficiente de alometria obtido pela equação de regressão da relação peso-comprimento (LE CREN, 1951).

A análise dos dados foi realizada para os parâmetros físicos e químicos da água no sistema (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, nitrito, NAT e amônia não ionizada), para as variáveis zootécnicas (peso, comprimento e sobrevivência) e para o fator de condição alométrico. Para este fim, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), 5% de significância, considerando o efeito do tipo de hormônio. Em caso positivo, foi aplicado o teste de Tukey para a comparação das médias, utilizando a componente sistemática (3)

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ijk} \quad (3)$$

na qual: Y_{ij} = tipo de hormônio i (i = 1,2) e repetição j (j = 1, 2, 3, 4); μ = média populacional; α_i = efeito do tipo de hormônio i; ε_{ijk} = erro residual.

Os valores expressos em porcentagem foram transformados em arcosseno para a aplicação do teste estatístico. Os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors para verificação da normalidade.

As análises dos dados foram realizadas usando o Programa de Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas (BioEstat, versão 5.0) a nível de significância de 5% (AYRES; AYRES JÚNIOR, 2007).

As equações da análise de regressão da relação peso x comprimento foram determinadas para cada tratamento, sendo utilizado o modelo potência do tipo, $y = Ax^b$, em que, $\ln y = a + b \ln x$ é a forma linearizada desse modelo curvilíneo, utilizando planilhas eletrônicas.

3.7. Experimento 04 – Avaliação dos efeitos do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol na diferenciação sexual da tilápia do Nilo na concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante intervalos de tempo variados: 1, 2, 3 e 4 semanas.

No Experimento 04 foram utilizadas oito unidades experimentais (aquários de 40 L) para a avaliação de oito tratamentos. Foi avaliada a concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) variando-se o tempo de exposição hormonal em 1, 2, 3 e 4 semanas (TABELA 9).

Tabela 9 – Hormônio, sigla, concentração hormonal [Hormônio] e tempo de exposição hormonal (TEH) utilizados para a composição da nomenclatura adotada para os tratamentos do Experimento 04.

Hormônio	Sigla	[Hormônio] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	TEH (semanas)	Nomenclatura
17 β -estradiol	E2	160	1	04.E2-160(1S)
17 β -estradiol	E2	160	2	04.E2-160(2S)
17 β -estradiol	E2	160	3	04.E2-160(3S)
17 β -estradiol	E2	160	4	04.E2-160(4S)
17 α -etinilestradiol	EE2	160	1	04.EE2-160(1S)
17 α -etinilestradiol	EE2	160	2	04.EE2-160(2S)
17 α -etinilestradiol	EE2	160	3	04.EE2-160(3S)
17 α -etinilestradiol	EE2	160	4	04.EE2-160(4S)

Fonte: Autor (2020).

A preparação da solução estoque e a administração da dose hormonal em cada unidade experimental foram feitas da forma como anteriormente explicitado na seção 4.6.1 do Experimento 03.

Em cada aquário foram estocadas 12 larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) recém-eclodidas provenientes de uma mesma desova (FIGURA 19).

Na medida em que finalizava o tempo de exposição hormonal dos tratamentos referentes a 1, 2 e 3 semanas, os peixes foram mantidos em seus respectivos aquários até que o tempo de exposição de 4 semanas dos tratamentos (4S) fosse concluído. Após a exposição de todos os tratamentos chegar ao fim, os peixes foram transferidos para tanques circulares de 250 L, onde permaneceram por mais 217 dias, totalizando 245 dias.

Figura 19 – Representação esquemática do delineamento experimental, da preparação da solução estoque e da administração da dose hormonal do Experimento 04

	Aquário 40 L 1x							
Tratamento	04.E2-160(1S)	04.E2-160(1S)	04.E2-160(1S)	04.E2-160(1S)	04.EE2-160(1S)	04.EE2-160(1S)	04.EE2-160(1S)	04.EE2-160(1S)
Larvas/Aq	12	12	12	12	12	12	12	12
Exp. (sem.)	1	2	3	4	1	2	3	4
Horm. (mg)	25,6				25,6			
AL. (mL)	10,0				10,0			
Proc. US (s)	120				120			
MilliQ (mL)	230,0				230,0			
Proc. US (s)	240				240			
V/Aq (mL)	60	60	60	60	60	60	60	60

Fonte: Autor (2020)

Larvas/Aq: número de larvas por aquário; Exp.(sem.): período de exposição hormonal em semanas; Horm.: hormônio; AL: álcool; Proc. US: processamento ultrassônico; V/Aq: volume de solução estoque para cada aquário.

Ao final do período experimental, foi realizada biometria de todo o lote, aferindo-se comprimento total (cm) e peso (g), com auxílio de um paquímetro (precisão 0,002 cm) e uma balança digital (precisão 0,01 g), respectivamente.

Com os dados de peso (P) e comprimento (CT), foi calculado o fator de condição alométrico (KA), $KA = P/CT^b$, sendo b o coeficiente de alometria obtido pela equação de regressão da relação peso-comprimento (LE CREN, 1951).

A análise dos dados foi realizada por meio de estatística descritiva para os parâmetros físicos e químicos da água no sistema (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, nitrito, NAT e amônia não ionizada), para as variáveis zootécnicas (peso, comprimento e sobrevivência) e para o fator de condição alométrico.

As análises dos dados foram realizadas por meio de planilhas eletrônicas. As equações da análise de regressão da relação peso x comprimento foram determinadas utilizando o modelo potência do tipo, $y = Ax^b$, em que, $\ln y = a + b \ln x$ é a forma linearizada desse modelo curvilíneo.

3.8. Metodologia analítica para mensuração dos hormônios

De cada unidade experimental foi retirado um volume de 500 mL, que passou pelos seguintes procedimentos: filtração a vácuo, extração em fase sólida (SPE), eluição e injeção em HPLC.

Inicialmente, as amostras (500 mL) foram filtradas através de filtro de fibra de vidro com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 μm . Para este fim, foi utilizada uma bomba a vácuo (MFS, VP-24). O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de fundo chato para o início da próxima etapa.

Para a extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) foram utilizados cartuchos de estireno-divilbenzeno modificado com butirolactona (Strata-X™). Os cartuchos foram acoplados a um processador manual Vacuum Manifold (*Applied Separations, Speed Mate 12*) conectado a uma bomba a vácuo.

Inicialmente os cartuchos foram condicionados com 10 mL de metanol. Em seguida, os hormônios foram extraídos do filtrado por meio dos cartuchos com uma vazão mantida entre 1,5 e 2,0 mL min^{-1} .

O volume de metanol grau HPLC utilizado para a eluição variou de acordo com a concentração avaliada e foi de 4 mL para as concentrações experimentais de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; de 8 mL para a concentração experimental de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; e 12 mL para a concentração experimental de 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A identificação e a quantificação dos compostos presentes no eluato foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido Shimadzu^a (20A *Prominence*) (FIGURA 20).

Figura 20 – Equipamento utilizado para identificação e quantificação dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em diferentes concentrações.



Fonte: Autor (2020).

O equipamento apresentado conta com detector por UV-VIS (SPD-20A; 215 nm), duas bombas (LC-20AT), forno (CTA-20A), desgaseificador (DGA-20A3),

coluna Shimadzu C18 (15 cm x 4,6 mm D.I., 0,4 μm), com eluição por gradiente acetonitrila/HCl 0,1% aumento de 15 até 80% de acetonitrila em 10 minutos, retornando a 15% em 4 minutos. A vazão inicial foi de 1,0 mL min^{-1} e após 5 minutos de corrida foi aumentada para 2,0 mL min^{-1} . A temperatura do forno foi mantida em 35 °C e o volume de injeção de 20 μL (BUARQUE, 2017).

3.9. Análise microbiológica do ambiente experimental

Durante o desenvolvimento do Experimento 02 foram realizadas coletas de amostras da água e do biofilme que se desenvolveu nas paredes dos aquários, mangueiras de aeração, pedras prosas e demais acessórios utilizados.

A amostra de água do sistema experimental foi coletada com uso de garrafa âmbar esterilizada. Amostras do biofilme foram retiradas das tubulações usando *swab* embebido em solução salina 0,85% de NaCl e placas de Petri esterilizados.

As amostras foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado onde foram diluídas seriadamente até 10^{-5} usando solução salina a 0,85% de NaCl como diluente. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em meio de cultura não seletivo Agar Plate Count (Agar PCA) pela técnica de *Pourplate* e incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 35°C. A quantificação de bactérias nas amostras foi feita pela técnica de Contagem Padrão em Placas de acordo com metodologia descrita por Downes e Ito (2001). As contagens nas placas foram expressas por unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

De cada amostra foram selecionadas e isoladas 5 colônias bacterianas, repicadas em Ágar Triptona de Soja (Agar TSA), inoculadas em estufa a 35°C por 24 horas e submetidas a procedimentos de purificação do meio de cultura triptona soja agar (TSA) e posteriormente incubadas a 35°C por 24h. A técnica de coloração de Gram foi utilizada para observação das características estruturais e morfológicas da parede celular da bactéria (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As colônias bacterianas isoladas foram identificadas seguindo provas bioquímicas para argumentos. As provas realizadas foram: oxidase, catalase, citrato, indol, Voges Proskauer (VP), ágar triplo açúcar ferro (Agar TSI), ágar cetrimide, ágar bile esculina, caldo voges proskauer (VP) e uréase (STALEY *et al.*, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros de qualidade de água

Conforme pode ser observado na Tabela 10, na água de criação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 01, o oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH, o nitrito, o nitrogênio amoniacal total e a amônia não-ionizada apresentaram valores médios, respectivamente, entre $7,37 \pm 0,42$ mg L⁻¹ e $6,97 \pm 0,35$ mg L⁻¹ (tratamentos 01.E2-500 e 01.EE2-250); $26,24 \pm 0,76$ °C e $25,93 \pm 0,81$ °C (tratamentos 01.EE2-250 e 01.E2-250); $7,49 \pm 0,25$ e $7,61 \pm 0,11$ (tratamentos 01.EE2-500 e 01.E2-1.000); $0,35 \pm 0,18$ mg L⁻¹ e $0,44 \pm 0,48$ mg L⁻¹ (tratamentos 01.E2-1.000 e 01.E2-500); $0,92 \pm 0,66$ mg L⁻¹ e $0,54 \pm 0,51$ mg L⁻¹ (tratamentos 01.EE2-250 e 01.EE2-500) e $0,010 \pm 0,002$ mg L⁻¹ e $0,025 \pm 0,004$ mg L⁻¹ (tratamentos 01.EE2-500 e 01.E2-1.000).

Tabela 10 – Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de criação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.

Tratamento	OD (mg L ⁻¹)	Temp. (°C)	pH	NO_2^- (mg L ⁻¹)	NAT (mg L ⁻¹)	NH_3 (mg L ⁻¹)
01.C	6,98±0,43	26,13±0,67	7,52±0,22	0,39±0,25	0,58±0,49	0,012±0,002
01.E2-250	7,26±0,44	25,93±0,81	7,50±0,14	0,42±0,38	0,75±0,69	0,014±0,002
01.E2-500	7,37±0,42	26,03±0,89	7,58±0,08	0,44±0,48	0,75±0,76	0,019±0,003
01.E2-1.000	7,04±0,38	26,09±0,61	7,61±0,11	0,35±0,18	0,90±0,74	0,025±0,004
01.EE2-250	6,97±0,35	26,24±0,76	7,60±0,21	0,38±0,42	0,92±0,66	0,025±0,003
01.EE2-500	7,04±0,40	26,08±0,68	7,49±0,25	0,41±0,37	0,54±0,51	0,010±0,002
01.EE2-1.000	7,08±0,42	25,96±0,71	7,53±0,07	0,40±0,32	0,83±0,68	0,017±0,004

01.C: Controle;

01.E2-250: 17β-estradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.E2-500: 17β-estradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.E2-1.000: 17β-estradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹;

01.EE2-250: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.EE2-500: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.EE2-1.000: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

Fonte: Autor (2020).

Os parâmetros de qualidade da água avaliados durante o Experimento 02 também apresentaram pouca variação entre os tratamentos, não sendo observada diferença significativa ($p > 0,05$), conforme pode ser observado na Tabela 11. O oxigênio dissolvido apresentou maior média no tratamento 02.C ($6,84 \pm 1,03$ mg L⁻¹) e menor média no tratamento 02.EE2-250 ($6,58 \pm 1,17$ mg L⁻¹). A temperatura apresentou valores médios que variaram entre $27,19 \pm 1,22$ °C para o tratamento

02.EE2-500 e $27,55 \pm 1,23^\circ\text{C}$ para o tratamento 02.C. O pH, por sua vez, apresentou valores médios de $7,52 \pm 0,53$ (tratamento 02.E2-1.000) a $7,58 \pm 0,52$ (tratamento 02.EE2-250).

Os compostos nitrogenados, nitrito, nitrogênio amoniacal total e amônia não-ionizada, apresentaram médias, respectivamente, variando de $0,15 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$ (02.C) a $0,38 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$ (02.EE2-250); de $0,22 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$ (02.EE2-1.000) a $0,35 \pm 0,24 \text{ mg L}^{-1}$ (02.EE2-250) e de $0,005 \pm 0,001 \text{ mg L}^{-1}$ (02.EE2-1.000) a $0,008 \pm 0,005$ (02.EE-500).

Tabela 11 – Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 02. Exposição às concentrações de $250 \mu\text{g L}^{-1}$; $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.

Tratamento	OD (mg L^{-1})	Temp. ($^\circ\text{C}$)	pH	NO_2^- (mg L^{-1})	NAT (mg L^{-1})	NH_3 (mg L^{-1})
02.C	$6,84 \pm 1,03$	$27,55 \pm 1,23$	$7,56 \pm 0,54$	$0,15 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,17$	$0,006 \pm 0,002$
02.E2-250	$6,72 \pm 1,11$	$27,43 \pm 1,17$	$7,55 \pm 0,53$	$0,28 \pm 0,30$	$0,27 \pm 0,15$	$0,007 \pm 0,003$
02.E2-500	$6,76 \pm 1,09$	$27,37 \pm 1,15$	$7,57 \pm 0,57$	$0,31 \pm 0,25$	$0,32 \pm 0,20$	$0,008 \pm 0,003$
02.E2-1.000	$6,69 \pm 1,10$	$27,41 \pm 1,11$	$7,52 \pm 0,56$	$0,22 \pm 0,19$	$0,26 \pm 0,18$	$0,006 \pm 0,001$
02.EE2-250	$6,58 \pm 1,17$	$27,22 \pm 1,16$	$7,58 \pm 0,52$	$0,38 \pm 0,23$	$0,35 \pm 0,24$	$0,009 \pm 0,004$
02.EE2-500	$6,64 \pm 1,18$	$27,19 \pm 1,22$	$7,54 \pm 0,59$	$0,19 \pm 0,22$	$0,33 \pm 0,19$	$0,008 \pm 0,005$
02.EE2-1.000	$6,73 \pm 1,21$	$27,24 \pm 1,19$	$7,53 \pm 0,51$	$0,37 \pm 0,28$	$0,22 \pm 0,21$	$0,005 \pm 0,001$

02.C: Controle;

02.E2-250: 17β -estradiol, concentração hormonal $250 \mu\text{g L}^{-1}$;

02.E2-500: 17β -estradiol, concentração hormonal $500 \mu\text{g L}^{-1}$;

02.E2-1.000: 17β -estradiol, concentração hormonal $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$;

02.EE2-250: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $250 \mu\text{g L}^{-1}$;

02.EE2-500: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $500 \mu\text{g L}^{-1}$;

02.EE2-1.000: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autor (2020).

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para os parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos do Experimento 03. Os valores médios da concentração de oxigênio dissolvido variaram de $6,37 \pm 1,20 \text{ mg L}^{-1}$ no tratamento 03.E2-160 a $6,75 \pm 1,07 \text{ mg L}^{-1}$ no tratamento 03.C-. A temperatura apresentou valores médios entre $27,21 \pm 1,10^\circ\text{C}$ (03.C+) e $27,43 \pm 1,27^\circ\text{C}$ (03.EE2-160). O pH apresentou maior média no tratamento 03.E2-160, com valor de $7,58 \pm 0,50$, e menor no tratamento 03.C+, com valor de $7,55 \pm 0,55$ (TABELA 12).

