

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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO HORMONAL NA
CARÇA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*) APÓS REVERSÃO SEXUAL**

**Munir Francisco Zanardi
Zootecnista**

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2007**

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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO HORMONAL NA
CARÇA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*) APÓS REVERSÃO SEXUAL**

Munir Francisco Zanardi

Orientadora: Prof^a. Dra. Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Aquicultura da UNESP campus de Jaboticabal - CAUNESP, com parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura – Área de Concentração em Aquicultura.

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2007**

DADOS CURRICULARES

Munir Francisco Zanardi nasceu em Lucélia, SP no dia 17 de janeiro de 1982. E 1999 concluiu o segundo grau no colégio Objetivo, obteve graduação em Zootecnia pela Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista-ESAPP de 2000 até 2004. Iniciou o Mestrado em Aqüicultura no Centro de Aqüicultura da Unesp - CAUNESP, em Jaboticabal, em março de 2006. Neste período desenvolveu experimentos com bolsa CAPES, ministrou palestra (Patologia de peixes, Legislação de Tanque-rede, Perspectiva Mundial da Tilapicultura, Identificação das Gônadas e Sexagem), apresentou trabalhos em congressos e reuniões científicas. A principal espécie em conhecimento é a tilápia, na área de reprodução, métodos de reversão sexual e uso de hormônio masculinizante.

EPIGRAFE

“Não ser um produtor racional quando se usa drogas na aquicultura é o mesmo que não ter amor a humanidade, pensando apenas na lucratividade.”

Munir Francisco Zanardi

Com o crescimento populacional no século XX e a globalização dos conhecimentos, cabe aos pesquisadores da área de produção animal a responsabilidade pela principal cadeia nutricional humana e pela produção de alimentos de boa qualidade, sem que se deixe de dar atenção à saúde da população, pensando apenas na produtividade. Alimentos são selecionados atualmente, nos pratos, pelos que têm muita preocupação com a saúde. Um desses alimentos são os peixes, que já fazem parte do prato de muitas pessoas. Seguindo a demanda do mercado, a produção aquícolas cresce a cada ano, substituindo outros alimentos nocivos à saúde humana. No final do século XX, a espécie em destaque no mercado produtivo foi a Tilápia pela sua precocidade reprodutiva. É um peixe de que se aproveita tudo no seu processamento. É muito cobiçado nas mesas de muita gente, por possuir um filé nobre e muito saudável. Especialmente os machos têm maior precocidade produtiva do que as fêmeas, devido a fatores reprodutivos. Piscicultores usam andrógeno para masculinizar as Tilápias, sendo o mais utilizado o hormônio testosterona. Atualmente, a técnica muito usada é a mistura desse hormônio na ração. Os produtores, pesquisadores e consumidores vêm tendo uma grande preocupação

com o risco à saúde que esse hormônio, devido aos resíduos no filé e no ambiente aquático...

DEDICO:

À minha querida namorada
Nádia,
pela compreensão, força, afeto, alegria e
Amor!

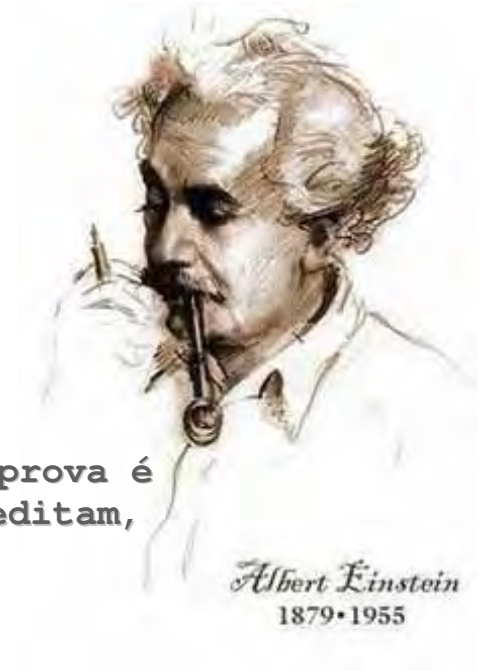
Mesmo que o ouro perca seu valor, mesmo
que o sol pare de brilhar. Por toda minha
vida eu vou te amar...

(sem autor)

OFEREÇO:

Aos meus pais Luiz Antônio e Isabel,
que me ajudaram muito nessa batalha
e incentivaram-me nos estudos,
mesmo estando longe.

Por ensinar-me que o que importa é ser
feliz
fazendo o que se gosta, pensando sempre
na possibilidade de conseguir.



"Para aqueles que acreditam, nenhuma prova é necessária; para aqueles que não acreditam, nenhuma prova é suficiente."

"O conhecimento amplia a vida. Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede desfrutar."

Da Sabedoria Logosófica

"Tudo o que se acha oculto será descoberto um dia e o que o homem ainda não pode compreender lhe será sucessivamente desvendado, em mundos mais adiantados, quando se houver purificado."

Allan Kardec

"Estudai a Verdade
meus irmãos, mas,
sobretudo, examinai o
vosso amor;
não priorizeis o
saber,
em detrimento do
sentimento..."

Carlos A. Bacelli / Inácio
Ferreira

Ao Mestre:

"Homem algum poderá
revelar-nos senão o que já
está meio adormecido na
aurora do seu
conhecimento. O mestre que
caminha à sombra do tempo,
rodeado de discípulos, não
dá de sua sabedoria, mais
sim de sua fé e ternura. Se
ele for verdadeiro sábio,
não nos convidará a entrar
na mansão do seu saber, mas
nos conduzirá antes ao
limiar de vossa própria
mente."

Gibran Khalil Gibran

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein que me recebeu como orientado, apoiando-me nessa longa e desgastante caminhada repleta de novas idéias, projetos e propostas, fazendo com que me dedicasse integralmente aos estudos. Por me ajudar nos momentos difíceis como uma mãe para mim. Despeço-me então deste mestrado com um rico aprendizado, mesmo dando continuidade aos estudos, e levo comigo conhecimentos que serão usados para ensinar pessoas, assim como eu aprendi.

À Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati, do Centro de Aqüicultura da UNESP e Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP de Jaboticabal, agradeço por me co-orientar e por me direcionar para a solução de problemas, principalmente nos momentos em que me senti frágil e muitas vezes perdido devido à inexperiência. Mesmo com tantos compromissos, lá estava ela pra me atender.

À Michele Fagundes (aluna do curso de pós-graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP) agradeço pela preciosa ajuda durante a parte de extração de hormônio, pela paciência e cumplicidade demonstrada quando os resultados não estavam exatamente como esperávamos, e também por prestar essa ajuda, independentemente do horário.

Ao Richard Philip Brinn agradeço pelas explicações sobre a metodologia de extração de hormônio e, principalmente pela grande atenção demonstrada, reforçando a idéia de que a distância não é obstáculo quando se deseja novos conhecimentos, mesmo estando em Miami.

À Bruna Furlan Polegato (aluna da pós-graduação da FCAV-UNESP) agradeço por prestar esclarecimentos e ajudar na metodologia de leitura do hormônio no ELISA.

Ao José Mauricio Barbanti Duarte (Vice-chairman da Deer Specialist Group / IUCN, Professor Assistente Doutor da Universidade Estadual Paulista), agradeço por prestar-se ajuda e, principalmente, por indicar pessoas certas que poderiam solucionar problemas durante essa fase final.

Ao Ricardo José Garcia Pereira (doutorando junto ao Departamento de Reprodução Animal FCAVJ-UNESP) agradeço pelo dicas sobre a metodologia de extração e pela cautela de poder me atender a qualquer momento, sempre com intuito de me ajudar.

Ao Ronaldo Gonçalves Morato, PhD (Chefe de Centro Especializado Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Predadores Naturais-IBAMA) agradeço por prestar informações valiosas sobre metodologia e leitura de hormônio em tecido.

Ao Dr. André Monteiro da Rocha (Coordenador Técnico-científico Huntington Medicina Reprodutiva) agradeço por contribuir com a metodologia que serviu para que eu aprendesse muito, mesmo que não chegamos até ao final desse processo. Agradeço ainda sua grandiosa atenção e contribuição com novos conhecimentos.

Ao Dr. João Alberto Negrão (Professor Doutor da e Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e da Universidade de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga, Departamento de Ciências Básicas) agradeço pela indispensável ajuda com a leitura do hormônio no ELISA, pela compreensão e por ceder o laboratório para a realização dos testes iniciais.

Ao Dr. Euclides Braga Malheiros (FCAV- UNESP - Departamento de Ciências Exatas) agradeço por fornecer seus conhecimentos em estatística e assim me instruindo durante os resultados da pesquisa.

À Dr^a. Sandra Zago Falone (Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos) agradeço por me auxiliar de forma atenciosa no laboratório onde foram realizados os teste iniciais.

Ao Dr. Mansour Ebrahimi (Endocrine Research Group, Department of Physiology University of Qom, QOM Iran) agradeço por, mesmo longe, mostrar-se prestativo, esclarecendo dúvidas que surgiram com relação ao experimento.

À Dr^a. Sônia Maria Rolim Rosa Lima (Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia) agradeço por contribuir com novos conhecimentos, enviando-me metodologia que, infelizmente, não pude testar devido a falta de equipamentos.

À Marli Mucio (Assistente Comercial da Interteck Internacional Importação Exportação) agradeço por fornecer o kit ELISA com preço mais acessível e por compreender nossa pressa na entrega de tal produto.

À Damares, pessoa maravilhosa agradeço muito a atenção. Embora muito atarefada, nunca deixou de me atender e auxiliar no laboratório.

Ao Leo (colômbia) e Silvinha agradeço a prontidão em ajudar-me durante a fase de análise de água.

À Thalita agradeço pelo auxílio no processo de extração, pela ajuda no laboratório e por prestar sua amizade nos momentos difíceis.

Ao Marcio Alves dos Santos agradeço, principalmente, pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo que estive no laboratório de tilapicultura, por prestar-me ajuda no período experimental deste trabalho e pelas conversas que tornaram esse período mais divertido e descontraído.

Ao Marcio Aquio Hoshiba sou grato pela amizade, por me receber em sua casa no início dessa caminhada e sempre me apoiando, sendo uma das pessoas que me incentivaram a fazer o mestrado e pelas instruções no laboratório de fisiologia.

Ao Luiz Felipe Monteiro da Rosa agradeço pelo companheirismo e pela ajuda prestada durante o período experimental.

À Dr^a. Maria Isabel Mataqueiro (Laboratório de Farmacologia da FCAV) agradeço pela atenção dispensada esclarecendo dúvidas na área de bioquímica, por ajudar no método de extração e pelos momentos de distração e alegria.

Ao Luis Gustavo Giannecchini agradeço por toda compreensão, amizade, descontração e pela ajuda a produção do contexto.

À Banca de qualificação, constituída pelo Prof. Dr. João Batista e Prof^a. Dr^a. Marta de Stéfani, agradeço, pelas correções e conselhos para melhora deste trabalho.

Aos meus amigos de serviço, Erico, Rodrigo (Cabeção), Camilo Pietro, Valdecir, Mauricio, Marcio Perereca, Fernanda Valentin, Antonio, Luiz Otavio, Junior, Ana Laura, Natario (Português), Janessa, Elis, Sr. Mauro, Verinha, Dona Ana, Fátima, Eliana, Sueli, Paula, Rafael, Tumor, Mônica, Haluko, Laurindo, Guilherme, Roberson, Fabiana, Marina, Mari, Case, Bruno, Nilson, Casaca, Ayroza, Tamassia, André Camargo e a todos que estão de verdade no meu coração agradeço pela amizade, pelas conversas, pelas brincadeiras e pelos momentos de diversão que tornaram essa fase menos desgastante.

Aos meus sogros, Sr^a. Nadir e Sr. Cide Vasconcelos, agradeço muito pela compreensão durante essa fase por que passei, sempre respeitando o que sinto por essa pessoa maravilhosa que está ao meu lado em todos os momentos difíceis, dispondo sempre a sua presença ao meu lado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro durante esse período em que passei dentro do mestrado.

E agradeço principalmente, a Ele, que é a razão de tudo, a base de nossas vidas e a luz do nosso caminho. Não o vemos, mas podemos sentir e ver o que ele já fez por nós. Mesmo sempre pedindo por Ele...

Obrigado meu Deus.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1. Introdução	1
1.1. <i>Objetivo Geral</i>	3
1.2. <i>Objetivos Específicos</i>	3
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. <i>Características da Espécie</i>	4
2.2. <i>Métodos de Reversão</i>	4
2.2.1. <i>Hormônio na Ração</i>	5
2.2.2. <i>Banho de Imersão</i>	6
2.2.3. <i>Temperatura</i>	7
2.3. <i>Resíduos Hormonais e Metodologia</i>	8
3. Material e Métodos	12
3.1. <i>Condições Experimental e Local</i>	12
3.2. <i>Condições Ambientais e Material Biológico</i>	12
3.3. <i>Tratamentos</i>	16
3.3.1. <i>Banho de Imersão (BI)</i>	16
3.3.2. <i>Ração com Hormônio (RH)</i>	16
3.3.3. <i>Ração sem Hormônio – Controle (RS)</i>	17
3.4. <i>Manejo e Equipamentos Experimentais</i>	17
3.5. <i>Determinação da Eficiência da Reversão Sexual</i>	18
3.6. <i>Determinação da Testosterona em Larvas e Juvenis</i>	19
3.6.1. <i>Coletas de Larvas e Juvenis</i>	19
3.6.2. <i>Metodologia de Extração</i>	20
3.6.3. <i>Princípio do Teste ELISA</i>	24
3.6.3.1. <i>Procedimento da Leitura no ELISA</i>	25
3.6.3.2. <i>Determinação da Porcentagem de Recuperação Hormonal</i>	27
3.6.4. <i>Transformação dos Valores da Concentração de testosterona</i>	27
3.6.5. <i>Ensaio e Recuperação da Testosterona</i>	28

	II
3.6.5.1. <i>Interensaio</i>	28
3.6.5.2. <i>Intra-ensaio</i>	28
3.6.5.3. <i>Recuperação da Testosterona pelo Método de Extração</i>	29
3.7. <i>Parâmetros Estudados</i>	30
3.8. <i>Análise Estatística</i>	31
4. Resultados e Discussão	32
4.1. <i>Parâmetros Zootécnicos</i>	32
4.2. <i>Porcentagem de Machos</i>	36
4.3. <i>Concentração da Testosterona</i>	37
6. Conclusões	46
7. Referências	47
Anexo 1	64
Anexo 2	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Coleta de ovos da boca da tilápia do Nilo, através de contrafluxo no músculo da orofaringe.....	13
Figura 2. Incubadora artificial de tilápia, apresentando o copo cônico e a bandeja.....	13
Figura 3. Caixa com quatro aquários com capacidade de 20 L, em banho-maria, e as mangueiras de ar providas de pedra porosa.....	14
Figura 4. Aquários utilizados no banho de imersão, dentro da caixa em banho-maria, providos de soprador de ar.....	16
Figura 5. Caixa de 200 L no sistema de recirculação em que os peixes passaram um período de 60 dias após o final do tratamento.....	18
Figura 6. Peixes sacrificados após dosagem de 15 mg de benzocaina, figura a esquerda (A) e da direita (B), após corte ventral, retirou-se às vísceras e separou-se as gônadas como esta na figura.....	18
Figura 7. Gônada visualizada no microscópio ótico com objetiva 40x. Na imagem da esquerda (A) aparecem dois testículos, tecido conjuntivo denso (1) e os lóbulos seminíferos (2); a imagem da direita é um ovário com os ovócitos (3).....	19
Figura 8. Amostras coletados e congeladas a -20 °C e identificadas (material, tratamento, repetição e data) na figura da esquerda (A), e a direita (B), figura da amostra triturada em uma placa de Petri sobre uma camada de gelo.....	20
Figura 9. Amostrado um “pool” de 0,5 g da massa homogenia pesado em balança analítica.....	20
Figura 10. À esquerda (A) misturador e triturador Turex utilizado para as amostras e á direita (B) a figura do tubo após passar pelo Turex.....	21

- Figura 11.** *Tube com a alíquota (500 µL) do homogenado após acrescentar 3,5 mL de éter dietílico, figura da esquerda (A) e da direita (B) o misturador Vórtex..... 21*
- Figura 12.** *Centrífuga utilizada, figura (A), foi imergido o tubo em um recipiente contendo 100 g de gelo seco coberto com acetona, até que ocorra o congelamento da massa, figura (B) e após isso o éter não congela, assim entorna-se em outro tubo o sobrenadante, figura (C)..... 22*
- Figura 13.** *Capela com fluxo de ar com banho-maria em seu interior a uma temperatura de 37°C figura da esquerda (A) e da direita (B) lava-se a parede do tubo com um mL de éter, com o auxílio de um seringa e uma agulha descartável de 5 mL..... 23*
- Figura 14.** *Após evaporar em banho-maria observa-se que essa mancha amarelada é o lipídio, figura da esquerda (A) e da direita (B) adicionou-se 200 µL de PBSG..... 23*
- Figura 15.** *Sonicador, em que as amostras ficaram por 15 minutos, Figura da esquerda (A) e da direita (B), tubos com a solução final para realizou a leitura, e identificados..... 24*
- Figura 16.** *Placa com 96 poços, em que foi adicionado o conjugado com uma pipetador multicanais (8)..... 25*
- Figura 17.** *Incubadora de movimentos circulares e reajuste de temperatura, em que no caso 37°C, figura da à esquerda (A) e da direita (B) equipamento de lavagem da placa.. 26*
- Figura 18.** *Equipamento de leitura EIA, para placas com 96 poços..... 27*
- Figura 19.** *Curva da concentração de testosterona na carcaça de larvas e juvenis de tilápia do Nilo, no período inicial, no 30º, 37º, 40º, 45º, 60º e 90º dias após o início do experimento, nos tratamentos ração com hormônio (RH), banho de imersão (BI) e controle (RS) em nanograma (ng) do hormônio (MT) por grama (g) de carcaça de tilápia do Nilo. O valor do desvio padrão para cada curva de concentração dentro dos tratamentos (RH, BI, e RS) foram, respectivamente, 1,088, 0,899 e 0,577; e para o coeficiente de correlação foram, respectivamente, os seguintes: 0,849, 0,598 e 0,967.... 43*

LISTA DE TABELA

	Página
Tabela 1. <i>Peso (g) e número estimado de ovos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) utilizados no experimento.....</i>	14
Tabela 2. <i>Parâmetros físico-químicos da água (pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, alcalinidade, amônia, sólidos disponíveis totais - SDT, salinidade e temperatura média) dos aquários experimentais com larvas e alevinos de tilápia do Nilo.....</i>	15
Tabela 3. <i>Testes de hipóteses na análise de variância para as variáveis; comprimento (mm), peso (g) analisados no início, aos 30 e 90 dias e ganho de peso aos 30 e 90 dias após o início do experimento com larvas e juvenis de tilápia do Nilo.....</i>	33
Tabela 4. <i>Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas para as variáveis: crescimento (mm) e taxa de sobrevivência (%), aos 30 dias do experimento com larvas e juvenis de tilápia do Nilo para os tratamentos.....</i>	36
Tabela 5. <i>Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas para a variável porcentagem de machos (%), aos 90 dias do experimento, com juvenis de tilápia do Nilo nos três tratamentos.....</i>	37
Tabela 6. <i>Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas na variável; concentração de testosterona na carcaça ($ngT.g^{-1}$ carcaça) entre os tratamentos: banho de imersão (BI), ração com hormônio (RH) e ração sem hormônio (RS), com larvas e juvenis de tilápia do Nilo.....</i>	39
Tabela 7. <i>Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas na variável concentração de testosterona na carcaça ($ngT.g^{-1}$) dos peixes das amostragens, no início, 30, 37, 40, 45, 60 e 90 dias após o início do experimento, dentro de cada tratamento: banho de imersão (BI), ração com hormônio (RH) e ração sem hormônio (RH) em larvas e juvenis de tilápia do Nilo.....</i>	41

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO HORMONAL NA CARÇA DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) APÓS REVERSÃO SEXUAL