O tratamento 03.C- apresentou maiores valores médios de NAT ($0,32 \pm 0,14 \text{ mg L}^{-1}$) e amônia não-ionizada ($0,008 \pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$) e menor valor médio para a concentração de nitrito ($0,23 \pm 0,14 \text{ mg L}^{-1}$). As menores médias de NAT e amônia não-ionizada foram observadas para os tratamentos 03.C+ ($0,24 \pm 0,20 \text{ mg L}^{-1}$) e 03.EE2-

160 (0,006±0,003 mg L⁻¹), respectivamente. A maior média observada para o nitrito foi no tratamento 03.E2-160 (0,42±0,48 mg L⁻¹).

Tabela 12 – Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 03. Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.

Tratamento	OD (mg L ⁻¹)	Temp. (°C)	pH	NO_2^- (mg L ⁻¹)	NAT (mg L ⁻¹)	NH_3 (mg L ⁻¹)
03.C-	6,75±1,07	27,23±1,18	7,56±0,56	0,23±0,14	0,32±0,14	0,008±0,005
03.C+	6,43±1,08	27,21±1,10	7,55±0,55	0,36±0,37	0,24±0,20	0,006±0,004
03.E2-160	6,37±1,20	27,39±1,24	7,58±0,50	0,42±0,48	0,26±0,23	0,007±0,005
03.EE2-160	6,40±1,22	27,43±1,27	7,56±0,50	0,40±0,52	0,25±0,24	0,006±0,003

03.C-: Controle negativo;

03.C+: Controle positivo;

03.E2-160: 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹;

03.EE2-160: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹.

Fonte: Autor (2020).

Da mesma forma como observado nos experimentos anteriores, foi constatada pequena variação nos parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos avaliados no Experimento 04 (TABELA 13).

Tabela 13 – Oxigênio dissolvido (OD), temperatura (Temp.), potencial hidrogeniônico (pH), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal total (NAT) e amônia não-ionizada (NH_3) da água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 04. Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.

Tratamento	OD (mg L ⁻¹)	Temp. (°C)	pH	NO_2^- (mg L ⁻¹)	NAT (mg L ⁻¹)	NH_3 (mg L ⁻¹)
04.E2-160(1S)	6,34±1,15	27,32±1,18	7,60±0,57	0,14±0,11	0,28±0,13	0,008±0,004
04.E2-160(2S)	6,64±1,12	27,43±1,24	7,56±0,52	0,23±0,15	0,25±0,20	0,006±0,002
04.E2-160(3S)	6,61±1,28	27,36±1,32	7,51±0,59	0,19±0,22	0,26±0,19	0,006±0,003
04.E2-160(4S)	6,58±1,17	27,41±1,28	7,55±0,53	0,21±0,20	0,29±0,18	0,007±0,004
04.EE2-160(1S)	6,53±1,09	27,37±1,09	7,57±0,55	0,27±0,18	0,31±0,21	0,008±0,005
04.EE2-160(2S)	6,27±1,18	27,33±1,25	7,58±0,62	0,17±0,13	0,27±0,20	0,007±0,003
04.EE2-160(3S)	6,38±1,15	27,35±1,19	7,54±0,60	0,20±0,24	0,25±0,17	0,006±0,004
04.EE2-160(4S)	6,60±1,11	27,42±1,34	7,53±0,52	0,15±0,12	0,32±0,21	0,007±0,003

04.E2-160(1S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 1 semana de exposição;

04.E2-160(2S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 2 semanas de exposição;

04.E2-160(3S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 3 semanas de exposição;

04.E2-160(4S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 4 semanas de exposição;

04.EE2-160(1S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 1 semana de exposição;

04.EE2-160(2S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 2 semanas de exposição;

04.EE2-160(3S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 3 semanas de exposição;

04.EE2-160(4S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 4 semanas de exposição.

Fonte: Autor (2020).

A média da concentração de oxigênio dissolvido apresentou valores variando entre 6,27±1,18 mg L⁻¹ para o tratamento 04.EE2-160(2S) e 6,64±1,12 mg L⁻¹ para o tratamento 04.E2-160(2S). Para a temperatura, os valores médios ficaram compreendidos entre 27,32±1,18°C (04.E2-160(1S)) e 27,43±1,24°C (04.E2-160(2S)).

A maior média para os valores de pH foi de $7,60 \pm 0,57$ para o tratamento 04.E2-160(1S) e a menor foi de $7,51 \pm 0,59$ para o tratamento 04.E2-160(3S).

O tratamento 04.EE2-160(1S) apresentou os maiores valores médios para as concentrações de nitrito ($0,27 \pm 0,18 \text{ mg L}^{-1}$) e amônia não-ionizada ($0,008 \pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$). A maior média de NAT foi observada no tratamento 04.EE2-160(4S), com valor de $0,32 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$. Por outro lado, as menores médias para as concentrações de nitrito, NAT e amônia não-ionizada foram constatados, respectivamente, nos tratamentos 04.E2-160(1S) ($0,14 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$), 04.EE2-160(3S) ($0,25 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$) e 04.E2-160(3S) ($0,006 \pm 0,003 \text{ mg L}^{-1}$).

O oxigênio dissolvido (OD) é considerado por muitos autores (ARANA, 2004; KUBITZA, 2011; SÁ, 2012; TIMMONS; EBELING; PIEDRAHITA, 2009) como o principal parâmetro de qualidade de água a ser observado para a manutenção de organismos aquáticos em cativeiro. Segundo Sá (2012), a concentração mínima de oxigênio dissolvido na água para que a tilápia do Nilo expresse todo seu potencial zootécnico é de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Os valores médios da concentração de oxigênio dissolvido observados ao longo dos quatro experimentos desenvolvidos na presente pesquisa encontraram-se dentro da faixa considerada ótima para a tilápia do Nilo. A maior média observada foi no Experimento 01 (tratamento 01.E2-500) com valor de $7,37 \pm 0,42 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que menor foi de $6,27 \pm 1,18 \text{ mg L}^{-1}$ no Experimento 04 (tratamento 04.EE2-160(2S)).

Segundo Arana (2004), os animais aquáticos podem apresentar, frente à concentração de oxigênio dissolvido na água, 4 situações a saber: 1) independência de oxigênio, o animal tem oxigênio suficiente para realizar satisfatoriamente todas suas atividades metabólicas; 2) dependência alimentar de oxigênio, o animal não dispõe de oxigênio suficiente para metabolizar os alimentos ingeridos; 3) dependência fisiológica de oxigênio, o animal fica submetido a uma condição crônica de falta de oxigênio, fica estressado e adoece facilmente; 4) mortalidade, o animal morre por falta de oxigênio, hipóxia.

A faixa de pH ótima para a criação de tilápia do Nilo está compreendida entre 6,0 e 9,0 (ARANA, 2004). A atividade catalítica das enzimas biológicas no interior das células é influenciada pelo pH que, para peixes de maneira geral, deve manter valores próximos de 7,4. Os fluidos corporais dos peixes possuem um eficiente sistema de tampão que estabiliza o pH dentro de uma faixa ideal desde que o pH da água não seja muito ácido, menor que 6,0, nem muito básico, maior que 9,0 (SÁ,

2012). Em todos os experimentos realizados, o pH manteve-se com valor médio próximo de 7,5.

O valor máximo recomendado para as concentrações de nitrito, segundo Kubitzka (2011), é de 0,5 mg L⁻¹. Ao ser absorvido pelas brânquias dos peixes, o nitrito pode causar a oxidação do ferro presente na hemoglobina, impedindo o transporte do oxigênio para os tecidos. Nesta situação, a hemoglobina adquire uma coloração levemente marrom, condição conhecida como “Doença do Sangue Marrom” (SÁ, 2012).

O nitrogênio amoniacal total (NAT) se encontra na água sob duas formas: uma chamada amônia não-ionizada, forma mais tóxica (NH₃), e a outra chamada de amônia ionizada (NH₄⁺). Estas duas formas se encontram em equilíbrio químico na água, que depende fortemente do pH e em menor grau da temperatura. Para valores de pH maiores do que 7,0, o equilíbrio químico (NH₃/NH₄⁺) tende a se deslocar no sentido de formação de amônia não-ionizada; por outro lado, água com pH menor que 7 desloca o equilíbrio no sentido de formação de amônia ionizada (TIMMONS; EBELING; PIEDRAHITA, 2009).

A amônia é excretada pelos peixes de forma passiva por meio das brânquias. Concentrações de amônia não-ionizada na água acima de 0,1 mg L⁻¹ invertem a rota de excreção, fazendo com que sua concentração sanguínea aumente. O acúmulo de amônia nos tecidos leva a uma disfunção generalizada do metabolismo oxidativo celular, principalmente dos neurônios. A disfunção neurológica pela intoxicação de amônia leva à ocorrência de hiperatividade e convulsão (SÁ, 2012).

Para todos os experimentos realizados ao longo desta pesquisa, é possível observar, por meio dos valores apresentados nas Tabelas 10, 11, 12 e 13, que os parâmetros de qualidade de água apresentaram-se sempre dentro da faixa de conforto da tilápia do Nilo. Desta forma, pode-se inferir que quaisquer prejuízos ocasionados ao desenvolvimento dos indivíduos foram decorrentes dos compostos químicos avaliados.

Para que a qualidade da água fosse mantida adequada dentro de um espaço bastante limitado (aquários de 40 L) durante o período de exposição hormonal, e com o objetivo de manter as concentrações hormonais sempre próximas daquelas desejadas, foi necessário realizar semanalmente troca de 100% da água dos aquários. A água drenada dos aquários foi tratada com radiação ultravioleta (UV) antes do descarte final.

De acordo com Aquino, Brandt e Chernicharo (2013), Lima *et al.* (2017) e Sornalingam, McDonagh e Zhou (2016), processos oxidativos avançados (POA), como radiação ultravioleta, podem ser utilizados para o tratamento da água contendo desreguladores endócrinos, como o E2 e EE2, por um processo chamado fotólise. A fotólise, também denominada de fotodegradação ou fotodecomposição, é a dissociação de moléculas orgânicas complexas por efeito da radiação eletromagnética (BRIKET; LESTER, 2003) proveniente de uma fonte natural, como o sol, ou uma fonte artificial, como uma lâmpada ultravioleta. Este fenômeno pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre quando a molécula de interesse possui uma ligação química que é clivada devido à excitação causada por uma fonte de radiação eletromagnética (GURR; REINHARD, 2006). Na fotólise indireta, por outro lado, a radiação excita outras moléculas presentes no meio que, após clivadas, geram radicais livres que atacam os compostos de interesse (GURR; REINHARD, 2006).

Apesar de ser uma forma eficiente de inativar vários tipos de compostos, esta tecnologia apresenta importância irrelevante para remoção de poluentes em estações de tratamento de esgoto, devido a turbidez característica dos efluentes e devido ao grande volume (BRIKET; LESTER, 2003; VIRKUTYTE; ROKHINA; JEGATHEESAN 2010).

Na presente pesquisa, entretanto, a fotodegradação por meio de emissão de radiação ultravioleta foi a técnica utilizada para a inativação do E2 e do EE2 antes do descarte final, pois a água de criação das tilápias do Nilo apresentava-se incolor e com baixa concentração de sólidos suspensos, devido às constantes renovações. Além disto, o volume a ser tratado foi pequeno e havia tempo suficiente para que todo este volume circulasse pelo UV diversas vezes.

4.2. Teste de concentração e curva de decaimento hormonal

Nos Experimentos 02 e 03, foi possível analisar o comportamento das concentrações hormonais experimentais durante sete dias, antes da adição dos peixes. Em ambos os experimentos foi possível observar que houve uma diminuição da concentração hormonal ao final deste período, porém de modo que a concentração residual fosse ainda representativa. Devido ao fato de que os hormônios foram repostos a cada sete dias, é possível afirmar que durante o período total de 28 dias

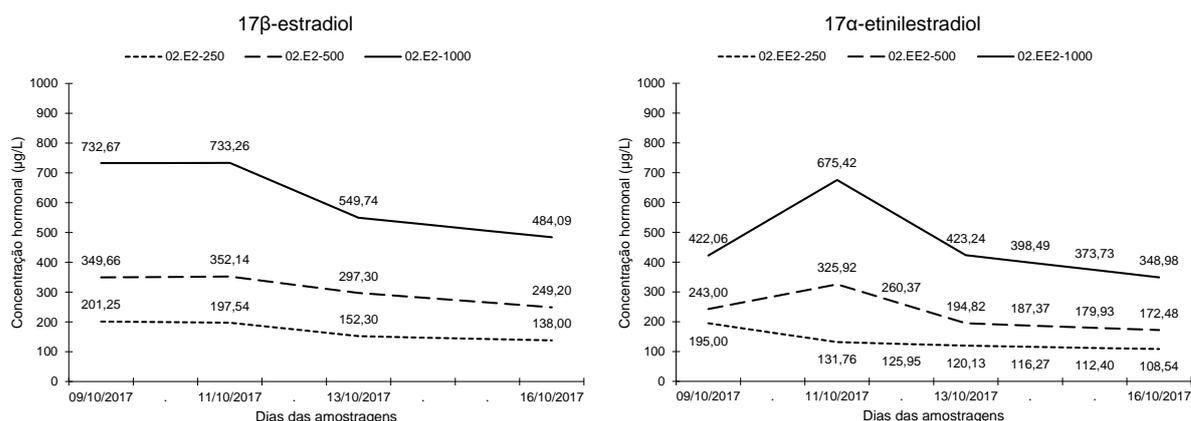
de exposição hormonal, os indivíduos estiveram sob ação dos compostos de interesse.

No Experimento 02, o hormônio 17β -estradiol (E2) apresentou concentrações determinadas nas amostras mais próximas das concentrações teóricas do analito quando comparado ao 17α -etinilestradiol (EE2) para as três concentrações de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$.

Nos tratamentos com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ com E2 foi possível observar que as concentrações aferidas na primeira e na segunda amostragem mantiveram-se praticamente constantes. Para os tratamentos de mesma concentração com EE2, entretanto, observou-se um aumento nas concentrações da primeira para a segunda amostragem e tendência de diminuição a partir desta. Já para os tratamentos com $250 \mu\text{g L}^{-1}$, para ambos os hormônios, a concentração apresentou tendência de diminuição de seus valores desde a primeira amostragem até a última (FIGURA 21).

Para o E2, as concentrações hormonais determinadas nas amostras representaram, em seus valores máximos, 80,5% ($201,25 \mu\text{g L}^{-1}$), 70,43% ($352,14 \mu\text{g L}^{-1}$) e 73,33% ($733,26 \mu\text{g L}^{-1}$) das concentrações teóricas do analito, respectivamente, para os tratamentos 02.E2-250, 02.E2-500 e 02.E2-1.000.

Figura 21 – Curva de decaimento da concentração hormonal no Experimento 02 para 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol a partir das concentrações planejadas de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 1 semana.



02.E2-250: 17β -estradiol, concentração hormonal $250 \mu\text{g L}^{-1}$;
 02.E2-500: 17β -estradiol, concentração hormonal $500 \mu\text{g L}^{-1}$;
 02.E2-1.000: 17β -estradiol, concentração hormonal $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$.
 02.EE2-250: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $250 \mu\text{g L}^{-1}$;
 02.EE2-500: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $500 \mu\text{g L}^{-1}$;
 02.EE2-1.000: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$.
 Fonte: Autor (2020).