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da metiltestosterona adicionada na água de cultivo e na ração sobre a reversão sexual de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), bem como a presença do hormônio na larva e juvenil. O experimento foi conduzido no Laboratório de Tilapicultura do Centro de Aqüicultura da Unesp, campus de Jaboticabal. Um total de 1.500 larvas foram distribuídas em 15 aquários com volume de 15L (100 larvas cada), para aplicação dos tratamentos de reversão sexual: controle - RS, banho de imersão - BI (6 mg.L⁻¹) e alimentação com ração com hormônio – RH (60 mg.Kg⁻¹), com cinco repetições, imersos em caixas com 175 L (três aquários por caixa). As análises de água eram realizadas três vezes por semana, sendo monitoradas temperatura, pH, amônia, OD, alcalinidade, salinidade, sódio disponível na água e condutividade. As larvas e juvenis foram amostradas no tempo zero do início do experimento e aos 30, 37, 40, 45, 60 e 90 dias, sendo amostrados 0,5 grama de peixe por repetição para análise da testosterona na carcaça. Os peixes foram alimentados com ração suplementada com hormônio por 30 dias e em banho de imersão de 36 horas, nos dias 6 e 10 após início do experimento. As biometrias foram realizadas no início, 30 e 90 dias. Os parâmetros zootécnicos analisados foram: peso (g) e comprimento total (mm) ao início, 30 e 90 dias, ganho de peso (g) aos 30 e 90 dias, crescimento (mm), taxa de sobrevivência (%) aos 30 dias, ganho de peso individual (g.dia⁻¹) e porcentagem de macho aos 90 dias. Através das análises estatísticas observamos que houve diferença significativa do tratamento RH aos 90 dias, apresentado o maior comprimento (79,29 mm). Em relação ao peso, houve diferença apenas do tratamento BI, apresentando o maior peso aos 90 dias (8,69 g). Não houve diferença significativa para crescimento e taxa de sobrevivência. Observamos que para a taxa de masculinização, os tratamentos BI e RH (86,0 e 94,0 %) diferiram do controle. Por meio dos dados de concentração de testosterona, pudemos observar que os peixes que receberam hormônio (BI e RH) diferiram significativamente do controle, apresentando as médias de 1,8907, 2,1387

e $0,8080 \text{ ngT.g}^{-1}$ para os tratamentos BI, RH e RS respectivamente. Nos tempos de amostragem, em relação à concentração de testosterona, aos 40 dias, os peixes do tratamento RH diferiram significativamente dos outros tratamentos, apresentando a maior concentração da testosterona ($1,784 \text{ ngT.g}^{-1}$). Aos 45 e 90 dias a concentração de testosterona dos peixes do tratamento RH ($2,322$ e $2,812 \text{ ngT.g}^{-1}$, respectivamente), diferiram significativamente apenas do controle ($0,696$ e $1,206 \text{ ngT.g}^{-1}$). Aos 30 dias de experimento, houve um pico de testosterona no tratamento BI, enquanto que para RS, o pico aconteceu ao 37^o dia. Após os picos, os níveis diminuíram até o 40^o dia, recuperando em seguida, provavelmente devido ao início do processo de maturação sexual, influenciado pelo hormônio dos tratamentos.

Palavras-chave: metiltestosterona, masculinização, esteróides.

HORMONE RESIDUE DETERMINATION IN NILE TILAPIA CARCASS (*Oreochromis niloticus*) AFTER SEXUAL REVERSION

ABSTRACT

The present study evaluate the effect of metyltestosterone add in the farming water and in the ration during the sexual reversion of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the presence of the hormone in fries and juveniles. The experiment was conducted in Tilapia farming laboratory of the São Paulo State University Aquaculture Center, Jaboticabal. A total of 1,500 Nile tilapia fries were allotted to 15 L – aquarium (100 fries in each) to application of the sexual reversion treatments: control - RS, bath immersion – BI (6 mg.L⁻¹) and feeding with ration with hormone – RH (60 mg.Kg⁻¹), with five repetitions, immersed in 175 L boxes (3 aquarium in each box). Temperature, pH, ammonia, dissolved oxygen, alkalinity, salinity, disponibility of sodium in water and conductivity were analyzed three times in a week. The fries and juveniles were sampled in the beginning of the experiment, zero time, and in the days 30, 37, 40, 45, 60 e 90. Were sampled from each fish 0.5 gram to analyze testosterone in carcass. The fish were feed with supplementary ration with hormone during 30 days and took bath immersion for 36 hours, in days 6 and 10 after the beginning of the experiments. The biometrics were done in the beginning, 30 and 90 days. The evaluated parameters were: weight (g), total length (mm) in the beginning, 30 and 90 days; weight gain (g) in the days 30 and 90; growth (mm) and survival rate (%) in day 30; individual weight gain (g.dia⁻¹) and percentage of male in day 90. Statistical analyzes indicated differences in RH treatment in days 90, showing the largest length (79.29 mm). For the weight, differences were observed only in BI treatment, showing the most weight in days 90 (8.69g). Differences were not observed for growth and survival rate. For the male rate, treatments BI and RH (86 and 94 %) were different from RS. The dates of hormone concentration showed differences among control treatment and the treatments where the fishes received hormone (BI and RH) with the mean values: 1.8907 – BI, 2.1387 – RH and 0.8080 ngT.g⁻¹ - RS. For testosterone concentration, in days 40, the fishes of treatment RH were different from others treatments, showing the largest concentration of testosterone (1.784 ngT.g⁻¹). In days 45 and 90 the testosterone concentration of treatments RH (2.322 e 2.812 ngT.g⁻¹) was different from control treatment (0.696 e 1.206 ngT.g⁻¹). In days 30 the testosterone reached the peak in BI treatment. For treatment RS the testosterone reached the pike in days 37. After the pikes the level of

testosterone reduced till days 40, recovering after probably because of the beginning of maturation process, influenced by the hormone of the treatments.

Key-words: methyltestosterone, masculinization, steroids.



1. Introdução

A tilápia é nativa do Continente Africano, do Centro-Sul até o Norte da Síria, como Israel e Jordânia, difundida em vários países, assim como no Brasil, em 1971. É o peixe mais criado, perdendo apenas para a carpa. Entre as espécies mais produzidas, destacam-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a mossâmbica (*Oreochromis mossambicus*), a azul (*Oreochromis aureus*) e a hornorum (*Oreochromis hornorum*) (Lovshin, 1997; Popma e Phelps, 1998).

A tilápia tem grande precocidade reprodutiva, principalmente a do Nilo. Isso vem sendo um problema na piscicultura, causando uma superpopulação e, conseqüentemente, baixo desenvolvimento na produção. Para o controle da superpopulação, alguns métodos são empregados, como a sexagem por hibridação (Wolfarth e Hulata, 1981), poliploidia (Diaz, 1994), ginogênese e androgênese (Thorgaard, 1983), altas temperaturas (Dias-Koberstein *et al.*, 2006a) e a reversão por meio de hormônios masculinizantes (Popma e Green, 1990), tanto na ração como em banhos de imersão (Galé *et al.*, 1999).

Para a técnica de reversão sexual da tilápia, têm-se utilizado diversos tipos de hormônios, mas o que vem proporcionando ótimos resultados, mesmo quando se pensa em eliminação dos resíduos do hormônio na carcaça, é o 17- α -metiltestosterona (MT), de acordo com Rothbard *et al.* (1990) e Guerrero III e Guerrero (1997).

Com relação ao uso do 17- α -metiltestosterona (MT) na reversão sexual da tilápia, destacam-se dois métodos: o hormônio na ração e o banho de imersão. Bombardelli e Hayashi (2005) testaram períodos ontogênicos de menor sensibilidade das larvas a partir de banhos de 36 horas com 2,0 mg MT.L⁻¹,



apresentando uma porcentagem de 85,15% de machos, com intuito de diminuir a quantidade de metiltestosterona (MT) liberada ao ambiente.

O hormônio na ração é o método mais utilizado entre os piscicultores, por ser mais eficaz na efetividade da reversão sexual, apresentou menor custo e menos trabalho. Esse método pode chegar a até 98% de machos no lote (Mainardes-Pinto *et al.*, 2000), utilizando-se 60 mg MT.kg⁻¹de ração, por um período de 30 dias.

Substâncias químicas que aumentam o acúmulo de nutrientes, como o nitrogênio protéico e não-protéico fornecidos pela alimentação, são consideradas anabolizantes. Aumentando-se o acúmulo de proteína, conseqüentemente, a massa muscular aumenta, tornando-se uma substância química residual para os animais, mesmo numa quantidade muito pequena encontrada no animal (Duarte *et al.*, 2002).

Os anabolizantes, muitas vezes usados na produção animal, são divididos em biologicamente endógeno, como a testosterona, ou biologicamente exógeno o qual se divide em três grupos: xenobióticos, como a trembolona –TBA; esteróides sintéticos, como a MT; e os estilbenois, como a dietilestilbestrol – DES (Patterson e Salter, 1985).

A legislação do uso de hormônio na produção animal diverge entre os países. O único que é proibido em todos eles é o dietilestilbestrol (DES), por ser cancerígeno. Na Europa, o uso de anabolizantes na produção animal não é permitido, fazendo com que todo produto importado que apresente resíduos de hormônio seja embargado. Já, nos Estados Unidos, é permitido o uso da testosterona e acetato de trembolona (TBA) em produtos de origem animal (Collins *et al.*, 1989).



1.1. Objetivo Geral

Determinar a concentração do hormônio testosterona na carcaça de larvas e juvenis de tilápia submetidas a dois métodos de reversão sexual: ração com 17- α -metiltestosterona e banho de imersão em solução enriquecida com o mesmo hormônio.

1.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliação da eficiência do método de reversão sexual por meio de banho de imersão em relação à incorporação do hormônio na ração, por métodos comparativos;
- 2- Detectar a presença da testosterona na carcaça de larvas e juvenis de tilápia do Nilo pelo método ELISA, após a reversão sexual com o hormônio masculinizante 17- α -metiltestosterona.



2. Revisão Bibliográfica

2.1. Características da Espécie

A espécie Tilápia do Nilo, originária da África, está espalhada pelo Mundo em diversos países de clima subtropical e tropical. Essa espécie se destaca das demais pelo crescimento mais rápido, reprodução tardia (permitindo alcançar maior tamanho antes da primeira reprodução) e alta prolificidade, possibilitando produção de grandes quantidades de alevinos. Apresentam grande habilidade em filtrar as partículas do plâncton, e quando cultivadas em viveiros de águas verdes, geralmente superam em crescimento e conversão alimentar as demais espécies de tilápia (Kubtiza, 2000).

2.2. Métodos de Reversão

A reversão sexual é de fundamental importância dentro do cultivo racional de tilápia do Nilo, em razão da necessidade de obtenção de indivíduos machos para a engorda, evitando-se problemas com a reprodução e desova, além do excesso populacional nos viveiros e o maior crescimento do macho em comparação à fêmea (Meurer *et al.*, 2004).

Segundo Kubitza (2000), durante os primeiros 15 a 30 dias de vida, dependendo da temperatura da água, as pós-larvas de tilápia ainda não possuem o sexo definido e, através da administração contínua de hormônio, podem-se obter populações masculinas ou femininas, de acordo com o hormônio utilizado.



A reversão sexual da tilápia pode ser alcançada por meio de várias técnicas: incorporação de hormônio na ração (Galé *et al.*, 1999), imersão das pós-larvas em água contendo hormônio (Kubitza, 2000) e altas temperaturas de cultivo (Dias-Koberstein *et al.*, 2006a).