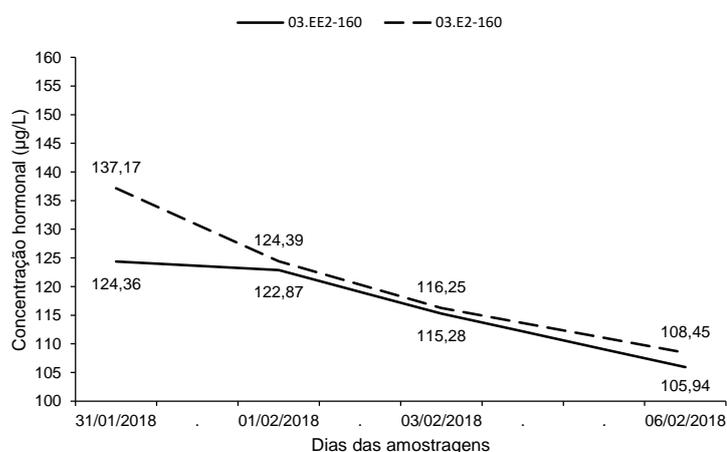
Nos tratamentos com EE2 as concentrações determinadas nas amostras foram ligeiramente menores do que aqueles encontrando para o E2 e representaram 78,00% ($195,00 \mu\text{g L}^{-1}$), 65,18% ($325,92 \mu\text{g L}^{-1}$) e 67,54% ($675,42 \mu\text{g L}^{-1}$) das concentrações teóricas do analito para os tratamentos 02.EE2-250, 02.EE2-500 e 02.EE2-1.000, respectivamente.

Além de apresentar maior solubilidade em água, o E2 também apresentou maior estabilidade. As concentrações deste hormônio decaíram para 68,57% ($138,00 \mu\text{g L}^{-1}$), 70,77% ($249,20 \mu\text{g L}^{-1}$) e 66,02% ($484,09 \mu\text{g L}^{-1}$) da dosagem máxima alcançada para as concentrações de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Por outro lado, as concentrações de EE2 decaíram para 55,66% ($108,54 \mu\text{g L}^{-1}$), 52,92% ($172,48 \mu\text{g L}^{-1}$) e 51,67% ($348,98 \mu\text{g L}^{-1}$) das concentrações máximas aferidas.

Assim como o observado anteriormente, no Experimento 03, o E2 apresentou solubilidade maior que o EE2. Durante o período de amostragem, as concentrações hormonais apresentaram decaimento a partir da concentração inicial (FIGURA 22).

Foi possível alcançar 85,73% ($137,17 \mu\text{g L}^{-1}$) da concentração teórica do analito para o E2 e 77,72% ($124,36 \mu\text{g L}^{-1}$) para o EE2. Ao final do período de amostragem as concentrações decaíram, respectivamente, para 67,78% e 66,21% da concentração teórica.

Figura 22 – Curva de decaimento da concentração hormonal no Experimento 03 para 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol a partir da concentração inicial de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 1 semana.



03.E2-160: 17β -estradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$;
 03.EE2-160: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$.
 Fonte: Autor (2020).

Para a concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$, o EE2 apresentou maior estabilidade na água do que o E2. Ao final do período de amostragem, a concentração de EE2 decaiu para 85,19% ($105,94 \mu\text{g L}^{-1}$) da concentração inicial determinada na amostra, enquanto que o E2 reduziu para 79,06% ($108,45 \mu\text{g L}^{-1}$) da concentração inicial.

As concentrações determinadas nas amostras do Experimento 02 para o E2 variaram de 70,43% (02.E2-500) a 80,5% (02.E2-250) da concentração teórica do analito e para o EE2 de 65,18% (02.EE2-500) a 78,0% (02.EE2-250), enquanto que no Experimento 03 as concentrações determinadas foram de 85,73% (03.E2-160) para o E2 e de 77,72% (03.EE2-160) para o EE2. Embora nenhuma das concentrações determinadas nas amostras tenha ficado consideravelmente acima de 80% das concentrações teóricas dos analitos, os valores obtidos estão coerentes com dados apresentados por Vidal (2015). Esta pesquisadora, utilizando cartuchos Strata-X para extração em fase sólida (mesmos cartuchos utilizados na presente pesquisa), encontrou valores de recuperação para E2 da ordem de 15,93% (para uma concentração teórica do analito de $100 \mu\text{g L}^{-1}$) e 69,6% (para $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que para o EE2 os valores foram de 50,77% (para $100 \mu\text{g L}^{-1}$) e 65,4% (para $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$).

Os resultados de solubilidade apresentados nas Figuras 20 e 21, estão de acordo com os dados apresentados por Lintelmann *et al.* (2003), que relatam maior solubilidade para o E2 quando comparado ao EE2. Segundo estes autores, os valores de solubilidade a 25°C para E2 e EE2 são de 12.960 e $483 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Esta maior insolubilidade do EE2 pode explicar o maior tempo demandado para que este composto atingisse suas concentrações máximas de $325,92$ e $675,42 \mu\text{g L}^{-1}$ (FIGURA 20) somente na segunda amostragem para os tratamentos 02.EE2-500 e 02.EE2-1.000, respectivamente.

4.3. Parâmetros de desempenho zootécnico da tilápia do Nilo

Na Tabela 14 estão apresentados os dados zootécnicos referentes à primeira biometria da tilápia do Nilo no Experimento 01. Conforme pode ser observado, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o peso dos indivíduos. Contudo, os demais parâmetros de desempenho zootécnico demonstram que os grupos hormônio e concentração hormonal atuaram de maneira distinta. Comprimento

total e fator de condição foram influenciados pela concentração hormonal, enquanto que a sobrevivência foi influenciada pelo fator hormônio.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para o comprimento total apenas entre os tratamentos 01.E2-250 ($5,88 \pm 1,56$ cm) e 01.EE2-500 ($7,07 \pm 1,90$ cm).

Os valores do fator de condição apresentaram comportamento decrescente com o aumento da concentração hormonal para ambos os hormônios, sendo observada diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os casos, com exceção do tratamento 01.EE2-500 quando comparado ao 01.C e ao tratamento 01.E2-1.000.

Tabela 14 – Parâmetros zootécnicos da primeira biometria de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média \pm desvio padrão. Valores com diferentes letras minúsculas e maiúsculas sobre-escritas na mesma coluna apresentam diferença significativa para os critérios concentração hormonal e hormônio, respectivamente ($p < 0,05$)

Tratamento	P (g)	CT (cm)	KA	S (%)
01.C ¹	5,59 \pm 3,93	6,60 \pm 1,50 ^{ab}	1,06 \pm 0,08 ^a	80,00 \pm 10,00
01.E2-250 ¹	4,47 \pm 4,10	5,88 \pm 1,56 ^a	1,62 \pm 0,15 ^c	80,00 \pm 0,00
01.E2-500 ¹	4,79 \pm 3,18	6,23 \pm 1,29 ^{ab}	1,41 \pm 0,13 ^b	73,33 \pm 5,77
01.E2-1.000 ¹	5,48 \pm 3,97	6,51 \pm 1,37 ^{ab}	0,85 \pm 0,08 ^e	73,33 \pm 11,55
01.EE2-250 ¹	5,64 \pm 6,64	6,10 \pm 1,70 ^{ab}	1,24 \pm 0,19 ^f	66,67 \pm 15,28
01.EE2-500 ¹	7,82 \pm 7,64	7,07 \pm 1,90 ^b	0,96 \pm 0,07 ^{ae}	66,67 \pm 11,55
01.EE2-1.000 ¹	6,35 \pm 4,61	6,66 \pm 1,76 ^{ab}	0,49 \pm 0,12 ^d	60,00 \pm 0,00
Concentração(F;p)	1,6780; 0,1987	3,1573; 0,0356	129,2885; <0,0001	1,7091; 0,1911
01.C ²	5,59 \pm 3,93	6,60 \pm 1,50	1,06 \pm 0,08	80,00 \pm 10,00 ^A
01.E2 ²	4,90 \pm 3,75	6,19 \pm 1,42	1,30 \pm 0,35	75,56 \pm 7,26 ^{AB}
01.EE2 ²	6,57 \pm 6,36	6,59 \pm 1,80	1,11 \pm 1,05	64,44 \pm 10,14 ^B
Hormônio (F;p)	2,4135; 0,1165	1,5145; 0,2458	3,4754; 0,0518	4,6972; 0,0223

¹ Critério concentração hormonal;

² Critério hormônio;

01.C: Controle;

01.E2-250: 17 β -estradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.E2-500: 17 β -estradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.E2-1.000: 17 β -estradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹;

01.EE2-250: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.EE2-500: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.EE2-1.000: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

Fonte: Autor (2020).

Quando observado o critério hormônio (TABELA 14), não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para sobrevivência, quando comparado o tratamento 01.E2 ao 01.C e ao tratamento 01.EE2, cujos valores foram, respectivamente, 75,56 \pm 7,26%; 80,00 \pm 10,00% e 64,44 \pm 10,14%. Contudo, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a sobrevivência do 01.C e do tratamento 01.EE2.

Assim como observado na primeira biometria, os critérios hormônio e concentração hormonal atuaram de forma diferente sobre os parâmetros de

desempenho zootécnico na segunda biometria das tilápias do Experimento 01, conforme pode ser observado na Tabela 15.

Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) para o comprimento total dos indivíduos e para a sobrevivência, para nenhum dos grupos avaliados.

Entretanto, quando considerado o grupo hormônio, foi observada diferença significativa ($p<0,05$) quando comparados os pesos do tratamento 01.C ($22,56\pm 19,83$ g) aos tratamentos 01.E2 ($13,75\pm 8,04$ g) e 01.EE2 ($15,32\pm 11,76$ g).

O fator de condição alométrico, por sua vez, foi significativamente afetado pelos dois grupos avaliados. Para o grupo hormônio, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre 01.C e os tratamentos com os hormônios 01.E2 e 01.EE2, contudo, foi observada diferença estatística ($p<0,05$) quando comparados os dois tratamentos hormonais. Foi observado que para os hormônios E2 e EE2 o aumento da concentração resultou em diminuição significativa ($p<0,05$) do fator de condição, tal como observado na primeira biometria.

Tabela 15 – Parâmetros zootécnicos da segunda biometria de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L^{-1} ; 500 ng L^{-1} e 1.000 ng L^{-1} dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média \pm desvio padrão. Valores com diferentes letras minúsculas e maiúsculas sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença significativa para os critérios concentração hormonal e hormônio, respectivamente ($p<0,05$).

Tratamento	P (g)	CT (cm)	KA	S (%)
01.C ¹	22,56 \pm 19,83	9,91 \pm 2,57	1,10 \pm 0,08 ^{ab}	80,56 \pm 17,35
01.E2-250 ¹	14,79 \pm 9,16	9,12 \pm 2,01	1,57 \pm 0,20 ^c	63,69 \pm 7,22
01.E2-500 ¹	11,24 \pm 5,36	8,34 \pm 1,48	1,42 \pm 0,11 ^c	64,05 \pm 9,59
01.E2-1.000 ¹	15,26 \pm 9,02	8,94 \pm 1,79	0,85 \pm 0,08 ^d	66,83 \pm 14,37
01.EE2-250 ¹	15,04 \pm 13,11	8,58 \pm 2,71	1,13 \pm 0,08 ^a	72,38 \pm 13,20
01.EE2-500 ¹	17,43 \pm 9,67	9,36 \pm 2,20	0,95 \pm 0,07 ^{bd}	81,11 \pm 20,09
01.EE2-1.000 ¹	12,89 \pm 13,22	8,01 \pm 2,81	0,50 \pm 0,11 ^e	68,33 \pm 16,07
Concentração (F;p)	1,7832; 0,1744	1,2107; 0,3570	103,2084; <0,0001	0,9170; 0,5118
01.C ²	22,56 \pm 19,83 ^A	9,91 \pm 2,57	1,10 \pm 0,08 ^{AB}	80,56 \pm 17,35
01.E2 ²	13,75 \pm 8,04 ^B	8,81 \pm 1,77	1,30 \pm 0,34 ^A	64,85 \pm 9,48
01.EE2 ²	15,32 \pm 11,76 ^B	8,71 \pm 2,54	1,19 \pm 1,43 ^B	73,94 \pm 15,53
Hormônio (F;p)	4,8398; 0,0204	2,2254; 0,1355	4,4154; 0,0269	2,0229; 0,1599

¹ Critério concentração hormonal;

² Critério hormônio;

01.C: Controle;

01.E2-250: 17β -estradiol, concentração hormonal 250 ng L^{-1} ;

01.E2-500: 17β -estradiol, concentração hormonal 500 ng L^{-1} ;

01.E2-1.000: 17β -estradiol, concentração hormonal 1.000 ng L^{-1} .

01.EE2-250: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal 250 ng L^{-1} ;

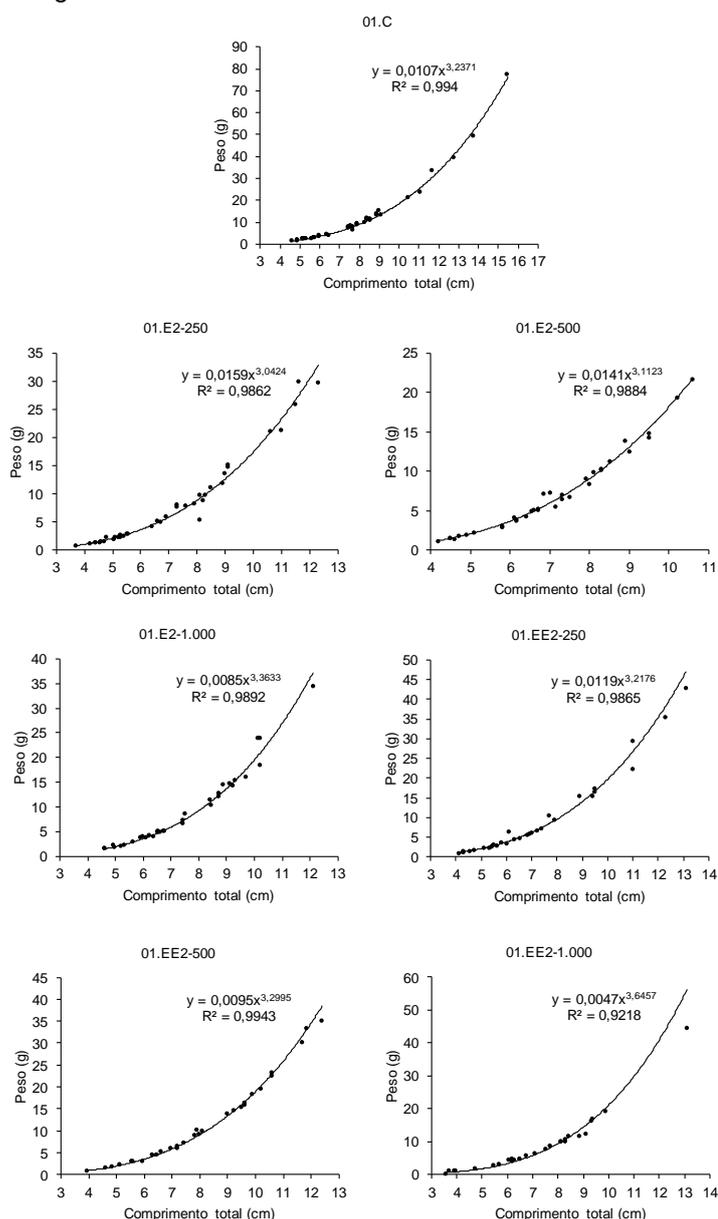
01.EE2-500: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal 500 ng L^{-1} ;

01.EE2-1.000: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 ng L^{-1} .

Fonte: Autor (2020).

Na Figura 23 é possível observar os gráficos da relação peso x comprimento dos tratamentos do Experimento 01.

Figura 23 – Equação, coeficiente alométrico (b) e coeficiente de determinação (R^2) da relação peso x comprimento de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.



01.C: Controle;

01.E2-250: 17 β -estradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.E2-500: 17 β -estradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.E2-1.000: 17 β -estradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

01.EE2-250: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.EE2-500: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.EE2-1.000: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

Fonte: Autor (2020).

Os coeficientes alométricos (b) dos tratamentos 01.C, 01.E2-250, 01.E2-500, 01.E2-1.000, 01.EE2-250, 01.EE2-500 e 01.EE2-1.000 apresentaram valores iguais a 3,2371; 3,0424; 3,1123; 3,3633; 3,2176; 3,2995 e 3,6457, respectivamente (FIGURA 23). Ainda nesta figura, podem ser observadas as curvas que definem as relações peso x comprimento, bem como suas equações e seus respectivos valores do coeficiente de determinação (R^2).

Após o término da exposição hormonal dos indivíduos do Experimento 02, observou-se alta mortalidade nos tratamentos com E2 e mortalidade completa dos indivíduos expostos aos tratamentos com EE2 (TABELA 16).