A técnica mais usada nessa reversão sexual é a incorporação do hormônio na ração (Leonhardt e Urbinati, 1997). A produção de tilápia do sexo masculino proporciona um maior crescimento, ao contrário das fêmeas que passam maior parte preparando-se para a reprodução (McAndrew, 1993).

Pandian e Sheela (1995) relacionaram vários trabalhos com reversão sexual da tilápia. A maior parte dos estudos publicados preocupa-se com o sucesso ou fracasso dos métodos utilizados, não dando atenção às taxas de sobrevivência e crescimento dos peixes com sexo revertido. Os resultados obtidos neste estudo ressaltam que a reversão sexual é um benefício ao desenvolvimento do peixe, tanto para crescimento quanto para maturidade sexual.

Zanardi *et al.* (2006) testaram dois métodos de reversão sexual da Tilápia do Nilo, avaliando a masculinização por alta temperatura (28°C, 32°C e 36°C), e pela ração contendo 17- α -metiltestosterona. Os resultados mostraram que a temperatura de 36°C causou uma grande mortalidade, mesmo com uma reversão de 93% de machos, e que a incorporação do hormônio (60 mgMT. kg⁻¹) na ração obteve 98% de machos.

2.2.1. Hormônio na ração

Segundo Phelps e Cerezo (1992), a utilização de hormônios masculinizantes é a técnica mais prática e efetiva para a produção de machos



fenotípicos. Essa prática, além de eliminar problemas relativos à reprodução, proporciona a obtenção de populações homogêneas. Entre os hormônios pesquisados, o andrógeno sintético 17- α -metiltestosterona (MT) tem sido bastante empregado no processo de reversão sexual, por apresentar também a vantagem de ser facilmente excretado logo após o período do tratamento hormonal (Guerrero III e Guerrero, 1997).

Hiott e Phelps (1993) obtiveram população 100% de machos em tilápia do Nilo alimentada com 60 mgMT.kg⁻¹ de ração durante 28 dias. Shelton *et al.* (1978) também obtiveram 100% de machos de *O. aureus* com o hormônio etiltestosterona. Mainardes-Pinto *et al.* (2000) mostraram que as mesmas doses apresentaram uma reversão sexual de 98% de machos, em tilápia do Nilo.

2.2.2. Banho de Imersão

A técnica de banhos de imersão envolve exposições periódicas e/ou contínuas dos animais em solução contendo hormônios masculinizantes ou feminilizantes (Pandian e Sheela, 1995). É um método alternativo à suplementação dietética.

A imersão apresenta menor custo de aplicação (Pandian e Sheela, 1995). Também pode minimizar o efeito de variáveis potencialmente influentes no método de incorporação de esteróides na ração (Beardmore *et al.*, 2001). Esse método diminui o tempo de exposição do manipulador ao hormônio, sendo mais seguro para o ambiente, por possibilitar o armazenamento do resíduo para posterior degradação (Galé *et al.*, 1999) ou filtragem em carbono ativado (Specker e Chandlee, 2003).



Experimentos de banhos de imersão têm sido realizados desde 1965 (Phelps e Popma, 2000). A dificuldade do tratamento por intermédio do banho de imersão é o desconhecimento do melhor período para procedimento da técnica.

Bombardelli e Hayashi (2005) observaram que tratamentos de imersão não influenciam no crescimento e mortalidade das larvas. O período de maior sensibilidade das larvas de tilápia do Nilo aos tratamentos hormonais com MT foi de 15 dias após eclosão (DPE) ou 408,2 dias-graus (UTAs), apresentando 85,19% de machos.

Dias-Koberstein *et al.* (2006b) utilizaram diferentes dosagens (1, 3 e 6 mg.L⁻¹) de hormônio no banho de imersão para reversão sexual da tilápia do Nilo, sendo que a concentração de 6 mg do MT por litro de água mostrou uma melhor reversão sexual, obtendo 84% de machos.

2.2.3. Temperatura

Estudos recentes sobre a tilápia do Nilo demonstraram que altas temperaturas da água causam efeitos semelhantes aos provocados pelos hormônios esteróides na reversão sexual, com variações nas proporções macho:fêmea, de acordo com a termossensibilidade das linhagens e das famílias dos peixes estudados (Dias-Koberstein *et al.*, 2006a).

As gônadas parecem apresentar sensibilidade à alteração de temperatura no mesmo momento em que apresentam sensibilidade aos tratamentos hormonais. Essa coincidência de períodos sensíveis à temperatura e aos hormônios pode resultar de mecanismos semelhantes, em que a temperatura influencia o mecanismo de ação da enzima aromatase, que catalisa a



transformação de andrógenos para estrógenos (Baroiller e D'Cotta, 2001; D'Cotta *et al.*, 2001).

Borges *et al.* (2005) observaram que a temperatura de 37°C da água, durante um período de 28 dias, apresentou uma baixa sobrevivência (66%) e 72% de machos.

Dias-Koberstein *et al.* (2006a), utilizando diferentes temperaturas da água (28, 32 e 36°C) na reversão sexual da tilápia, observaram que a temperatura de 32°C proporcionou melhor resultado, com 92% de machos e 89,3% de sobrevivência. A temperatura de 36°C apresentou sobrevivência de 79,5% e 83,3% de machos.

2.3. Resíduos Hormonais e Metodologia

Budworth e Senger (1993) observaram que ao incluir testosterona na ração para truta arco-íris criada em sistema de recirculação de água, foram encontradas doses significativas desse hormônio na carcaça de peixes de outros aquários não pertencentes ao experimento.

Apesar de ter sido demonstrado em estudos específicos (Rothbard *et al.*, 1990; Curtis *et al.*, 1991) que a utilização do hormônio não resulta no acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes revertidos com hormônio masculinizante, ainda existem preocupações quanto à sua liberação no ambiente e à postura dos consumidores em relação ao produto (Beardmore *et al.*, 2001; Karayücel *et al.*, 2003). Essa preocupação tem feito com que se busque uma melhor qualidade e eficiência no processo com a diminuição dos custos e riscos e, principalmente, com redução de impactos ambientais (Pandian e Sheela, 1995; Baras *et al.*, 2001).



No mundo moderno, grande parte da segurança alimentar visa ao controle de resíduos nos alimentos, em decorrência do uso de pesticidas, drogas veterinárias, ou de acidentes envolvendo contaminantes ambientais. Resíduos de anabolizantes em carnes trazem sérios problemas de saúde pública. De acordo com Epstein (1990) 3.000 crianças em Porto Rico tiveram sérios problemas de desenvolvimento sexual prematuro e cistos ovarianos devido à ingestão de produtos cárneos com resíduos de zeranól.

Segundo o Comitê Misto do *Codex Alimentarius*/ FAO/ WHO, a ingestão de alimentos contaminados por anabolizantes pode levar ao aparecimento de distúrbios endócrinos, como indução de puberdade precoce em crianças, avanços na idade óssea com repercussões negativas no crescimento, modificação dos caracteres sexuais, bem como cânceres, principalmente, no fígado e pâncreas (Cardoso *et al.*, 1999).

Os agentes anabólicos são geralmente metabolizados e seus metabólitos excretados ou levados pelos tecidos numa forma livre, biologicamente não ativa. O fígado converte os agentes anabólicos em metabólicos menos ativos e também em formas conjugadas, mais solúveis em água, que são secretadas na bile, sendo então excretadas pelas fezes e urina. No entanto, uma parte dos metabólitos formados no fígado pode entrar no sistema circulatório e permanecer em outros tecidos como resíduos (Heitzman, 1983; Rico, 1983).

Em estudos com metiltestosterona na água de tanques de cultivo por uma semana, atingiu-se o pico de $3,8 \text{ ng.mL}^{-1}$, 28 dias após a alimentação com o hormônio, diminuindo os níveis após 35 dias. Também foi observado que o MT acumulou nos sedimentos dos tanques em níveis de 2 a 6 ng.g^{-1} , em 28 dias após o início do tratamento com o hormônio. Depois de 84 dias encontravam-se níveis de 2,8 a $2,9 \text{ ng.g}^{-1}$, demonstrando a persistência do metiltestosterona no solo por



aproximadamente três meses após cessar o tratamento (Contreras Sánchez *et al.*, 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2000).

Johnstone *et al.* (1983) demonstraram que os níveis de metiltestosterona (MT) na carcaça de alevinos de tilápia de Moçambique declinaram em 100 horas (4 dias), para menos de 1% da concentração observada uma hora após a última refeição com ração tratada com MT. Assim, na opinião dos pesquisadores, não há risco em consumir uma tilápia que foi submetida à reversão sexual.

Segundo Rana (1988), um único ovo de tilápia contém aproximadamente 3 ng de testosterona. Aproximadamente 200 ovos pesam um grama, concluindo que um grama de tecido ovariano contém 600 ng de testosterona.

Para a detecção de resíduos de anabolizantes, geralmente, utilizam-se duas metodologias: (1) os imunoenaios, tais como radioimunoensaio (RIA) e método imunoenzimático (ELISA), os quais são rotineiramente usados para detecção e/ou (2) métodos físico-químicos, por cromatografia (CG-EM, CCDAE), os quais são usados para determinações quantitativas e como métodos de referência (Hoffman e Blietz, 1983; Lone, 1997). O método cromatográfico, durante os últimos anos, tem demonstrado uma tendência no uso de métodos como: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG - EM) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAF), como importantes ferramentas para a análise de esteróides anabolizantes em geral.

Em alguns países, como Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Argentina e Estados Unidos, é permitido o uso dos compostos anabolizantes naturais, tais como testosterona, progesterona, 17- β -estradiol e dos sintéticos zeranol e acetato de trembolona (TBA). Nesses países, são controlados somente os resíduos dos compostos sintéticos com Limites Máximos de Resíduos (LMR), cujos valores



foram estabelecidos por um comitê misto da FAO/ OMS (Organização Mundial da Saúde) (Collins *et al.*, 1989; Lone, 1997). No Brasil, a partir de 24 de maio de 1991 (Brasil, 1994), foi proibida a importação, produção, comercialização e uso de substâncias naturais ou artificiais para fins de crescimento e/ou engorda de animais de abate, com permissão apenas para fins terapêuticos, sincronização de ciclo estral e preparação de doadores e receptores para a transferência de embriões (Brasil, 1991).

Em 1995, foi determinado pelo *Codex alimentarius* do Brasil, que os produtos 17- β -estradiol, testosterona e progesterona seriam seguros à saúde, assim como o acetato de trembolona e o zeranol, desde que em doses inferiores a 2 e 10 mg.kg⁻¹ respectivamente. O dietilelbestrol foi considerado como potencialmente tóxico (Palermo-Neto, 1998).