Tabela 16 – Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 02. Exposição às concentrações de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Porcentagem de eclosão (EC), peso (P), comprimento total (CT) e sobrevivência (S). Média \pm desvio padrão.

Tratamento	EC (%)	P(g)	CT (cm)	S (%)
02.C ¹	94,71 \pm 5,03	0,58 \pm 0,46	3,16 \pm 1,00	80,00
02.E2-250 ¹	81,23 \pm 6,53	0,36 \pm 0,31	2,72 \pm 0,93	13,33
02.E2-500 ^{1*}	75,69 \pm 15,17	0,757	3,69	3,33
02.E2-1.000 ¹	86,67 \pm 2,89	ns	ns	0,00
02.EE2-250 ¹	88,33 \pm 16,07	ns	ns	0,00
02.EE2-500 ¹	75,67 \pm 15,76	ns	ns	0,00
02.EE2-1.000 ¹	80,96 \pm 11,09	ns	ns	0,00
Concentração (F;p)	1,3839;0,2870	-	-	-
02.C ²	94,71 \pm 5,03	0,58 \pm 0,46	3,16 \pm 1,00	80,00
02.E2 ²	81,19 \pm 9,64	0,44 \pm 0,32	2,92 \pm 0,91	5,56
02.EE2 ²	86,66 \pm 13,99	ns	ns	0,00
Hormônio (F;p)	0,4456;0,1135	-	-	-

ns: Mortalidade total dos indivíduos;

¹ Critério concentração hormonal;

² Critério hormônio;

* Apenas um indivíduo sobreviveu;

02.C: Controle;

02.E2-250: 17 β -estradiol, concentração hormonal 250 $\mu\text{g L}^{-1}$;

02.E2-500: 17 β -estradiol, concentração hormonal 500 $\mu\text{g L}^{-1}$;

02.E2-1.000: 17 β -estradiol, concentração hormonal 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

02.EE2-250: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 250 $\mu\text{g L}^{-1}$;

02.EE2-500: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 500 $\mu\text{g L}^{-1}$;

02.EE2-1.000: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autor (2020).

Devido a esta baixa sobrevivência, não foi possível a aplicação de um teste estatístico para a comparação dos parâmetros zootécnicos peso, comprimento e sobrevivência. Desta forma, aplicou-se apenas estatística descritiva. Pelo mesmo motivo, não foi possível a construção dos gráficos da relação peso x comprimento e o cálculo do fator de condição.

Conforme pode ser observado na Tabela 16, para o critério concentração hormonal, a sobrevivência das tilápias no tratamento 02.E2-250 foi de 4 indivíduos (13,33%) e no tratamento 02.E2-500 apenas um peixe sobreviveu (3,33%) até o final do período de exposição hormonal. Entretanto, no controle (tratamento 02.C) a sobrevivência foi de 80,00%.

Ao considerar o critério tipo de hormônio, observa-se uma sobrevivência de 5,56% para o E2 e de 0,00% para EE2.

Entretanto, observou-se que, apesar de letal para as formas jovens de tilápia do Nilo, as concentrações hormonais avaliadas no Experimento 02 não afetaram a porcentagem de eclosão. Não houve diferença significativa na porcentagem de eclosão quando considerados os critérios concentração hormonal ($p=0,2870$) e tipo de hormônio ($p=0,1135$).

Estudando diferentes concentrações de EE2 (0, 10, 1.000 e 10.000 ng L⁻¹), Boudreal *et al.* (2004) encontraram que este hormônio afetou negativamente diversos parâmetros de desempenho zootécnico do peixe *Fundulus heteroclitus*, incluindo a sobrevivência, não apresentando efeito sobre o tempo de incubação e sobre a porcentagem de eclosão das larvas. Os dados apresentados por Boudreal *et al.* (2004) e os dados encontrados na presente pesquisa corroboram com o que afirma Anadu, Scott e Fulton (1999), que embriões de peixes são menos susceptíveis a contaminantes do que as larvas por causa da barreira protetora formada pela membrana que envolve o ovo, o córion. Além disto, von Westernhagem (1988) atesta que, de maneira geral, a fase larval é o período mais sensível da vida de um peixe teleósteo.

No Experimento 03 não foi observada diferença significativa ($p=0,11$) para o comprimento total dos indivíduos, com média variando entre 12,60±2,31 cm (03.E2-160) e 13,98±2,26 cm (03.EE2-160). Para os demais parâmetros zootécnicos avaliados, foi observada diferença significativa (TABELA 17).

Foi observada diferença significativa ($p=0,0373$) entre o peso dos indivíduos dos tratamentos 03.E2-160 (39,85±21,19 g) e 03.EE2-160 (57,13±24,58 g). Contudo, não houve diferença significativa entre os pesos destes tratamentos, quando comparados aos tratamentos 03.C- (46,67±21,59 g) e 03.C+ (49,40±31,22 g). Também não foi observada diferença significativa entre os tratamentos 03.C- e 03.C+.

A maior média para a sobrevivência ocorreu no tratamento 03.E2-160 (64,58±12,50%), sendo estatisticamente igual a 03.C- (43,75±4,17%) e diferente de

03.C+ ($33,33\pm 6,80\%$) e 03.EE2-160 ($31,25\pm 18,48\%$). O tratamento 03.C- foi ainda significativamente igual aos tratamentos 03.C+ e 03.EE2-160.

O fator de condição alométrico não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos 03.C- ($1,63\pm 0,11$) e 03.E2-160 ($1,48\pm 0,07$). Contudo, foi observada diferença significativa entre estes tratamentos e os tratamentos 03.C+ ($1,07\pm 0,11$) e 03.EE2-160 ($2,23\pm 0,031$). Também foi constatada diferença estatística entre os tratamentos 03.C+ e 03.EE2-160.

Tabela 17 - Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 03. Exposição à concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média \pm desvio padrão. Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p<0,05$).

Tratamento	P (g)	CT (cm)	KA	S (%)
03.C-	$46,67\pm 21,59^{a,b}$	$13,32\pm 2,10$	$1,63\pm 0,11^b$	$43,75\pm 4,17^{a,b}$
03.C+	$49,40\pm 31,22^{a,b}$	$13,38\pm 2,79$	$1,07\pm 0,11^c$	$33,33\pm 6,80^b$
03.E2-160	$39,85\pm 21,19^b$	$12,60\pm 2,31$	$1,48\pm 0,07^b$	$64,58\pm 12,50^a$
03.EE2-160	$57,13\pm 24,58^a$	$13,98\pm 2,26$	$2,23\pm 0,31^a$	$31,25\pm 18,48^b$
p;F	3,8762;0,0373	2,4848;0,1100	63,8693;<0,0001	6,7477;0,0067

03.C-: Controle negativo;

03.C+: Controle positivo;

03.E2-160: 17β -estradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$;

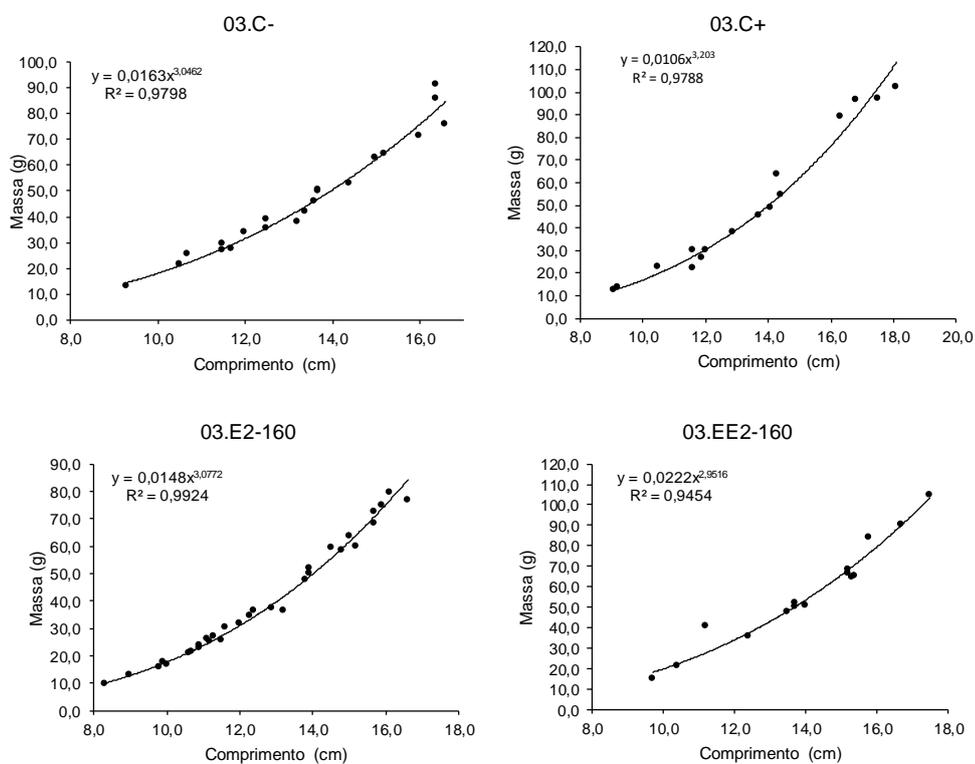
03.EE2-160: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autor (2020).

A Figura 24 apresenta os gráficos das relações peso x comprimento para juvenis de tilápia do Nilo dos tratamentos avaliados no Experimento 03, com suas respectivas equações, valores dos coeficientes de alometria (b) e dos coeficientes de determinação (R^2).

Pode-se observar que b apresentou valores de 3,0462; 3,2030; 3,0772 e 2,9516, respectivamente, para os tratamentos 03.C-, 03.C+, 03.E2-160 e 03.EE2-160. Também é possível perceber altos valores de R^2 , que variaram de 0,9454, para 03.EE2-160, a 0,9924, para 03.E2-160.

Figura 24 – Equação, coeficiente alométrico (b) e coeficiente de determinação (R^2) da relação peso x comprimento de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 03. Exposição à concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.



03.C-: Controle negativo;

03.C+: Controle positivo;

03.E2-160: 17β -estradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$;

03.EE2-160: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autor (2020).

Os parâmetros zootécnicos das tilápias do Nilo utilizadas no Experimento 04 podem ser observados na Tabela 18. Os maiores valores médios para o peso e comprimento foram, respectivamente, de $140,15 \pm 16,51$ g e $19,66 \pm 0,83$ cm, observados no tratamento 04.EE2-160(1S), tratamento no qual foi constatada a menor sobrevivência (33,33%).

Em contrapartida, as menores médias de peso e de comprimento foram obtidas no tratamento 04.E2-160(2S), com valores, respectivamente, de $101,40 \pm 36,56$ g e $17,49 \pm 2,28$ cm, tratamento no qual observou-se a maior sobrevivência (91,67%).

Tabela 18 – Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 04. Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol por períodos de 1; 2; 3 e 4 semanas. Peso (P), comprimento total (CT), fator de condição alométrico (KA) e sobrevivência (S). Média±desvio padrão.

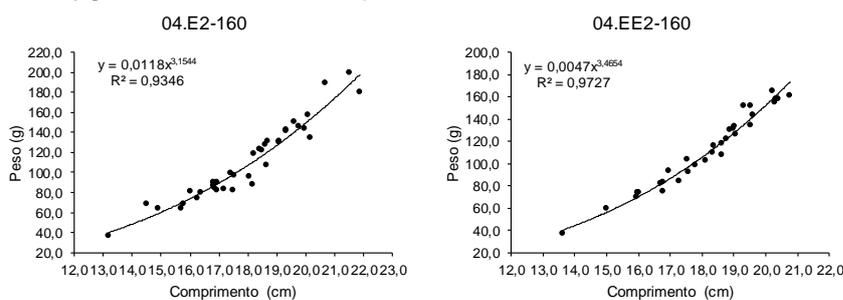
Tratamento	P (g)	CT (cm)	KA	S (%)
04.E2-160(1S)	107,90±33,79	17,70±1,77	1,21±0,07	75,00
04.E2-160(2S)	101,40±36,56	17,49±2,28	1,17±0,13	91,67
04.E2-160(3S)	121,56±51,53	18,64±1,95	1,13±0,14	66,67
04.E2-160(4S)	112,42±31,37	18,03±1,62	1,19±0,08	83,33
04.EE2-160(1S)	140,15±16,51	19,66±0,83	0,46±0,02	33,33
04.EE2-160(2S)	110,81±40,02	17,95±1,90	0,48±0,03	75,00
04.EE2-160(3S)	113,15±24,14	18,19±1,12	0,48±0,03	75,00
04.EE2-160(4S)	102,67±38,28	17,67±2,03	0,46±0,02	83,33

04.E2-160(1S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 1 semana de exposição;
 04.E2-160(2S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 2 semanas de exposição;
 04.E2-160(3S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 3 semanas de exposição;
 04.E2-160(4S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 4 semanas de exposição;
 04.EE2-160(1S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 1 semana de exposição;
 04.EE2-160(2S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 2 semanas de exposição;
 04.EE2-160(3S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 3 semanas de exposição;
 04.EE2-160(4S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 4 semanas de exposição.
 Fonte: Autor (2020).

O fator de condição alométrico (TABELA 18) apresentou valores maiores para os tratamentos que receberam E2, variando entre 1,13±0,14 para 04.E2-160(3S) e 1,21±0,07 para 04.E2-160(1S). Para os tratamentos cujos peixes foram expostos ao EE2, o maior valor do fator de condição foi observado no tratamento 04.EE2-160(3S) cuja média foi de 0,48±0,03 e o menor foi para o tratamento 04.EE2-160(4S), cujo valor médio foi de 0,46±0,02.

A Figura 25 apresenta os gráficos das relações peso x comprimento para juvenis de tilápia do Nilo dos tratamentos avaliados no Experimento 04 com suas respectivas equações, valores dos coeficientes de alometria (b) e dos coeficientes de determinação (R²).

Figura 25 – Equação, coeficiente alométrico e coeficiente de determinação (R²) da relação peso x comprimento de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 04. Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol.



04.E2-160: 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹;
 04.EE2-160: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹.
 Fonte: Autor (2020).

Pode-se observar que b apresentou valores de 3,1544 e 3,4654, respectivamente, para os peixes que foram expostos aos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol. Também é possível perceber altos valores de R^2 .

Durante o desenvolvimento da presente pesquisa, foi possível observar que ocorreu uma grande heterogeneidade entre as variáveis zootécnicas peso, comprimento e fator de condição dentro de um mesmo experimento.

De acordo com Vazzoler (1996), o fator de condição é uma variável importante a ser considerada, pois é um indicador quantitativo do grau de hígidez ou de bem-estar do peixe, refletindo as condições alimentares recentes e/ou gasto de reservas em atividades cíclicas, influenciados pelas condições ambientais e aspectos comportamentais da espécie.

Os valores do coeficiente de alometria (b) encontrados na presente pesquisa estão dentro da faixa de 2,5 a 4,0 citada por Le Cren (1951) para a maioria das espécies de peixes. Valores de b maiores que 3 indicam um crescimento alométrico positivo, havendo um maior incremento em comprimento quando comparado ao peso, o que resulta em um fator de condição com valor menor do que aquele esperado para a espécie. Foi possível observar esta condição em indivíduos que apresentavam ventre retraído devido a alguma disfunção alimentar decorrente da exposição hormonal.

Por outro lado, valores de b menores que 3 indicam um crescimento alométrico negativo, o que significa um maior incremento do peso quando comparado ao comprimento, resultando em um valor do fator de condição maior do que o esperado. Esta condição foi observada nos indivíduos que apresentavam dilatação abdominal devido ao acúmulo de líquidos, condição denominada de ascite. Quando os valores do coeficiente de alometria se aproximam de 3, tem-se um crescimento do tipo isométrico, no qual ocorre um igual incremento em peso e comprimento.