3. Material e Métodos

3.1. Condições Experimentais e Local

O experimento foi realizado no laboratório de Tilapicultura do Centro de Aqüicultura da Unesp - CAUNESP, campus de Jaboticabal, no período de 20 de novembro de 2006 a 17 de fevereiro de 2007, com sete amostras do material biológico coletado. A extração da testosterona foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Peixes e no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, campus de Jaboticabal (UNESP) foi realizada a determinação hormonal. O início dos testes hormonais foram realizados no Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA), do Departamento de Ciências Básicas da Universidade de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, campus de Pirassununga.

3.2. Condições Ambientais e Material Biológico

Os reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram acondicionados em caixas de alvenaria, de 2,8 m³, durante 15 dias, na proporção de um macho para cada três fêmeas por metro cúbico. Após esse período, foram coletados os ovos da boca de três tilápias através de contrafluxo de água na orofaringe para a liberação dos ovos (Figura 1)(Tabela 1).



Figura 1. Coleta de ovos da boca da tilápia do Nilo, através de contrafluxo no músculo da orofaringe.

A desova de cada fêmea foi transferida para incubadoras cônicas de 2 L de capacidade volumétrica e, após a eclosão, as larvas passaram para as bandejas plásticas até a absorção do saco vitelino (Figura 2). As larvas providas das três matrizes foram homogeneizadas para que não ocorresse influências genéticas.



Figura 2. Incubadora artificial de tilápia, apresentando o copo cônico e a bandeja.



Tabela 1. *Peso (g) e número estimado de ovos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) utilizados no experimento.*

Matriz	Peso (g)	Nº estimado de ovos
1	186	1.274
2	153	1.236
3	342	1.064

Foram utilizadas 1.500 larvas de tilápia do Nilo após a absorção do saco vitelino com comprimento e peso médio de 8,75 mm \pm 0,071 e 0,0093 g \pm 0,00052, respectivamente.

As larvas foram distribuídas em 15 aquários plásticos, 100 indivíduos por aquário, com capacidade de 20 L e volume útil de 15 L. Foram aclimatados em sistema “banho-maria”, a uma temperatura média de 30°C \pm 2°C, em caixas plásticas de 175 L, com aeração contínua (Figura 3).



Figura 3. *Caixa com quatro aquários com capacidade de 20 L, em banho-maria, e as mangueiras de ar providas de pedra porosa.*

A temperatura da água e do ar foram aferidas diariamente com termômetros de máxima e mínima, de bulbo de mercúrio. Três vezes por semana, foram realizadas coletas de água para análises de pH (potenciômetro digital -



Corning OS-30), condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) (condutivímetro digital - Corning PS-70), oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (oxímetro YSI - *Yellow Spring Instruments* 54A), alcalinidade CaCO_3 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e amônia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (titulação), utilizado a mesma metodologia de Golterman *et al.* (1978), sólidos disponíveis totais - SDT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e salinidade ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (sonda multiparâmetros da YSI). Os parâmetros da água monitorados estavam de acordo com o recomendado para aqüicultura por Boyd (1992), Sipaúba - Tavares (1995) e Popma e Phelps (1998) (Tabela 2).

Na maior parte do período experimental, a temperatura da água ficou entre $30,37^\circ\text{C}$ (máxima) e $28,95^\circ\text{C}$ (mínima), recomendada para o bom desempenho da espécie (Kubitza, 2000).

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água (pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, alcalinidade, amônia, sólidos disponíveis totais - SDT, salinidade e temperatura média) dos aquários experimentais com larvas e alevinos de tilápia do Nilo.

Parâmetros físico-químicos	Tratamentos*		
	BI	RH	RS
pH	$7,33 \pm 0,04$	$7,28 \pm 0,04$	$7,34 \pm 0,03$
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	$299,20 \pm 6,56$	$294,05 \pm 8,73$	$300,45 \pm 10,80$
Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$5,44 \pm 0,08$	$5,38 \pm 0,10$	$5,41 \pm 0,05$
Alcalinidade CaCO_3 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$193 \pm 2,00$	$195 \pm 3,21$	$197 \pm 3,43$
Amônia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$72,5 \pm 26,32$	$70,8 \pm 44,98$	$98,6 \pm 56,79$
SDT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$0,2674 \pm 0,02$	$0,2875 \pm 0,08$	$0,2757 \pm 0,02$
Salinidade ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$0,156 \pm 0,010$	$0,155 \pm 0,010$	$0,161 \pm 0,004$
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	$30,31 \pm 0,08$	$29,83 \pm 0,94$	$30,30 \pm 0,12$

* BI – Banho de imersão; RH – Ração com hormônio; e RS - Ração sem hormônio (controle).



3.3. Tratamentos

Os tratamentos empregados foram: banho de imersão – (BI), ração com hormônio – (RH), ração sem hormônio – controle (RS).

3.3.1. Banho de Imersão (BI)

Os banhos de imersão foram realizados em aquários de vidro com capacidade de 2,5 L e volume útil de 2 L (Figura 4). A densidade utilizada foi de 50 larvas por litro. Os banhos aconteceram em dois períodos: 6^o e 10^o dia após absorção do saco vitelino das larvas, com duração de 36 horas, e concentração de 6 mgMT.L⁻¹ de água, diluído em 0,5 mL de álcool etílico (92,8%).



Figura 4. Aquários utilizados no banho de imersão, dentro da caixa em banho-maria, providos de soprador de ar.

3.3.2. Ração com Hormônio (RH)

O tratamento ração com hormônio teve uma duração de 30 dias. Utilizou-se ração comercial (45% PB), à qual foi adicionado 60 mg do hormônio 17- α -metiltetosterona (valor esperado de pureza 97% a 103%) diluído em 0,5 litro de álcool etílico (92,8%) em um quilo de ração. Em seguida, a ração foi homogeneizada, seca ao ar livre e posteriormente, estocada em refrigerador.



3.3.3. Ração sem Hormônio – Controle (RS)

Foi utilizada a mesma ração para este tratamento sem a adição do hormônio.

3.4. Manejo e Equipamentos Experimentais

Foram realizados seis arraçoamentos diários (8, 10, 12, 14, 16 e 18 horas), à vontade, com uma ração comercial (granulométrica 0,3 mm) contendo 45% de proteína bruta, 9% de extrato etéreo, 6% de fibra bruta, 13% de matéria mineral, 3% de cálcio e 1% de fósforo. A ração foi conservada em refrigerador a 6°C, por um período de 30 dias. Os restos de ração e fezes do fundo dos aquários experimentais foram sifonados, após 30 minutos do primeiro e do quinto arraçoamento do dia.

As análises dos parâmetros físico-químicos da água foram realizadas ao meio dia, para que não houvesse interferência dos mesmos por causa da sifonagem. A temperatura da água dos aquários experimentais foram aferidas sempre antes das duas sifonagens e durante as análises dos parâmetros físico-químicos da água.

O fotoperíodo, durante os 30 dias experimentais para os tratamentos, foi de 12L:12E, controlado por “*timer*”. Cada aquário experimental era provido de aeração contínua.

Terminadas as fases dos três tratamentos, os alevinos foram transferidos para caixas de fibra de silicone, com capacidade de 200 L, e volume útil de 170 L (Figura 5), onde os peixes permaneceram até o final do experimento (90 dias).



Nesse período, os alevinos foram alimentados com uma ração comercial contendo 32% de proteína bruta, 6% de extrato etéreo, 6,5% de matéria fibrosa, 12% de matéria mineral, 2,5% de cálcio e 0,8% de fósforo, de granulometria 3mm, com quatro arraçoamentos por dia, à vontade.



Figura 5. Caixa de 200 L no sistema de recirculação em que os peixes passaram um período de 60 dias após o final do tratamento.

3.5. Determinação da Eficiência de Reversão Sexual

Ao final dos 90 dias, todos os alevinos de cada parcela foram avaliados quanto à proporção sexual. Para isso, os peixes foram anestesiados e sacrificados com 15 mg de benzocaína por litro de água para retirada das gônadas (Figura 6).

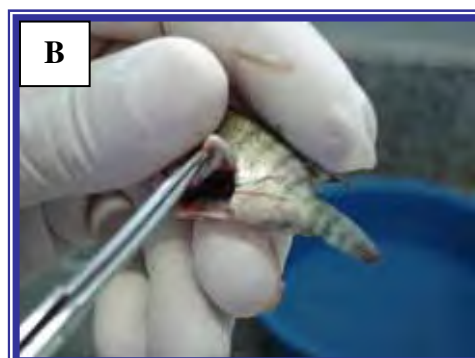


Figura 6. Peixes sacrificados após dosagem de 15 mg de benzocaina, figura a esquerda (A) e da direita (B), após corte ventral, retirou-se às vísceras e separou-se as gônadas como esta na figura.



A proporção de sexos foi determinada pela análise microscópica das gônadas, utilizando-se a técnica do acetato-carmim, descrito por Guerrero e Shelton (1974), e validada para alevinos de tilápia do Nilo por Wassermann e Afonso (2002). As gônadas foram coradas com acetato carmim a 45% em uma lâmina, comprimida levemente com uma lamínula e, posteriormente, examinada sob microscópio ótico, objetiva 40x (Figura 7). Foram identificados os machos e as fêmeas do grupo, por diferenciação anatômica das gônadas, de acordo com o método desenvolvido por Afonso e Lebouté (1993).

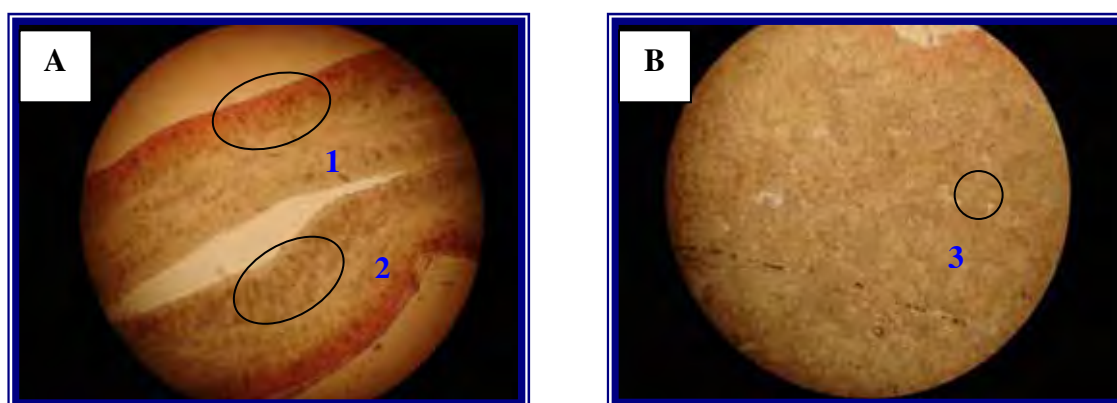


Figura 7. Gônada visualizada no microscópio ótico com objetiva 40x. Na imagem da esquerda (A) aparecem dois testículos, tecido conjuntivo denso (1) e os lóbulos seminíferos (2); a imagem da direita é um ovário com os ovócitos (3).

3.6. Determinação da Testosterona em Larvas e Juvenis

3.6.1. Coletas de Larvas e Juvenis

Durante o experimento, foram realizadas coletas para quantificar o hormônio na carcaça dos peixes, com amostragem no início do experimento, 30^o, 37^o, 40^o, 45^o, 60^o e 90^o dias. Foram coletados 0,5 g de peso vivo de larvas e alevinos e congelados em gelo seco, para não alterar as propriedades fisiológicas dos andrógenos, de acordo como Vijayan *et al.* (1991).



3.6.2. Metodologia de Extração

A metodologia utilizada foi descrita por Jesus *et al.* (1991), modificada por Brinn e Urbinati (2003) e adaptada para extração do hormônio metiltestosterona.

As amostras coletadas e congeladas a -20°C foram trituradas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e um bisturi (Figura 8).

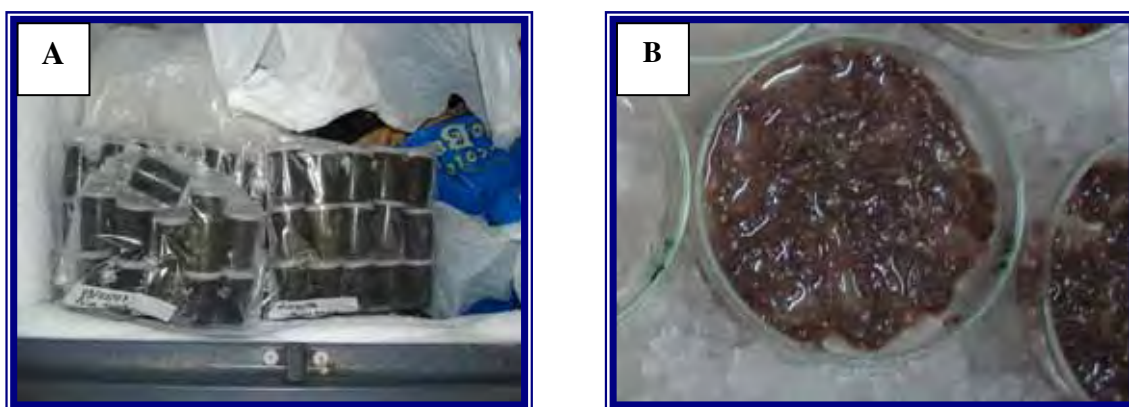


Figura 8. Amostras coletados e congeladas a -20°C e identificadas (material, tratamento, repetição e data) na figura da esquerda (A), e a direita (B), figura da amostra triturada em uma placa de Petri sobre uma camada de gelo.

Um “pool” de 0,5 g foi colocado em um tubo de ensaio de 15 mL (Figura 9), acrescentado 1,5 mL de solução tampão salina com gelatina – PBSG (Anexo 1) com auxílio de um pipetador de 5 mL.



Figura 9. Amostrado um “pool” de 0,5 g da massa homogenia pesado em balança analítica.



Essa mistura foi homogeneizada no Turex (METALO D72622 GSE7141) (tritador), por 45 segundos, ou até obter uma massa homogênea (Figura 10).

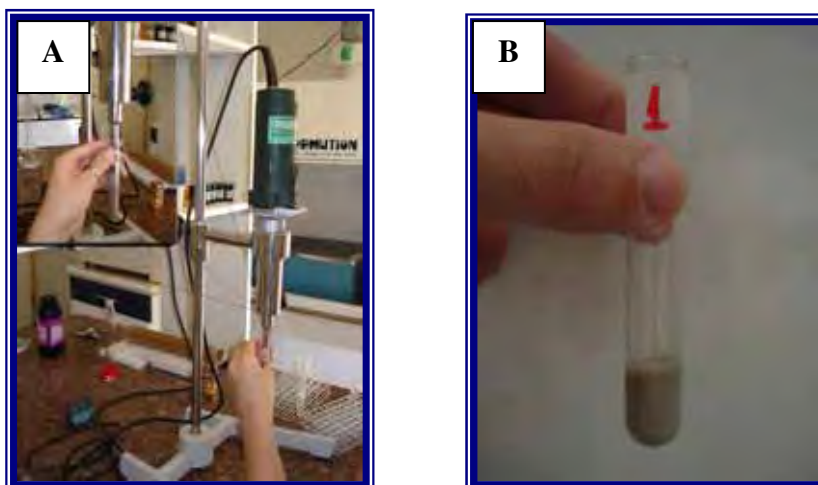


Figura 10. À esquerda (A) misturador e triturador Turex utilizado para as amostras e à direita (B) a figura do tubo após passar pelo Turex.

Deste homogenado foi retirada uma alíquota de 500 μL à qual se adicionou 3,5 mL de éter dietílico P.A. e misturado em Vórtex (PHOEMIX AP-56) (agitador) por um minuto (Figura 11).

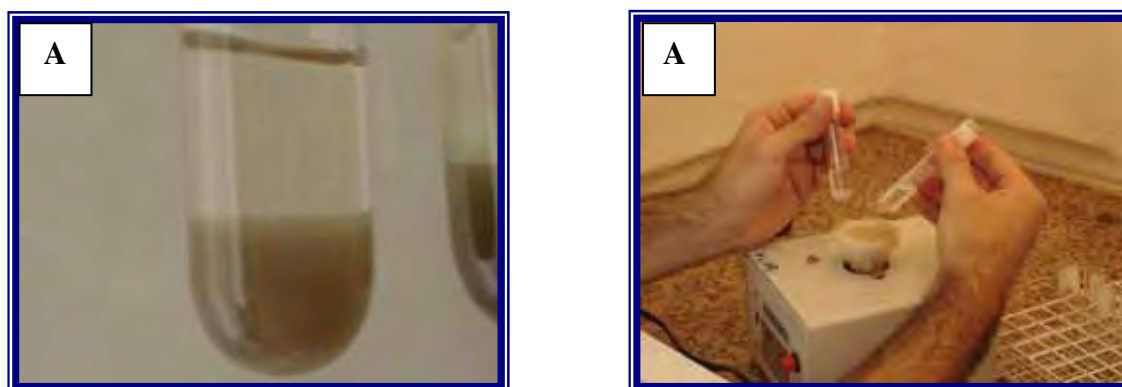


Figura 11. Tubo com a alíquota (500 μL) do homogenado após acrescentar 3,5 mL de éter dietílico, figura da esquerda (A) e da direita (B) o misturador Vórtex.

Centrifugou-se (ALC PK-121R) por cinco minutos a uma velocidade de 2.500 rpm à temperatura ambiente e, em seguida, o tubo foi colocado em um recipiente contendo gelo seco e acetona P.A., até ocorrer o congelamento da massa. O éter foi entornado (não congelou a temperatura do gelo + acetona) em



um tubo de ensaio de vidro limpo, novamente pipetou-se 3,5 mL de éter e repetiu-se por mais duas vezes esse procedimento. (Figura 12).

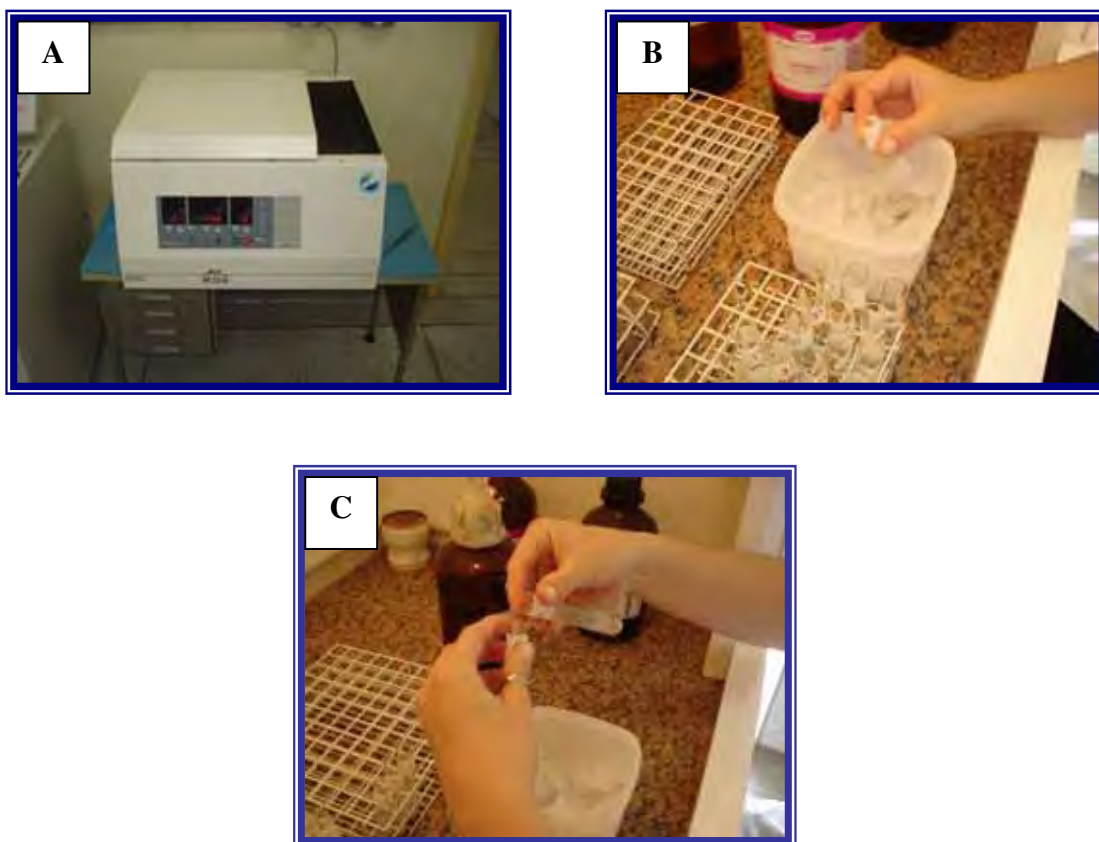


Figura 12. Centrífuga utilizada, figura (A), foi imergido o tubo em um recipiente contendo 100 g de gelo seco coberto com acetona, até que ocorra o congelamento da massa, figura (B) e após isso o éter não congela, assim entorna-se em outro tubo o sobrenadante, figura (C) .