Os valores do fator de condição alométrico encontrados são considerados baixos quando comparados aos encontrados por Tachibana *et al.* (2008), estudando a tilápia do Nilo durante o período de alevinagem, e aos valores encontrados por Passos-Neto *et al.* (2015), estudando a tilápia vermelha durante os primeiros estágios de desenvolvimento. Niemuth e Klaper (2015) encontraram valores de fator de condição significativamente menores para *Pimephales promelas* expostos ao desregulador endócrino metformina em concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. Dammann *et al.* (2011), por outro lado, não encontraram diferença significativa no valor do fator de

condição ao expor *P. promelas* a diferentes concentrações de estrona (10; 50 e 100 ng L⁻¹) e 17β-estradiol (5; 25 e 50 ng L⁻¹).

4.4. Histologia

No Experimento 01, foram analisadas histologicamente as gônadas dos indivíduos dos tratamentos 01.C (n=16), 01.E2-250 (n=10), 01.E2-500 (n=9), 01.E2-1.000 (n=13), 01.EE2-250 (n=9), 01.EE2-500 (n=14) e 01.EE2-1.000 (n=10). Devido ao diminuto tamanho das gônadas de alguns peixes, não foi possível removê-las com sucesso.

Foram observados indivíduos intersexo submetidos aos tratamentos com ambos os hormônios, desde as concentrações mais baixas, 250 ng L⁻¹.

No tratamento 01.E2-500 foi encontrado um indivíduo intersexo, enquanto que nos tratamentos 01.E2-250 e 01.E2-1.000 não foi observado nenhum indivíduo intersexo. Nestes dois últimos tratamentos, entretanto, houve uma considerável quantidade de situações (7 e 5 indivíduos, respectivamente) nas quais as gônadas não puderam ser removidas devido ao seu diminuto tamanho e fragilidade.

Nos tratamentos 01.EE2-250, 01.EE2-500 e 01.EE2-1.000 foram observados 2, 4 e 2 indivíduos intersexo, respectivamente (TABELA 19).

Tabela 19 – Classificação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 01 quanto as suas características gonadais (macho, fêmea e intersexo). Exposição às concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem.

Tratamento	Gônada			Perdida (n)	TOTAL (n)
	Macho (n)	Fêmea (n)	Intersexo (n)		
01.C	8	5	ns	3	16
01.E2-250	1	2	ns	7	10
01.E2-500	2	4	1	2	9
01.E2-1.000	1	7	ns	5	15
01.EE2-250	2	2	2	3	9
01.EE2-500	0	6	4	4	14
01.EE2-1.000	1	6	2	1	10

Fonte: Autor (2020)

01.C: Controle;

01.E2-250: 17β-estradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.E2-500: 17β-estradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.E2-1.000: 17β-estradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

01.EE2-250: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.EE2-500: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.EE2-1.000: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

Devido ao diminuto tamanho dos peixes ao final do período de exposição hormonal no Experimento 02, não foi possível a extração das gônadas para montagem das secções histológicas e observação ao microscópio.

No Experimento 03, com 122 dias de crescimento após o término da exposição hormonal, foi possível reduzir consideravelmente o número de gônadas perdidas durante o processo de extração: uma gônada perdida no tratamento 03.E2-160 e duas no tratamento 03.EE2-160. Nos tratamentos 03.C- e 03.C+ nenhuma gônada foi perdida, bem como nenhum indivíduo intersexo foi observado. Apenas um peixe intersexo foi observado entre todos os sobreviventes do Experimento 03, no tratamento 03.E2-160 (TABELA 20).

Nos tratamentos 03.C- e 03.C+ foram observadas quantidades aproximadamente iguais de machos e fêmeas. No primeiro tratamento foram 11 machos e 10 fêmeas, enquanto que no segundo, 7 machos e 9 fêmeas. Nos tratamentos hormonais, por outro lado, foi observada uma predominância quase que absoluta de populações femininas. No tratamento 03.E2-160 foram observados apenas dois machos e 27 fêmeas, de um total de 31 peixes sobreviventes. No tratamento 03.EE2-160, de um total de 15 sobreviventes, havia 13 fêmeas e nenhum macho.

Tabela 20 – Classificação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 03 quanto às suas características gonadais (macho, fêmea e intersexo). Exposição à concentração de 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.

Tratamento	Gônada				TOTAL (n)
	Macho (n)	Fêmea (n)	Intersexo (n)	Perdida (n)	
03.C-	11	10	0	0	21
03.C+	7	9	0	0	16
03.E2-160	2	27	1	1	31
03.EE2-160	0	13	0	2	15

Fonte: Autor (2020)

03.C-: Controle negativo;

03.C+: Controle positivo;

03.E2-160: 17 β -estradiol, concentração hormonal 160 $\mu\text{g L}^{-1}$;

03.EE2-160: 17 α -etinilestradiol, concentração hormonal 160 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Devido ao avançado estágio de desenvolvimento dos indivíduos do Experimento 04 (217 dias de crescimento após o término da exposição hormonal do último grupo), foi possível avaliar, na maioria dos casos, o sexo externo de cada espécime com base nas características gerais e na anatomia da papila urogenital. Também foi possível visualizar com maior riqueza de detalhes as etapas da

gametogênese das células germinativas de machos e fêmeas nas secções histológicas.

Em quatro casos o sexo externo foi classificado como indefinido, 1, 1 e 2 indivíduos dos tratamentos 04.E2-160(2S), 04.EE2-160(1S) e 04.EE2-160(2S), respectivamente.

Somente no tratamento 04.E2-160(2S) foi possível identificar um indivíduo com papila urogenital masculina. Neste caso, a histologia da gônada confirmou ser, de fato, um peixe macho com testículos maduros.

Nos tratamentos 04.E2-160(1S), 04.E2-160(3S), 04.E2-160(4S), 04.EE2-160(3S) e 04.EE2-160(4S), todos os indivíduos foram classificados como fêmeas segundo suas características externas. Entretanto, para todos os cinco tratamentos acima citados, a histologia das gônadas demonstrou haver, entre estas possíveis fêmeas, indivíduos intersexo e macho (TABELA 21).

Foram observados peixes intersexo nos tratamentos 04.E2-160(1S) (um indivíduo), 04.E2-160(3S) (um indivíduo), 04.EE2-160(2S) (um indivíduo), 04.EE2-160(2S) (três indivíduos) e 04.EE2-160(4S) (dois indivíduos). Nenhum indivíduo intersexo foi observado nos tratamentos 04.E2-160(2S), 04.E2-160(4S) e 04.EE2-160(1S).

Tabela 21 – Classificação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 04 quanto as suas características externas (macho, fêmea e indefinido) e gonadais (macho, fêmea e intersexo). Exposição à concentração de 160 µg L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol por períodos de 1; 2; 3 e 4 semanas.

Tratamento	Sexo externo			Gônada			TOTAL (n)
	Macho (n)	Fêmea (n)	Indefinido (n)	Macho (n)	Fêmea (n)	Intersexo (n)	
04.E2-160(1S)	0	9	0	0	8	1	9
04.E2-160(2S)	1	9	1	1	10	0	11
04.E2-160(3S)	0	8	0	0	7	1	8
04.E2-160(4S)	0	10	0	1	9	0	10
04.EE2-160(1S)	0	3	1	1	3	0	4
04.EE2-160(2S)	0	7	2	0	8	1	9
04.EE2-160(3S)	0	9	0	0	6	3	9
04.EE2-160(4S)	0	10	0	1	7	2	10

04.E2-160(1S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 1 semana de exposição;

04.E2-160(2S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 2 semanas de exposição;

04.E2-160(3S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 3 semanas de exposição;

04.E2-160(4S): 17β-estradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 4 semanas de exposição;

04.EE2-160(1S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 1 semana de exposição;

04.EE2-160(2S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 2 semanas de exposição;

04.EE2-160(3S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 3 semanas de exposição;

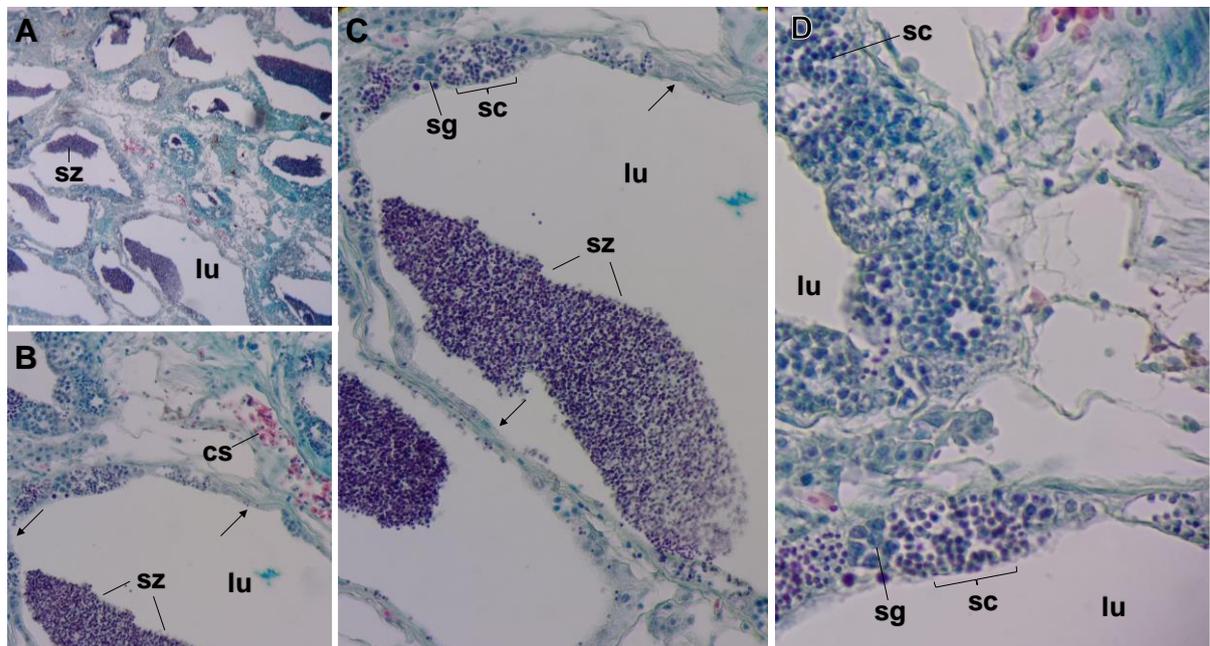
04.EE2-160(4S): 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 160 µg L⁻¹, 4 semanas de exposição.

Fonte: Autor (2020).

Embora as gônadas apresentadas nas Figuras 26, 27 e 28 sejam de peixes do Experimento 04, elas ilustram as características clássicas das gônadas de espécimes machos, fêmeas e indivíduos intersexo, independentemente de a qual experimento o peixe pertença.

A Figura 26 mostra secções histológica do testículo maduro normal de uma tilápia do Nilo na fase Apto a liberar esperma. É possível observar o lúmen dos túbulos seminíferos dilatados com presença de espermatozoides, epitélio germinativo descontínuo e presença de células sanguíneas (eritrócitos).

Figura 26 – Secções histológicas de testículo normal de macho sexualmente maduro de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 04. A-D) Diferentes aumentos e detalhes de um testículo na fase Apto a liberar esperma.

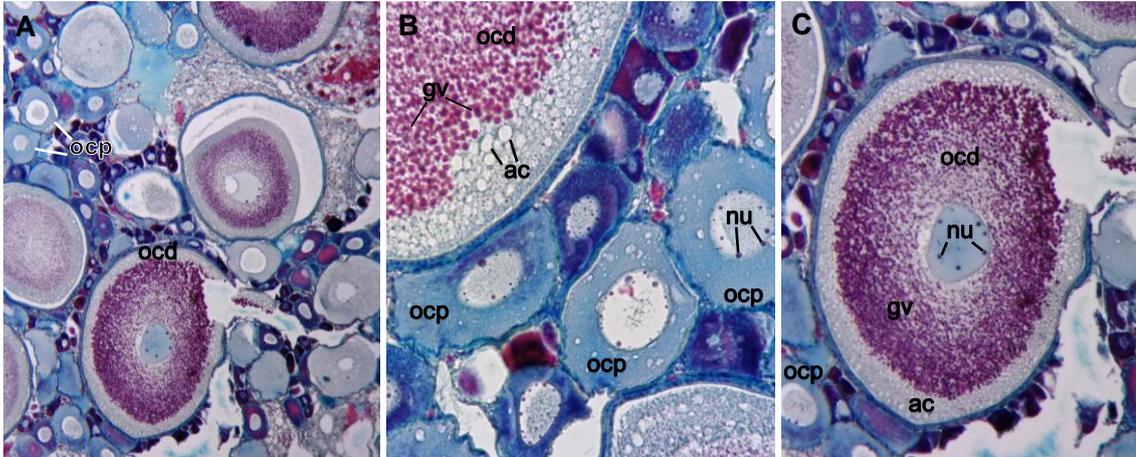


Fonte: Autor (2020)

lu = lúmen do túbulo seminífero; sc = espermatócito; sg = espermatogônia; sz = espermatozoide; cs = células sanguínea; ↑ = descontinuidade do epitélio germinativo; } = espermatocísto. Coloração: hematoxilina e tricrômico de Gomori.

Na Figura 27 é possível observar secções histológicas da gônada madura normal de uma fêmea de tilápia do Nilo na fase Apto à desova. É possível observar ovócitos primários e completamente desenvolvidos com presença de alvéolos corticais, grânulos de vitelo e nucléolos periféricos ao núcleo.

Figura 27 – Secções histológicas de um ovário normal de fêmea de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 04. A-C) Diferentes aumentos e detalhes de um ovário na fase Apto à desova.

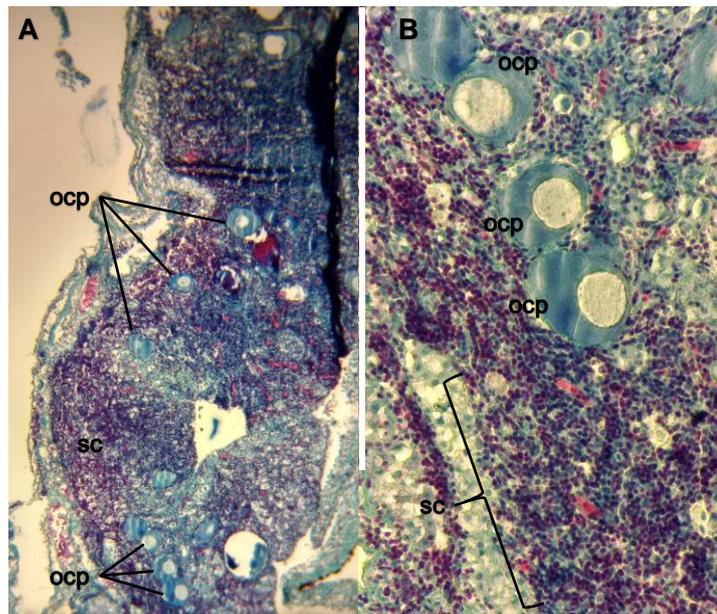


Fonte: Autor (2020)

nu = nucléolo; ocp = ovócito primário; ocd = ovócito completamente desenvolvido; ac = alvéolo cortical; gv = grânulos de vitelo. Coloração: hematoxilina e tricrômico de Gomori.

A gônada de um indivíduo intersexo, que apresenta características tanto masculina quanto feminina, pode ser observada na Figura 28. Quanto às características masculinas, esta gônada pode ser classificada como em fase de Desenvolvimento, subfase Desenvolvimento inicial, com presença predominante de espermatócitos e lúmen dos túbulos seminíferos ainda imperceptíveis. Já para as características femininas, a gônada pode ser classificada como em fase Imaturo, com presença de ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário.

Figura 28 – Secção histológica da gônada de uma tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) intersexo do Experimento 04.



Fonte: Autor (2020)

ocp = ovócito primário; sc = espermatócito. Coloração: hematoxilina e tricrômico de Gomori.

Em todos os experimentos realizados durante o desenvolvimento da presente pesquisa, foi observado retardo no desenvolvimento gonadal da tilápia do Nilo, o que resultou em dificuldade na remoção das gônadas em indivíduos ainda muito jovens como aqueles dos Experimentos 01 e 02 e, em menor parte, no Experimento 03. Por este motivo, os tempos de desenvolvimento pós exposição hormonal foram gradativamente aumentados até culminar com 217 dias no Experimento 04. Desta forma foi possível, não apenas remover as gônadas com mais sucesso, como também foi viável a determinação do sexo externo e comparação com os resultados obtidos por meio das secções histológicas das gônadas, conforme observado na Tabela 21.

Woodling *et al.* (2006) também evidenciaram em sua pesquisa atrofia no desenvolvimento gonadal em peixes expostos a desreguladores endócrinos coletados a jusante do ponto de lançamento de uma estação de tratamento de esgoto (ETE). Os pesquisadores relataram dificuldade na remoção das gônadas e na identificação visual do sexo do indivíduo. Dammann *et al.* (2011) relataram diminuição do índice gonadossomático em *Pimephales promelas* na medida em que aumentaram a concentração de estrona de 10 para 100 ng L⁻¹ e E2 de 5 para 50 ng L⁻¹. Lange *et al.* (2001) também observaram atrofia gonadal em *Pimephales promelas* expostos a concentrações de EE2 que variaram de 0,2 a 64 ng L⁻¹.

O sexo fenotípico da tilápia do Nilo pode ser determinado inequivocamente pelo exame visual da papila genital ou pelo sacrifício do peixe para exame das gônadas. Entretanto, durante uma indução hormonal, a definição da papila genital pode ocorrer antes da definição das gônadas. Neste caso, o peixe que foi exposto tardiamente ao hormônio ou a uma dose sub efetiva, pode externamente parecer ser de um sexo e internamente se desenvolver como o sexo oposto (RIBEIRO, 1996).

É sabido que os peixes são significativamente mais sensíveis a ação de desreguladores endócrinos durante os primeiros estágios de desenvolvimento, particularmente durante o período de diferenciação sexual (JOHNS *et al.*; 2011), que em muitas espécies de peixes acontece entre a fertilização e o 25º dia após a eclosão (NAKAMURA *et al.*; 1998). Este fato pode ser confirmado pelos resultados obtidos nesta pesquisa e corroborados pelas pesquisas realizadas por van Aerle *et al.* (2002) e Pawlowski *et al.* (2004). Os primeiros encontraram que um período de exposição de apenas 10 a 15 dias a uma concentração baixa de EE2 (10 ng L⁻¹) foi suficiente para resultar na feminização de *Pimephales promelas*. Pawlowski *et al.* (2004), por outro

lado, não observaram efeito feminizante em *P. promelas* expostos à mesma concentração de EE2 por um período de três semanas após o período natural de diferenciação sexual. Niemuth *et al.* (2015) expuseram *P. promelas* macho sexualmente diferenciados a uma concentração de 40 µg L⁻¹ do desregulador endócrino metformina e observaram produção de vitelogenina plasmática, mas nenhuma ocorrência de peixes feminizados. Em outra pesquisa envolvendo a mesma espécie, o mesmo composto químico com mesma concentração, Niemuth e Klaper (2015) observaram indivíduos feminizados quando expostos desde os primeiros estágios de desenvolvimento.

Diversos outros autores observaram que a presença de E2 na água resultou na feminização de machos incluindo *Oryzias latipes* (KOGER; TEH; HINTON, 2000), ciclídeo sul americano *Cichlasoma dimerus* (MEIJIDE *et al.*, 2016), *Poecilia reticulata* (TOFT; BAATRUP, 2003) e *Fundulus heteroclitus* (URUSHITANI *et al.*, 2002).

Apesar de Tollefsen, Mathisen e Stenersen (2002) afirmarem que o potencial estrogênico do EE2 é menor que do E2, na presente pesquisa não foi observada diferença no número de indivíduos intersexo quando comparadas as mesmas concentrações de ambos os hormônios. Este fato pode indicar que para E2 e EE2 as concentrações mínimas capazes de gerar uma resposta sejam menores que a menor concentração testada.

Uma consequência ecológica grave do desenvolvimento no ambiente de fêmeas fenotípicas (XY), também conhecidas como neofêmeas, por meio da ação de substâncias estrogênicas é a formação de supermachos (YY), cujo acasalamento com fêmeas normais (XX) gera prole 100% masculina (XY) que, em tese, também estará sob o efeito feminizante de desreguladores endócrinos de ação estrogênica que resultará na formação de novas neofêmeas. Neste contexto, Hassel *et al.* (2016) e Huang *et al.* (2016) afirmam que o resultado da exposição a substâncias estrogênicas a longo prazo pode resultar na destruição de populações inteiras e causar a subsequente extinção de espécies.

Não foram encontradas na literatura pesquisas envolvendo a ação de desreguladores endócrinos de ação estrogênica na diferenciação sexual em nenhuma das diversas espécies de tilápia em condições laboratoriais. Os trabalhos que tratam deste assunto envolvem a captura de espécimes selvagens juntamente com análise da água e no solo.

Estudando duas espécies de tilápia (*Sarotherodon melanotheron* e *Tilapia guineensis*) capturadas na represa Awba, Nigéria, Adeogun *et al.* (2016) encontraram uma frequência média de 34,8% de indivíduos intersexo entre as duas espécies avaliadas. Os pesquisadores relataram no substrato da represa presença de metais pesados (As, Cd, Pb, Hg e Ni), organoclorados (bisfenil policlorado) e compostos fenólicos (4-iso-nonilfenol).

Apesar de importantes por evidenciarem que os efeitos causados por compostos de preocupação emergente são uma realidade atual no meio ambiente, os estudos de campo comprovam, na verdade, a ação sinérgica dos compostos presentes e a interação destes com o meio. Estudos laboratoriais da ação conjunta de desreguladores endócrinos, entretanto, têm evidenciado que seus efeitos metabólicos não podem ser utilizados como base para prever a ação individual de cada composto (CHEN *et al.*; 2007; HU *et al.*; 2014; JORDAN *et al.*; 2012).

Por este motivo, estudos laboratoriais têm avaliado o efeito de desreguladores endócrinos, principalmente E2 e EE2, em concentrações que variam de poucos nanogramas por litro até concentrações que atingem a ordem de microgramas por litro. As concentrações estudadas variam de acordo com a espécie avaliada e também de acordo com as concentrações encontradas nas matrizes ambientais locais, uma vez que os estudos visam reproduzir artificialmente as condições potencialmente encontradas no ambiente. A grande amplitude de concentrações avaliadas na presente pesquisa (250 ng L⁻¹ a 1.000 µg L⁻¹), além da avaliação de diferentes tempos de exposição (1 a 4 semanas) objetivou exatamente o estudo de diferentes cenários possíveis.

As concentrações mais elevadas, da ordem de µg L⁻¹, foram inclusas no presente estudo, uma vez que concentrações dessa magnitude foram relatadas em águas superficiais das regiões sudeste (CAMPANHA *et al.*, 2015) e sul (MACHADO *et al.*, 2014) do Brasil. Segundo Lima *et al.* (2017), a estrutura das estações de tratamento de esgoto menos consolidada no Brasil, pode ser apresentada como um dos motivos pelos quais as concentrações de fármacos e desreguladores endócrinos encontradas em efluentes e água superficiais são, quase sempre, superiores às aquelas encontradas em países desenvolvidos como EUA, Canadá, Espanha e Alemanha, por exemplo.

Além dos hormônios, outros compostos químicos, como os fármacos, também estão sendo evidenciados como causadores de disfunções endócrinas na

diferenciação sexual de peixes. Niemuth e Klaper (2015), expuseram *Pimephales promelas* a uma concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metformina, que é um medicamento antidiabético oral, e observaram o desenvolvimento de indivíduos intersexo em diferentes graus de feminização. Os autores observaram desde machos com presença eventual e dispersa de folículos perinucleolares até indivíduos com características externas masculinas com gônadas 100% feminina, com presença de ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento.

A determinação sexual dos indivíduos de diferentes espécies e grupos taxonômicos é controlada por uma série de reações bioquímicas que envolvem diferentes proteínas. Para que ocorra alteração na diferenciação sexual de machos e fêmeas; o fator atuante deve causar alterações estruturais e/ou funcionais em tais proteínas (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Além de fatores antrópicos, alguns fatores ambientais também podem causar alteração na determinação do sexo em peixes. Como exemplo destes fatores, tem-se a temperatura, que influencia na diferenciação sexual em tilápias (AZAZA; DHRAÏEF; KRAÏEM, 2008; ROUGEOT *et al.*, 2008) e em outras espécies de peixes como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (MAGERHANS; MÜLLERBELECKE; HÖRSTGEN-SCHWARK, 2009). Ainda não se sabe ao certo sobre a influência conjunta de fatores antrópicos (desreguladores endócrinos) e naturais (temperatura), e pesquisas futuras poderão esclarecer esta questão.

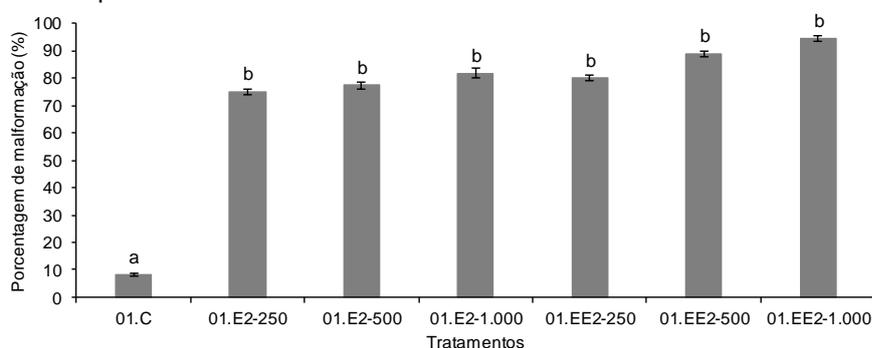
4.5. Morfologia

Outro efeito adverso causado pela exposição da tilápia do Nilo aos desreguladores endócrinos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol foi o desenvolvimento de deformidades das mais variadas formas em todos os experimentos conduzidos na presente pesquisa.

No Experimento 01, foi encontrada uma grande diferença entre o número de indivíduos que apresentaram algum tipo de malformação, quando comparado o tratamento 01.C (2 indivíduos) com os tratamentos hormonais ($F=7,1771$; $p=0,0015$). Contudo, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) para o número de indivíduos malformados, quando comparados apenas os tratamentos hormonais entre si.

O número de indivíduos com algum tipo de malformação foi de 18 (75,00% do total de indivíduos que sobreviveram até o final do experimento), 17 (77,27%), 18 (81,82%), 16 (80,00%), 16 (88,89%) e 17 (94,44%), para os tratamentos 01.E2-250, 01.E2-500, 01.E2-1.000, 01.EE2-250, 01.EE2-500 e 01.EE2-1.000, respectivamente (FIGURA 29).

Figura 29 – Porcentagem de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com algum tipo de malformação observados no Experimento 01. Exposição às concentrações de 250 ng L⁻¹; 500 ng L⁻¹ e 1.000 ng L⁻¹ dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Colunas com diferentes letras sobscritas indicam diferença significativa (F=7,1771; p=0,0015). As barras representam o desvio padrão.



01.C: Controle;

01.E2-250: 17β-estradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

01.E2-500: 17β-estradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.E2-1.000: 17β-estradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

01.EE2-250: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 250 ng L⁻¹;

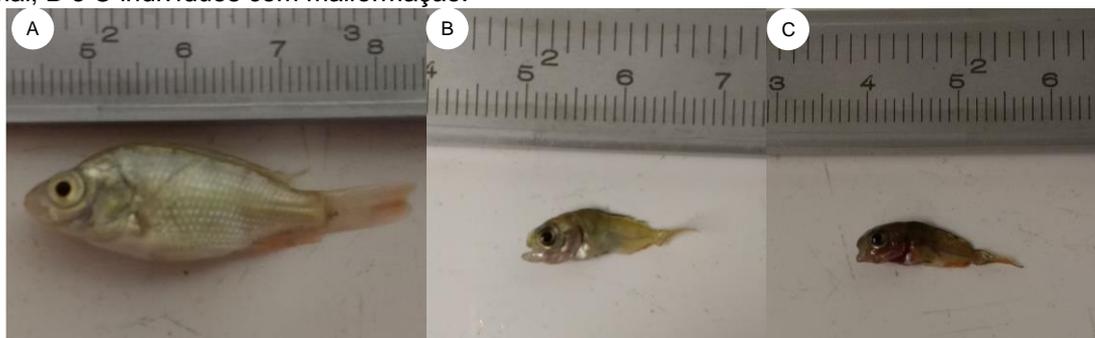
01.EE2-500: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 500 ng L⁻¹;

01.EE2-1.000: 17α-etinilestradiol, concentração hormonal 1.000 ng L⁻¹.

Fonte: Autor (2020).

Apesar da pequena quantidade de peixes sobreviventes ao final do período de exposição hormonal no Experimento 02, foi possível observar o severo atraso no desenvolvimento daqueles que passaram pela exposição ao E2. Não foi observado nenhum indivíduo com malformação no controle, enquanto todos os indivíduos sobreviventes dos tratamentos 02.E2-250 (4 indivíduos) e 02.E2-500 (1 indivíduo) apresentaram anormalidades, a exemplo do que pode ser observado na Figura 30.

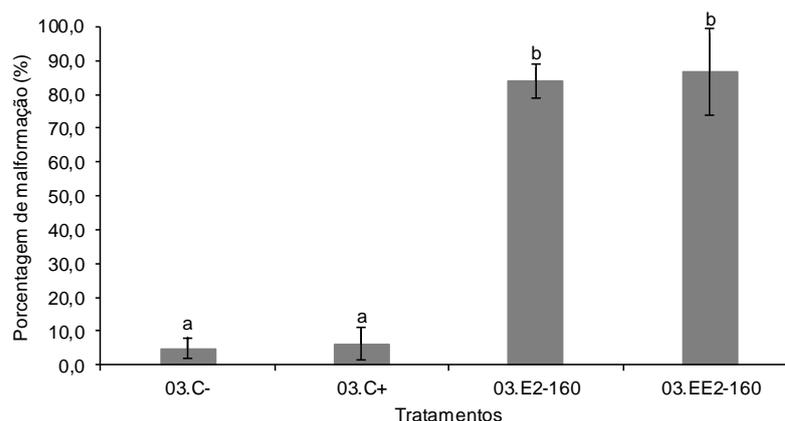
Figura 30 – Exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Experimento 02. A: Indivíduo normal; B e C indivíduos com malformação.



Fonte: Autor (2020).

Foi encontrada diferença significativa ($F=30,4997$; $p<0,0001$) entre o número de indivíduos que apresentaram algum tipo de malformação no Experimento 03, quando comparados os controles 03.C- (1 indivíduo; 4,76%) e 03C+ (1 indivíduo; 6,25%) com os tratamentos hormonais 03.E2-160 (26 indivíduos; 83,87%) e 03.EE2-160 (13 indivíduos; 86,67%). Contudo, não foi observada diferença significativa para o número de indivíduos malformados, quando comparados apenas os controles e os tratamentos hormonais entre si (FIGURA 31).

Figura 31 – Porcentagem de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com algum tipo de malformação observados no Experimento 03. Exposição à concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem. Colunas com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa ($F=30,4997$; $p<0,0001$). As barras representam o desvio padrão.



03.C-: Controle negativo;

03.C+: Controle positivo;

03.E2-160: 17β -estradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$;

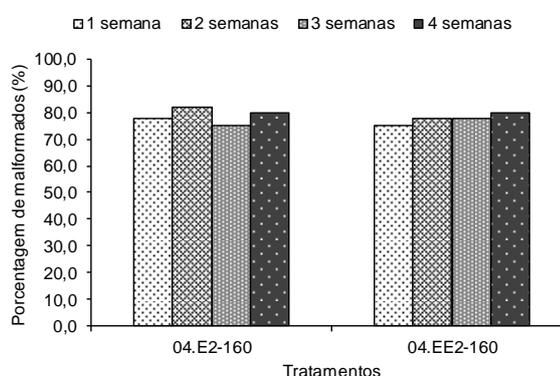
03.EE2-160: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autor (2020).

No Experimento 04 foi observada pouca diferença entre as quantidades de indivíduos malformados, independentemente do tipo de hormônio e do tempo de exposição. Em todos os casos, as porcentagens foram maiores que 70% (Figura 32).