O tubo de ensaio contendo o sobrenadante foi colocado em banho-maria dentro de uma capela de exaustão, a uma temperatura de 37°C, até evaporar o éter por completo (\pm cinco horas). Depois de evaporado, foram lavados as paredes do tubo com 1 mL de éter, com uma seringa de 5 mL e uma agulha descartável (Figura 13), e o material foi colocado em banho-maria novamente para evaporar (\pm duas horas).



Figura 13. Capela com fluxo de ar com banho-maria em seu interior a uma temperatura de 37°C figura da esquerda (A) e da direita (B) lava-se a parede do tubo com um mL de éter, com o auxílio de um seringa e uma agulha descartável de 5 mL.

Após completar a evaporação, adicionou-se 200 μ L de PBSG, com um pipetador de 1 mL, observa-se minúsculas gotas de lipídeos (Figura 14), e levou-se ao sonicador (lavadora ultra-sônica UNIQUE) por 15 minutos (Figura 15A). Homogeneizou-se por um minuto no Vórtex e repetiu-se o procedimento mais uma vez, para completar a extração. O material resultante foi identificado (Figura 15B) e conservado a -20°C para posterior análise.

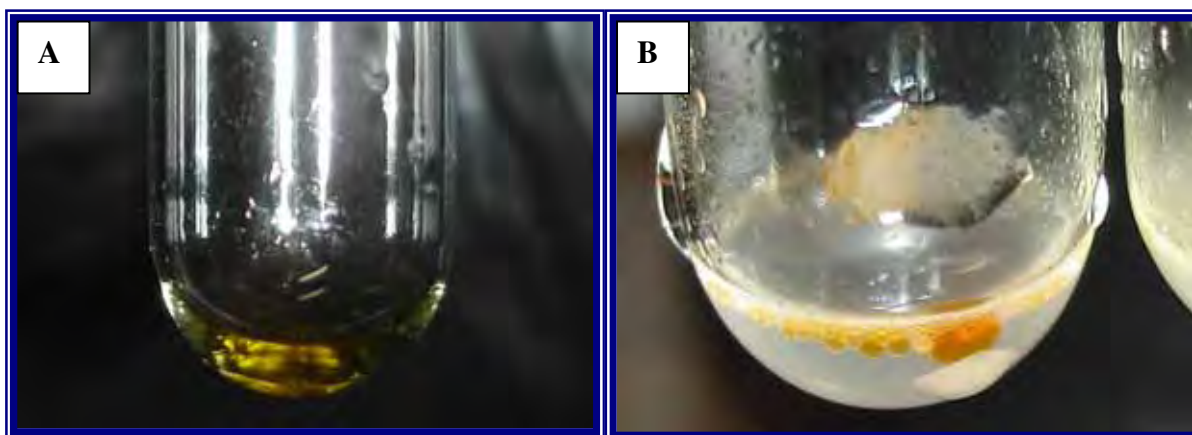


Figura 14. Após evaporar em banho-maria observa-se que essa mancha amarelada é o lipídio, figura da esquerda (A) e da direita (B) adicionou-se 200 μ L de PBSG.

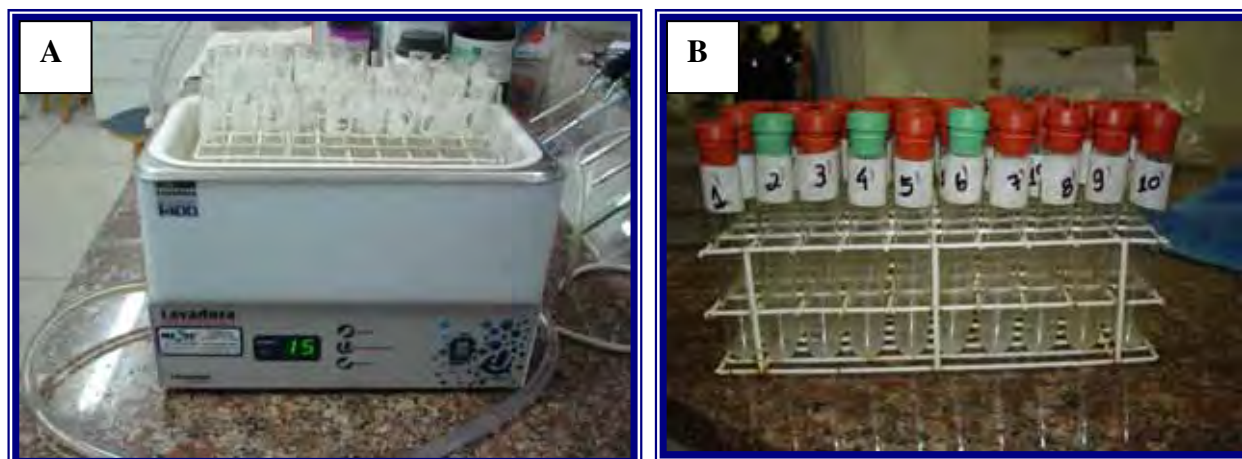


Figura 15. Sonicador, em que as amostras ficaram por 15 minutos, Figura da esquerda (A) e da direita (B), tubos com a solução final para realizou a leitura, e identificados.

3.6.3. Princípio do Teste ELISA

A leitura das amostras foi feita pelo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) no qual foi utilizado o “Kit” da marca Interkit (Testosterona EIA “Kit”), somente para diagnóstico *in vitro*. O teste foi realizado com base no princípio de ligações competitivas entre a testosterona da amostra e a testosterona-HRP conjugada, com uma quantidade constante de antitestosterona de coelho. A testosterona da amostra do tecido foi ligada a um anticorpo de coelho em solução, e o complexo resultante foi capturado por um anticorpo de cabra anti-IgG e de coelho impregnado nas cavidades. Simultaneamente, adicionou-se à placa uma solução de testosterona conjugada com peroxidase, que competiu com a testosterona do soro para se ligar ao anticorpo anti-testosterona de coelho.

A testosterona conjugada com peroxidase, não ligada, foi removida com lavagens. Foi adicionada uma solução de TMB e incubada resultando no



desenvolvimento de uma coloração azul. A adição de um ácido forte à mistura paralisou a reação, produzindo uma coloração amarelada com uma máxima absorção medida espectrofotometricamente em 450 nm. A intensidade da cor formada é inversamente proporcional à concentração de testosterona na amostra. Uma curva padrão foi obtida das concentrações dos calibradores *versus* suas absorbâncias. As concentrações de amostras e controle foram comparadas paralelamente com os calibradores.

3.6.3.1. Procedimento da Leitura no ELISA

A placa continha 96 cavidades com oito linhas e 12 colunas, onde foram pipetados 10 μ L de padrão, controles e amostras nos poços apropriados. Logo após adicionados 100 μ L de conjugado e 50 μ L de antitestosterona em todos os poços (Figura 16).

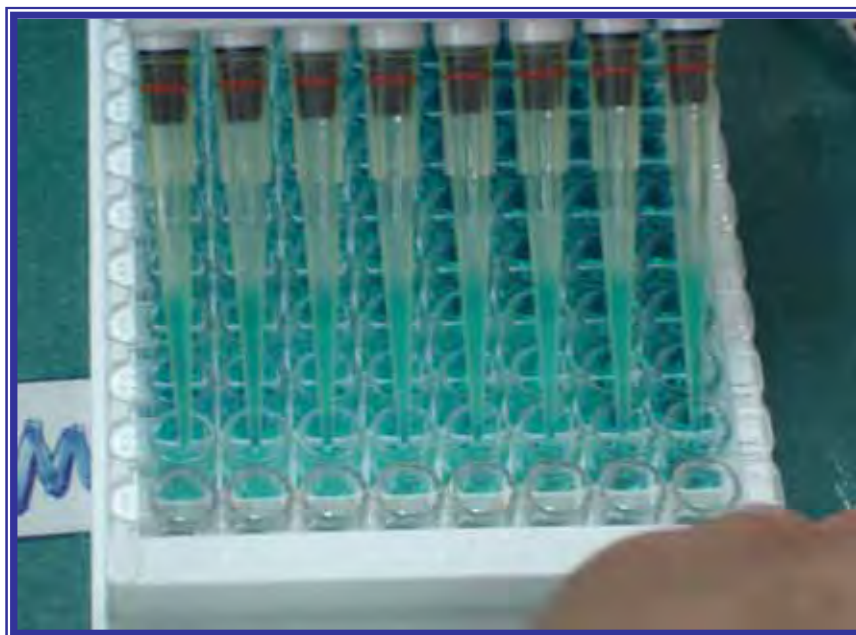


Figura 16. Placa com 96 poços, em que foi adicionado o conjugado com uma pipetador multicanais (8).



Através de movimentos circulares, procedeu-se a homogeneização. Incubou-se por 90 minutos a uma temperatura de 37°C (Figura 17A), desprezou-se o conteúdo dos poços e lavou-se cinco vezes com água destilada ou deionizada (Figura 17B), para retirada do excesso dos reagentes utilizados para a retenção da testosterona na parede dos poços. Depois verteu-se em papel absorvente, batendo-se para retirar o excesso de líquido.



Figura 17. Incubadora de movimentos circulares e reajuste de temperatura, em que no caso 37°C, figura da à esquerda (A) e da direita (B) equipamento de lavagem da placa.

Foram pipetados 100 µL de substrato em todos os poços, homogeneizados e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente (18°C a 25°C), ao abrigo da luz. Foram pipetados 100 µL de solução de bloqueio em todos os poços e homogeneizados por 30 segundos. As leituras das amostras foram realizadas na densidade óptica de 450 nm, e realizadas em até 10 minutos, para não comprometer a ação dos reagentes. Os reagentes utilizados na pipetagem acompanham o “kit” EIA testosterona soro humano (Figura 18).



Figura 18. Equipamento de leitura EIA, para placas com 96 poços.

3.6.3.2. Determinação da Porcentagem de Recuperação Hormonal

A determinação da porcentagem de recuperação feita com hormônio foi realizada pela adição de quantidades conhecidas de testosterona em amostra de tecido dos peixes, obtidos pela homogeneização e adicionado o PBSG no controle (mesma amostra foi usada para fazer todos os valores conhecidos). Os valores conhecidos ao PBSG foram os seguintes: 1, 3, 6 e 12 ng de MT (Anexo 2).