Nos tratamentos referentes ao hormônio E2, as porcentagens de indivíduos malformados foram de 77,8% (n = 7); 81,8% (n = 9); 75,0% (n = 6) e 80,0% (n = 8), respectivamente, para os tempos de exposição de 1, 2, 3 e 4 semanas. Já para o EE2, as porcentagens foram 75,0% (n = 3); 77,8% (n = 7); 77,8% (n = 7) e 80,0% (n = 8).

Figura 32 – Porcentagem de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com algum tipo de malformação observados no Experimento 04. Exposição à concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol por períodos de 1; 2; 3 e 4 semanas.



04.E2-160: 17β -estradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$;
 04.EE2-160: 17α -etinilestradiol, concentração hormonal $160 \mu\text{g L}^{-1}$.
 Fonte: Autor (2020).

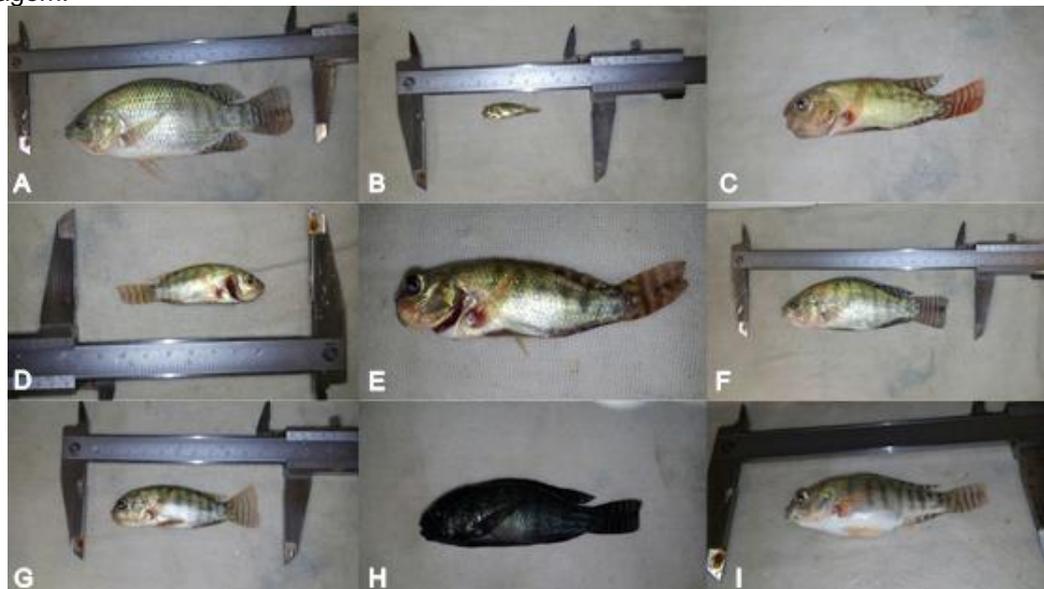
A Figura 33 mostra exemplos característicos das malformações encontradas na presente pesquisa para os quatro experimentos realizados. A deformidade mais observada foi o ventre retraído; esta condição está frequentemente associada à deficiência nutricional de origem fisiológica. O ventre retraído confere ao indivíduo baixo peso, resultando em um coeficiente alométrico maior que 3 e consequente fator de condição alométrico baixo.

Também foi observado atraso severo no desenvolvimento, deformações na boca, deformações no formato da cabeça, exoftalmia (olhos saltados), abdome distendido com acúmulo de líquido (ascite), rebaixamento do soalho bucal, brânquias expostas devido a deformidades do opérculo, alteração da coloração natural e sinais de hemorragia na base das nadadeiras, principalmente na nadadeira peitoral.

Além disto, foram observados indivíduos com natação errática, desequilibrada e problemas de flutuabilidade, uma vez que se apresentavam a maior

parte do tempo parados no fundo do aquário, o que não condiz com o comportamento natural da tilápia do Nilo.

Figura 33 – Tipos de malformações encontradas em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na presente pesquisa. Exposição aos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol durante a fase de alevinagem.



Indivíduo normal: A;
 Atraso no crescimento: B;
 Malformação no formato da cabeça: C, E, G e H;
 Malformação bucal: C, E, G;
 Rebaixamento do soalho bucal: C;
 Malformação do opérculo: D e;
 Retração do ventre: C, D, E, F, G e H;
 Abdome distendido com acúmulo de líquido (ascite): I;
 Exoftalmia: E;
 Coloração anormal: H;
 Sinais de hemorragia na base da nadadeira peitoral: C, D e;
 Nota: todos os indivíduos das fotos acima possuem a mesma idade
 Fonte: Autor (2020).

Anomalias morfológicas causadas por E2 e EE2, segundo os dados obtidos no presente estudo, não pareceram ser influenciadas pelas concentrações avaliadas nos Experimentos 01 e 03. Tão pouco, tais deformidades foram influenciadas pelo tempo de exposição hormonal, que variou de uma a quatro semanas no Experimento 04.

Devido ao fato de haver poucos trabalhos avaliando os efeitos de substâncias estrogênicas no desenvolvimento morfológico de peixes, principalmente durante os primeiros estágios de vida, é uma tarefa árdua comparar os dados obtidos com aqueles presentes na literatura. Além disto, as diferenças metodológicas aplicadas por cada pesquisador, os diferentes estágios de desenvolvimento dos

peixes, as variadas concentrações testadas, os diversos tempos de exposição, a variedade de compostos utilizados, as diferentes formas de expor (na água e na alimentação) e o número de espécies de peixes avaliadas, torna esta tarefa ainda mais complexa.

Dentre as espécies mais utilizadas para a avaliação em laboratório dos efeitos morfológicos causados por substâncias com potencial de desregulador endócrino encontradas na literatura, podem ser citadas: *Oryzias latipes* (nome popular internacional, *japanese medaka*) (PATYNA *et al.*; 1999), *Danio rerio* (paulistinha ou *zebrafish*) (ANDERSEN *et al.*; 2001), *Cyprinodon variegatus* (*sheepshead minnows*) (ZILLIOUX *et al.*; 2001), *Fundulus heteroclitus* (*mummichog*) (BOUDREAU *et al.*; 2004), *Pimephales promelas* (*fathead minnows*) (PARROTT; WOOD, 2002), *Poecilia reticulata* (*guppy*) (VOLKOVA *et al.*; 2015) e *Melanotaenia fluviatilis* (*murray rainbowfish*) (WOODS; KUMAR, 2011). Dentre as espécies acima listadas, apenas o paulistinha e o *guppy* são facilmente encontrados no Brasil. Nenhum trabalho utilizando a tilápia do Nilo foi encontrado para comparação dos dados obtidos.

Boudreau *et al.* (2004) estudando o efeito do EE2 no desenvolvimento de alterações morfológicas em *Fundulus heteroclitus*, em concentrações que variaram de 0 a 10.000 ng L⁻¹, encontraram basicamente as mesmas deformidades observadas em tilápia do Nilo na presente pesquisa. Os pesquisadores relataram inchaço dos tecidos moles próximo à região anal (ascite), deformações craniofaciais, hemorragia em diferentes partes do corpo, deformações na boca, coloração anormal, retardo no desenvolvimento, deformações nos olhos e raios das nadadeiras curvados, além de lordose e escoliose. Boudreau *et al.* (2004) relatam ainda que alguns peixes permaneciam deitados no fundo das unidades experimentais, mas que se alimentavam normalmente e sobreviveram até o final do período experimental.

Lange *et al.* (2001) encontraram malformações severas em *Pimephales promelas* expostos a baixas concentrações de 17 α -etinilestradiol (16 e 64 ng L⁻¹) durante seu ciclo de vida, como atrofia, hemorragias, abdome distendido e curvatura da coluna vertebral (lordose e escoliose). Lei *et al.* (2014) observaram, principalmente, escoliose e abdome dilatado em *Oryzias latipes* expostos a concentrações de estriol (E3) que variaram de 5 a 5.000 ng L⁻¹.

As deformações ósseas observadas na região da cabeça das tilápias do Nilo neste estudo devem estar relacionadas com o efeito dos estrogênios na calcificação óssea. Segundo Oursler (1998), os estrogênios estão envolvidos no

desenvolvimento de diferentes tipos de células envolvidas na formação e modelagem dos ossos. Esta informação foi corroborada por Armour *et al.* (1997), que observaram aumento na calcificação óssea em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta a E2. Boudreau *et al.* (2004) observaram deformidades ósseas nas nadadeiras, boca e cabeça de *Fundulus heteroclitus* expostos a EE2. Estes resultados parecem suportar a hipótese de que EE2 e E2 foram os responsáveis pelas deformidades observadas neste estudo. Alterações ósseas na coluna também foram observadas em *Oryzias latipes* que receberam doses de E2 inclusa na alimentação (0,05 a 5 mg/kg de alimento).

A única deformidade observada na tilápia do Nilo que parece não ter relação com estrutura óssea foi a ascite. Esta mesma deformidade foi relatada por diferentes autores com diferentes nomes, como protrusão anal (LANGE *et al.*, 2001) e inchaço anal (BOUDREAU *et al.*, 2004). Diferentemente do que foi observado neste estudo, Boudreau *et al.* (2004) relataram que, após final da exposição ao EE2, houve regressão da ascite em *Fundulus heteroclitus*.

4.6. Análise microbiológica do biofilme formado nos aquários

Durante o período de exposição hormonal, foi observado o desenvolvimento de uma turbidez esbranquiçada na água e o crescimento de um biofilme espesso e gelatinoso de mesma cor nas paredes internas do aquário, nas pedras de aeração e nas mangueiras em todos os experimentos, com exceção do tratamento 03.C- do Experimento 03.

O resultado da análise microbiológica (TABELA 22) mostra que as bactérias do biofilme formam uma comunidade semelhante a microbiota da água. Provavelmente, os iniciadores dessa comunidade sejam espécies de *Bacillus* esporogênicos, que produzem substâncias exopolissacarídicas. Estes microrganismos esporulam e resistem aos processos de desinfecção, voltando à forma vegetativa quando as condições são favoráveis.

A presença dessas substâncias exopolissacarídicas produzidas por esta comunidade microbiológica tornou impossível realizar as análises para determinação das concentrações hormonais durante a exposição hormonal dos peixes, devido à colmatação do filtro de fibra de vidro (porosidade de 0,45 µm) utilizados na fase de filtração para a reparação das amostras.

Tabela 22 – Caracterização e identificação dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostra de água e biofilme em sistema de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Origem da amostra	Morfologia	Gram	Identificação
Água	Cocos	+	Filo Firmicutes
Água	Bastonete	+	Filo Firmicutes
Água	Bastonetes	-	Filo Proteobacteria
Biofilme	Cocos	+	Filo Firmicutes
Biofilme	Bastonetes*	+	<i>Bacillus</i> sp
Biofilme	Bastonetes	-	Filo Proteobacteria

* Esporulando

Fonte: Autor (2020).

Para que haja um eficiente crescimento bacteriano é necessário, dentre outros compostos, uma proporção adequada entre carbono e nitrogênio (C:N) da ordem de 15:1 (AVNIMELECH, 2014). Em sistemas de criação de organismos aquáticos existe grande aporte de nitrogênio, principalmente nas formas de amônia, nitrito e nitrato, por meio da excreção dos animais, da decomposição das fezes, da ração não consumida e do ciclo de transformação do nitrogênio (SÁ, 2012). Desta forma o carbono torna-se, quase sempre, o fator limitante ao desenvolvimento desse micro-organismos (EMERENCIANO; GAXIOTA; CUZON, 2013).

O aumento da relação C:N com a adição de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$; utilizado como solvente para E2 e EE2 no presente estudo) propiciou o desenvolvimento da comunidade bacteriana especificada na Tabela 22. Entretanto, o desenvolvimento dessas bactérias parece não ter afetado a qualidade da água, bem como o desempenho zootécnico das tilápia do Nilo conforme pode ser observado nos dados apresentados no Experimento 03 (TABELAS 12 e 17, respectivamente), quando comparados os tratamentos 03.C+ (controle positivo, com adição de etanol) e 03.C- (controle negativo, sem adição de etanol).

5 CONCLUSÕES

Diante do acima exposto pode-se concluir que concentrações de 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol de 250 ng L^{-1} até 1.000 ng L^{-1} são capazes de produzir indivíduos intersexo e causaram prejuízos zootécnicos na tilápia do Nilo com a diminuição significativa do fator de condição na medida em que as concentrações passaram de 250 ng L^{-1} , para 500 ng L^{-1} e 1.000 ng L^{-1} . Além disto, estas concentrações também foram capazes de induzir o desenvolvimento de anomalias morfológicas sem que houvesse diferença significativa entre as concentrações avaliadas.

Foi possível constatar também que as concentrações de 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol da ordem de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ se mostram letais para larvas de tilápia do Nilo, não apresentando efeito algum sobre o tempo de incubação e na porcentagem de eclosão das larvas. Observou-se também que tais concentrações resultaram em anomalias morfológicas e prejuízos no desenvolvimento.

A exposição por 28 dias a uma concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol ocasionou uma pequena quantidade de indivíduos intersexo em tilápia do Nilo, mas, por outro lado, gerou populações quase totalmente femininas nos tratamentos hormonais. Foi possível concluir também, por meio da implementação de um controle negativo (sem adição de etanol) que o desenvolvimento de bactérias heterotróficas nas unidades experimentais foi devido a uma fonte extra de carbono e que o desenvolvimento de tais micro-organismos não afetou a qualidade da água, bem como o desempenho zootécnico dos peixes. A concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ também gerou desenvolvimento de anomalias morfológicas sem que houvesse diferença significativa entre E2 e EE2.

A variação do tempo de exposição da tilápia do Nilo aos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol entre 1, 2, 3 e 4 semanas mantendo-se a concentração de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ resultou no aparecimento de indivíduos intersexo e no desenvolvimento de anomalias morfológicas independentemente do tempo de exposição.

REFERÊNCIAS

- ADEOGUN, A. O. *et al.* Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonado-histopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 174, p.10-21, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.002>.
- ANADU, D.I., SCOTT, G.I., FULTON, M. H.. Toxicity of DDT to the different life stages of the mummichog *Fundulus heteroclitus* (Wabum). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 63, n. 2, p. 181–187, 1999.
- ANDERSEN, L. *et al.* Zebrafish *Danio rerio* and roach *Rutilus*: two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals? **Aquatic Ecosystem Health & Management**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.275-282, set. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/146349801753509177>.
- AQUINO, S. F. de; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. de L.. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgotos: revisão de literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p.187-204, 2013.
- AQUINO, M. D. de; GRADVOHL, S. T. S.; SANTOS, E. S. dos. Reúso em piscicultura. *In*: MOTA, S.; AQUINO, M. D. de; SANTOS, A. B. dos (Org.). **Reúso de água em irrigação e piscicultura**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/centro de Tecnologia, 2007. Cap. 6. p. 149-174.
- ARANA, L. V. **Princípios Químicos de Qualidade de Água em Aquicultura**: uma revisão para peixes e camarões. 2. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 231 p.
- ARMOUR, K. J. *et al.* Estrogen receptor mRNA in mineralized tissues of rainbow trout: calcium mobilization by estrogen. **Febs Letters**, [s.l.], v. 411, n. 1, p.145-148, 7 jul. 1997. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00680-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00680-7).
- AVNIMELECH, Y.. Produção de tilápia com uso de tecnologia de bioflocos (BFT). **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 142, p.58-63, 2014.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Manual do Programa BioEstat. Belém, 2007. 339 p.
- AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of the Thermal Biology**, v. 33, n. 2, p. 98-105, 2008.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BASTOS, R. K. X., *et al.* Utilização de esgotos sanitários em piscicultura. *In*: BASTOS, R. K. X.. **Utilização de esgotos tratados em fertirrigação, hidroponia e piscicultura**. Projeto PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, 2003. p. 247-223.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.. Normas e critérios de qualidade para reúso da água. In: FLORENCIO, L.; BASTOS, R. K. X.; AISSE, M. M. (Org.). **Reúso das águas de esgoto sanitário, inclusive desenvolvimento de tecnologias de tratamento para este fim**. Recife: ProSab, 2006. Cap. 2. p. 19-64.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651- 666, 2007.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**. IWA Publishing. New York: Lewis Publishers, 2003. 310 p.

BORYSKO, L; ROSS, P. M. Adult exposure to the synthetic hormone 17 α -ethynylestradiol affects offspring of the gastropods *Nassarius burchardi* and *Nassarius jonassii*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 103, p. 91-100, 2014.

BOUDREAU, M. *et al.* Utility of morphological abnormalities during early-life development of the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*, as an indicator of estrogenic and antiestrogenic endocrine disruption. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 23, n. 2, p.415-425, 2004.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Resolução Conama**. Brasília, 17 mar. 2005

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Resolução Conama**. Brasília, 13 maio 2011a.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Portaria do Ministério da Saúde**. Brasília, 12 dezembro 2011b.

BUARQUE, P. M. C. **Avaliação da remoção de micropoluentes emergentes e nitrogênio em sistemas anaeróbios e microaeróbios seguidos de filtros biológicos percoladores sujeitos à aeração natural e forçada**. 2017. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Civil - Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CAMPANHA, M. B. *et al.*. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, p. 7936–7947, 2015.

CHEN, P. J. *et al.* Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant concentrations in water following UV/H₂O₂ oxidation. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 376, n. 1-3, p.18-26, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.051>.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Community strategy for endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife**. Brussels, 1999.

CRAGO, J. *et al.*. Exploring the impact of two separate mixtures of pesticide and surfactants on estrogenic activity in male fathead minnows and rainbow trout, **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 362-370, 2015.

CYRINO, J. E. P. *et al.* **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. 533 p.

CZARNY, K; *et al.*. The impact of estrogens on aquatic organisms and methods for their determination, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1-55, 2017.

Da CUÑA, R. H. *et al.* Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 187, p. 74-80, 2016.

DAMMANN, A. A. *et al.*. Comparing biological effects and potencies of estrone and 17 β -estradiol in mature fathead minnows, *Pimephales promelas*. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 559–568, 2011.

DESBROW, C. *et al.*. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent-1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 1549-1558, 1998.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3/4, p. 191-394, 2002.

DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed., Washington: Ed. APHA, 2001. p.676.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**, [s.l.], p.301-328, 30 abr. 2013. InTech.
<http://dx.doi.org/10.5772/53902>.

EUROPEAN COMMISSION. **Directive of the European Parliament of the Council, amending directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy**. Brussels, 2012.

FAO (Roma). **The State of World Fisheries and Aquacultura 2018**: Meeting the sustainable development goals. 2018. Disponível em:
<<http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

FERREIRA, A. P. Endocrine disruptors in sludge wastewater treatment plants: environmental complications. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 307-316, 2013.

FONTENELE, R. M. M.; SANTOS, E. S. dos; MOTA, S.. Índice de rigor mortis de tilápia do Nilo abatidas de diferentes formas após cultivo em esgoto doméstico tratado. **Conexões, Ciência e Tecnologia**, Fortaleza, v. 7, n. 2, p.61-72, 2013.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C.; PATIÑO, R.. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleost. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Phylogeny-Reproductive System-Viviparity-Spermatozoa**. Enfield: Science Publishers, 2002. p. 25-84.

GUERRERO, R. D.. Use of Androgens for the Production of All-Male Tilapia aurea (Steindachner). **Transactions Of The American Fisheries Society**, [s.l.], v. 104, n. 2, p.342-348, abr. 1975. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8659\(1975\)1042.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8659(1975)1042.0.co;2).

GURR C. J.; REINHARD M. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 2872-2876, 2006.

HASSELL, K. *et al.* No evidence of exposure to environmental estrogens in two feral fish species sampled from the Yarra River, Australia: a comparison with Northern Hemisphere studies. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 131, p.104-117, set. 2016. Elsevier BV. <Http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.004>.

HU, Y. *et al.* Antagonistic effects of a mixture of low-dose nonylphenol and di-n-butyl phthalate (monobutyl phthalate) on the Sertoli cells and serum reproductive hormones in prepubertal male rats *in vitro* and *in vivo*. **Plos One**, p.1-9, 2014.

HUANG, G. Y. *et al.* Feminization and masculinization of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) observed in rivers impacted by municipal wastewaters. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-11, 15 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20884>.

JANICKI, T.; KRUPINSKI, M.; DLUGONSKI, J. Degradations and toxicity reductions of the endocrine disruptor nonylphenol, 4-tert-octylphenol and cumylphenol by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 223-229, 2016.

JOBLING, S. *et al.* Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science and Technology**, v. 32, 1998.

JOHNS, S. M. *et al.* Effects of estrogens and antiestrogens on gene expression of fathead minnow (*Pimephales promelas*) early life stages. **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.195-206, 17 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20545>.

JORDAN, J. *et al.* Environmental contaminant mixtures at ambient concentrations invoke a metabolic stress response in goldfish not predicted from exposure to individual compounds alone. **Journal of Proteome Research**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.1133-1143, 29 dez. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/pr200840b>.

KOGER, C. S.; TEH, S. J.; HINTON, D. E. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol or testosterone. **Marine Environmental Research**, [s.l.], v. 50, n. 1-5, p.201-206, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-1136\(00\)00068-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-1136(00)00068-4).

KUBITZA, F.. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p.25-35, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2. ed. Jundiaí: F. Kubitza, 2011. 316 p.

LANGE R. *et al.*. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 20, p. 1216–27, 2001.

LAURENSEN, J. P. *et al.*. Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. **The APPS Journal**, v. 16, n. 2, p 299-310, 2014.

LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, n. 2, p. 201-219, 1951.

LEI, B. *et al.*. Long-term exposure investigating the estrogenic potency of estriol in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 160, p. 86-92, 2014.

LEKANG, O. I.. **Aquaculture Engineering**. 2nd ed. Drobakveien: Wiley-blackwell, 2013. 415 p.

LIMA, D. R. S. *et al.* Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.1043-1054, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522017165207>.

LINTELMANN, J. *et al.*. Endocrine disruptors in the environment. **Pure Applied Chemistry**, v. 75, p. 631-681, 2003.

MACHADO, K. S. *et al.*. Occurrence of female sexual hormones in the Iguazu river basin, Curitiba. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, p. 421–427, 2014.

MAGERHANS, A.; MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGENSCHWARK, G. Effect of rearing temperatures post hatching on sex ratios of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. **Aquaculture**, v. 294, n. 1/2, p. 25-29, 2009.

MANAHAN, S. E. **Toxicological chemistry and biochemistry**. 3rd ed. New York: CRC Press LLC, 2003. 424 p.

MEIJIDE, F.J. *et al.* Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol and 4-tert-octylphenol on early life stages of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 82–90, 2016.

MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? **Science of the Total Environment**, v. 343, p. 1–34, 2005

MOTA, S. *et al.* Utilização de nutrientes de esgoto tratado na piscicultura. In: MOTA, S.; VON SPERLING, M.. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. Rio de Janeiro: Abes, 2009. Cap. 5. p. 147-173.

MOTA, F. S. B.; AQUINO, M. D. de; SANTOS, A. B. dos. Reúso de água: conceitos; importância; tipos. In: MOTA, F. S. B.; AQUINO, M. D. de; SANTOS, A. B. dos (Org.). **Reúso de água em irrigação e piscicultura**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/centro de Tecnologia, 2007. Cap. 1. p. 21-39.

NAKADA, N. *et al.* Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2807-2815, 2004.

NAKAMURA, M. *et al.* Gonadal sex differentiation in teleost fish. **The Journal of Experimental Zoology**, [s.l.], v. 281, n. 5, p.362-372, 1 ago. 1998. Wiley.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19980801\)281:53.0.co;2-m](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19980801)281:53.0.co;2-m).

NIEMUTH, N. J. *et al.* Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.291-296, 31 dez. 2014. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/etc.2793>.

NIEMUTH, N. J.; KLAPER, R. D. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. **Chemosphere**, v. 135, p. 38-45, 2015.

OURSLEER, M. J.. Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.125-140, 1998. Begell House.
<http://dx.doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v8.i2.20>.

PARROTT, J.L., WOOD, C. S.. Fathead minnow lifecycle tests for detection of endocrine-disrupting substances in effluents. **Water Quality Research Journal of Canada**, v.37, p.651–667. 2002

PASSOS NETO, O. P., *et al.* Reprodução e proporção sexual da tilápia vermelha, variedade *Saint Peter*, em diferentes salinidades. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 310-318. 2015.

PATYNA, P. J. *et al.* A proposed multigeneration protocol for japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 233, n. 1-3, p.211-220, ago. 1999. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00227-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00227-2).

PAWLOWSKI, S *et al.* Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.330-345, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.07.019>.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA (São Paulo). **Anuários Peixe BR da Piscicultura**. 2019. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/>>. Acesso em: 02 dez. 2019.

PEPLING, M. E.; CUEVAS, M. de; SPRADLING, A. C. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development?. **Trends In Cell Biology**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.257-262, jul. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924\(99\)01594-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924(99)01594-9).

PESSOA, G. de P. *et al.*. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgoto. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.

PHILLIPS, B.; HARRISON, P. Overview of the endocrine disruptors issue. *In*: HESTER, R. E.; HARRISON, R. M. **Endocrine disruptors chemicals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.

PHUGE, S. K.; GRAMAPUROHIT, N. P. Sex hormones alter sex ratios in the Indian skipper frog, *Euphyctis cyanophlyctis*: determining sensitive stages for gonadal sex reversal. **General and Comparative Endocrinology**, v. 220, p. 70–77, 2015.

QUAGIO-GRASSIOTTO, D. D.; WILDNER, R. I.. Gametogênese de peixe: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p.181-191, 2013.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. *et al.* A new approach to oocyte development in Ostariophysii. **Animal Biology Reproduction**, v. 6, p.269-279, 2009.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. *et al.* Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysii). **Journal Of Morphology**, [s.l.], v. 272, n. 11, p.1290-1306, 31 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.10981>.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RIBEIRO, M. A. G.. Reversão sexual em tilápia. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 37, p.20-27, 1996.

RODGERS-GRAY, T. P. *et al.*. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in duct development. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 462-470, 2001

ROGERS, J. A.; METZ, L.; YONG, V. W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. **Molecular Immunology**, v. 53, p. 421-430, 2013.

ROUGEOT, C., *et al.*. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 276, n. 1/4, p. 205-208, 2008.

SÁ, M. V. C. **Limnicultura**: limnologia para aquicultura. Fortaleza: Editora da UFC, 2012. 218 p.

SANTOS, E. S. dos. **Cultivo do peixe ornamental molinélia como alternativa para o uso de esgoto tratado na piscicultura**. 2012. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Civil - Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SANTOS, E. S. dos *et al.* Crescimento e qualidade dos alevinos de tilápia do Nilo produzidos em esgoto doméstico tratado. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, n. 2, p.232-239, 2009a.

SANTOS, E. S. dos *et al.* Cultivo de tilápia do Nilo em esgoto doméstico tratado, com diferentes taxas de alimentação. **Revista Dae**, [s.l.], v. 57, n. 180, p.4-11, 2009b. Revista DAE. <http://dx.doi.org/10.4322/dae.2014.029>.

SANTOS, E. S. dos *et al.* Avaliação técnica econômica de tilápias cultivadas com diferentes taxas de alimentação em esgoto doméstico tratado. **Conexões, Ciência e Tecnologia**, Fortaleza, v. 9, n. 3, p.34-40, 2015.

SANTOS, A. B. dos; SILVA, M. E. R da. Tecnologias de tratamento de esgoto *In*: MOTA, S.; AQUINO, M. D. de; SANTOS, A. B. dos (Org.). **Reúso de água em irrigação e piscicultura**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/centro de Tecnologia, 2007. Cap. 2. p. 43-70.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 15, n. 8. p. 1-7, 2014.

SCHULZ, R. W. *et al.* Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 165, n. 3, p.390-411, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>.

SNYDER, S. A. Occurrence, treatment and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. **Ozone-Sci. Eng.**, v. 30, p. 65-69, 2008.

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY. **Endocrine disruptors and modulators**. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) 2000. pp. 1 – 4.

SOHN, J. *et al.* Alteration of sex hormone levels and steroidogenic pathway by several low molecular weight phthalates and their metabolites in male zebra fish (*Danio rerio*) and/or human adrenal cell (H295R) line. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 45-54, 2016.

SORNALINGAM, K.; MCDONAGH, A.; ZHOU, J. L. Photodegradation of estrogenic endocrine disrupting steroidal hormones in aqueous system: process and future challenges. **Science of the Total Environment**, v. 550, p. 209-224, 2016.

SOUZA, C. L. de *et al.* Aspectos qualitativos de correntes de esgoto segregadas e não segregadas. In: SANTOS, A. B. dos (Org.). **Tratamento e Gerenciamento de Subprodutos de Correntes de Esgotos Segregadas e Não Segregadas em Empreendimentos Habitacionais**. Fortaleza: Imprece, 2019. Cap. 3. p. 118-218.

SOWERS, A. D. *et al.* Developmental effects of a municipal wastewater effluent on two generations of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 173-181, 2009.

STALEY, J. T. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. v. 2, part B, 1388p.

TACHIBANA, L. *et al.* Densidade de estocagem de pós larvas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 483-488, 2008.

TETREAUULT, G. R. *et al.* Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. **Aquatic Toxicology**, v. 104, p. 278–290, 2011.

TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M.; PIEDRAHITA, R. H. **Acuicultura em Sistemas de Recirculación**. Ithaca: NRACE, 2009. 959 p.

TOFT, G.; BAATRUP, E.. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17 β -estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.228–237, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00138-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00138-0).

TOLLEFSEN, K. E.; MATHISEN, R.; STENERSEN, J.. Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 126, n. 1, p.14-22, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/gcen.2001.7743>.

TOLOSA, E. M. C. *et al.* **Manual de técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Artmed, cap. 3, p. 69 -70, cap. 14, p. 400 -403, 2012.

TURRA, E. M. *et al.* Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p.21-28, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis.** Washington, 1998.

URUSHITANI, H. *et al.* Early estrogen exposure induces abnormal development of *Fundulus heteroclitus*. **Journal Of Experimental Zoology**, [s.l.], v. 293, n. 7, p.693-702, 29 out. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.10161>.

VADJA, A. M. *et al.* Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 103, p. 213-221, 2011.

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

VAN AERLE, R. *et al.* Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life-stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.423-434, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1021053217513>.

VIDAL, C. B. **Desreguladores endócrinos presentes em matrizes ambientais: análise por SPE-HPLC e remoção com argila pilarizada.** 2015. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Civil - Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

VIGANÒ, L. *et al.* First observation on intersex cyprinids in the Po River (Italy). **Science of the Total Environment**, v. 269, p. 189-194, 2001.

VIRKUTYTE, J.; ROKHINA, E.; JEGATHEESAN, V. Optimisation of Electro-Fenton denitrification of a model wastewater using a response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1440-1446, 2010.

VOLKOVA, K. *et al.* Transgenerational effects of 17 α -ethinyl estradiol on anxiety behavior in the guppy, *Poecilia reticulata*. **General and Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 223, p.66-72, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.027>.

VON WESTERNHAGEN, H.. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish Physiology: The physiology of developing fish, Part A, Eggs and larvae.** San Diego: Academic, 1988. p. 253-346.

VUTUKURU, S. S. *et al.* Endocrine disruption by bisphenol A, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ether, in zebra fish (*Danio rerio*) model: an in silico approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 1541-1555, 2016.

WEIS, J. S.; WEIS, P.. Effects of environmental pollutants on early fish development. **Reviews In Aquatic Science**, v. 1, p.45-73, 1989.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Volume 3. Wastewater and excreta use in aquaculture. Geneva: World Health Organization, 2006.

WOODLING, J. D., *et al.*. Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 144, p. 10–15, 2006.

WOODS, M.; KUMAR, A. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 2620–2627, 2011.

ZAH, J. *et al.*. Assessment of 17 α -ethynylestradiol effects and underlying mechanisms in a continuous, multigeneration exposure of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, p. 298-308, 2008.

ZHANG, Y. *et al.*. Biological impact on environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 809-824, 2016.

ZILLIOUX, E. J. *et al.* The sheepshead minnow as an in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17 α -ethynylestradiol. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 9, p.1968-1978, set. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620200915>.

ZIMMERMANN, S.. Incubação artificial: técnica que permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p.25-31, 1999.