3.6.4.. Transformação dos Valores da Concentração de Testosterona

Os valores apresentados pelo programa do ELISA são expressos na unidade de ngT.mL^{-1} do extrato. Estes valores foram transformados em ngT.g^{-1} de carcaça a partir do método de extração. Para isso utilizou-se uma função matemática para transformá-los $Y \text{ ngT.g}^{-1} \text{ carcaça} = 1,2 \cdot X \text{ ngT.mL}^{-1} \text{ extrato}$, em que “Y” é a concentração da testosterona (ng) por grama de carcaça, e o “X” é a



concentração da testosterona (ng) por mililitros do extrato final da extração do tecido, multiplicado pelo fator 1,2.

$$Y = 1,2. X$$

3.6.5. Ensaios e Recuperação da Testosterona

3.6.5.1. Interensaio

O interensaio foi realizado entre os “kits” (placas) de testosterona (EIA). Cada “kit” recebeu três amostras e cada amostra foi repetida entre os “kits”, para avaliar o erro de leitura de cada um. Para isso foram utilizados valores altos (7,19, 10,39 e 7,55 ngT dentro de cada poço) e baixos (0,33, 0,48 e 0,50 ng por poço) de testosterona para os “kits” um, dois e três, respectivamente. O desvio padrão, coeficiente de variação e a média entre os valores altos para as placas foram de 1,752, 20,92% e 8,3766 ng respectivamente e para os valores baixos foram de 0,0929, 21,278% e 0,4366 ng. O erro de pipetagem esteve abaixo do padrão de Nash *et al.* (2000), que observaram o coeficiente de variação do interensaio com valor de 50%.



3.6.5.2. Intra-ensaio

O intra-ensaio foi realizado dentro de cada “kit” (placa) de testosterona (EIA), e cada um recebeu duas amostras (uma no início da placa e outra no final), para avaliar o erro dentro de cada placa. Para isso, foram utilizados valores altos (10,30 e 15,51 ngT dentro de cada poço) e baixos (0,48 e 2,0 ng por poço) para cada *kit*. O desvio padrão, coeficiente de variação e a média entre os valores altos para as placas foram de 3,684, 28,547% e 12,905 ng, respectivamente; e para os valores baixos foram de 1,074, 86,677% e 1,24 ng. O valor encontrado por Nash *et al.* (2000) para o intra-ensaio, esteve acima do coeficiente de variação de 5%.

3.6.5.3. Recuperação da Testosterona pelo Método de Extração

Para fazer o teste de recuperação da testosterona, foram utilizados cinco *pools* de uma mesma amostra de peixe, A_c (controle), A₁ (adicionado 1 ngT), A₃ (3 ngT), A₆ (6 ngT) e A₁₂ (12 ngT) (Anexo 2). Os valores encontrados foram 3,55, 4,25, 5,54, 8,45 e 10,95 ngT; e recuperados A₁ (0,70 ngT), A₃ (1,99 ngT), A₆ (4,90 ngT) e A₁₂ (7,40 ngT); e a porcentagem de recuperação para cada *pool* A₁ (70%), A₃ (66,33%), A₆ (81,66%) e A₁₂ (61,66%). A média da recuperação da testosterona pelo método de extração utilizado no experimento foi de 69,91%. Rothbard *et al.* (1990) obtiveram uma recuperação do método de extração de 56,1% ± 6,2% em alevinos de *Oreochromis aureus*, alimentados com ração contendo MT radiomarcada (60 mgMT.kg⁻¹ de ração). O valor foi usado para correção da determinação pela cromatografia (HPLC) sendo inferior ao método



utilizado neste experimento. Esse valor da recuperação depende muito da experiência com o método utilizado e da metodologia de extração.

3.7. Parâmetros Estudados

Os parâmetros zootécnicos analisados no desenvolvimento larval até a fase de alevinagem foram:

- Comprimento total (mm) (1^o, 30^o e 90^o dia);

- Peso (g) (1^o, 30^o e 90^o dia);

- Efetividade da Reversão aos 90 dias (%);

$$\%M = \frac{n^{\circ} \text{ machos}}{n^{\circ} \text{ total peixes}} \times 100$$

- Ganho de peso (g) aos 30^o e 90^o dia;

$$GP = \text{peso (30}^{\circ} \text{ ou 90}^{\circ} \text{ dia)} - \text{peso inicial}$$

- Ganho de peso (g) individual 90^o dia;

$$GP_{\text{ind.}} = \frac{\text{peso (90}^{\circ} \text{ dia)} - \text{peso inicial}}{\text{dias de cultivo}}$$

- Taxa de sobrevivência (%) aos 30^o dia;

$$TS = \frac{n^{\circ} \text{ final de peixes}}{n^{\circ} \text{ total de peixes}} \times 100$$



3.8. Análise Estatística:

Os dados coletados para as variáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a um nível de 5% de probabilidade. Nos dados onde houve diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey ($\alpha=5\%$). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições, submetido ao programa estatístico SAS (Statistic Analysis System), versão 9.1.

Os dados de sobrevivência e porcentagem de machos sofreram transformação em Arco seno $[(\sqrt{x})/100]$.



4. Resultados e Discussão

4.1. Parâmetros Zootécnicos

Em relação ao comprimento total (Tabela 3), pode-se observar que houve diferença significativa ($P = 0,0076$) para a interação entre os fatores tratamentos e dias de amostragem.

Através do teste de Tukey, pode-se observar que o comprimento total (Tabela 3) diferiu nos tempos de amostragem, como era de se esperar, mas foi semelhante entre os tratamentos BI, RH e RS, exceto aos 90 dias, quando os peixes do tratamento RH apresentaram o maior comprimento (79,29 mm). Esses resultados estão de acordo com Pandian e Sheela (1995), que observaram que peixes da família ciclídeos revertidos com hormônio masculinizantes apresentaram um crescimento duas vezes mais rápido que peixes do tratamento controle. Carvalho (1985) observou resultados diferentes em tilápias do Nilo tratadas com 30 mg do hormônio 17- α -metiltestosterona, apresentando melhor crescimento em comprimento e peso, comparados aos outros tratamentos (50 e 100 mgMT⁻¹kg de ração e controle).

A análise de variância para o peso dos animais encontra-se na Tabela 3. Pôde-se observar que também houve diferença significativa ($P = 0,0058$) para a interação tratamento e dias de amostragem.



Tabela 3. Testes de hipóteses na análise de variância para as variáveis: comprimento (mm), peso (g) analisados no início, aos 30 e 90 dias e ganho de peso aos 30 e 90 dias após o início do experimento com larvas e juvenis de tilápia do Nilo.

Estatísticas	Variáveis					
	Comprimento (mm)		Peso (g)		Ganho de peso (g)	
F para tratamentos	4,76 (P = 0,0182)*	4,39 (P = 0,0238)*	4,46 (P = 0,0356)*			
F para Rep (Trat)	1,60 (P = 0,1576) ^{ns}	1,05 (P = 0,4409) ^{ns}	1,06 (P = 0,4576) ^{ns}			
F para dias de amost.	955,75 (P = 0,0001)**	209,47 (P = 0,0001)**	206,32 (P = 0,0001) ^{ns}			
F para (Trat. X dias de amost.)	4,48 (P = 0,0076)**	4,75 (P = 0,0058)**	4,95 (P = 0,0271)*			
CV%	11,75	44,16	35,91			
	Dias de amostragem					
Médias Tratamentos ⁽¹⁾	1	30	90	1	30	90
BI	8,73 ^{Aa}	26,45 ^{Ba}	75,77 ^{Cb}	0,009 ^{Aa}	0,192 ^{Ba}	8,69 ^{Ca}
RH	8,78 ^{Aa}	21,79 ^{Ba}	79,29 ^{Ca}	0,009 ^{Aa}	0,186 ^{Ba}	7,11 ^{Cb}
RS	8,80 ^{Aa}	24,27 ^{Ba}	64,10 ^{Cc}	0,009 ^{Aa}	0,280 ^{Ba}	5,15 ^{Cc}
					0,270 ^{Aa}	5,14 ^{Bc}

^{ns} - não significativo (P>0,05); * - significativo (P<0,05); ** - significativo (P<0,01);

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05); BI – banho de imersão; RH – ração com hormônio; e RS – controle.



Os resultados de peso (Tabela 3) tiveram o mesmo comportamento que os de comprimento. Observa-se que houve diferença significativa de todos os tratamentos em relação ao tempo de amostragem, enquanto em cada período de amostragem só houve diferença significativa entre tratamentos aos 90 dias. Os peixes submetidos ao tratamento BI apresentaram o maior peso (8,69 g) e os submetidos ao tratamento RS, menor peso (5,15 g). Resultados diferentes foram encontrados por Silva (2004), que observou um menor peso em larvas de tilápia alimentadas com ração contendo MT, em comparação com as alimentadas com ração sem hormônio.

Behrends e Smitherman (1984) encontraram resultados que discordam do presente trabalho, quando verificaram que tilápia do tratamento controle apresentaram maior crescimento e peso com relação a outros tratamentos (testosterona). Mainardes-Pinto *et al.* (2000) e Guerrero III e Guerrero (1997) mostraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos com testosterona em tilápia do Nilo, com relação ao ganho de peso. Já Simone (1990) observou em tilápia que, quando utilizou dietas com o hormônio masculinizante (metiltestosterona) na ração, houve uma diminuição do ganho em peso e comprimento total. Rinchard *et al.* (1999) explicaram que o efeito anabolizante do metiltestosterona depende do estágio de desenvolvimento, tempo de administração do hormônio, método de aplicação, temperatura e fatores dietéticos. Os autores acima utilizaram à mesma dosagem hormonal do presente experimento.

Também ocorreram diferenças significativas na interação entre os fatores tratamentos e dias de amostragem ($P = 0,0271$) para os dados de ganho de peso (Tabela 3).



Através do teste de Tukey ($P < 0,05$), observa-se que houve diferença significativa entre os dias amostrados nos tratamentos estudados (Tabela 3). No entanto, ao observar os tratamentos em cada amostragem, nota-se que houve diferença significativa apenas aos 90 dias, quando os peixes que receberam o banho de imersão apresentaram o maior ganho de peso (8,68 g), seguidos pelos peixes que receberam ração com hormônio (7,10 g), e o menor ganho de peso, nos peixes que receberam ração sem hormônio (5,14 g).

Na Tabela 4, encontram-se os dados de crescimento e taxa de sobrevivência aos 30 dias do experimento. Pode-se observar que não houve diferença significativa para crescimento ($P = 0,1535$) e taxa de sobrevivência dos peixes ($P = 0,5343$).

Os valores médios de crescimento (mm) para os tratamentos estudados foram 17,72, 13,01 e 15,46 para BI, RH e RS, respectivamente. Guerrero III e Guerrero (1997) afirmaram que o 17- α -metiltestosterona tem pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento de tilápia do Nilo durante o tratamento hormonal.

A taxa de sobrevivência para BI, RH e RS foi 54,29%, 53,87% e 46,06%, respectivamente. Silva (2004) observou que não houve diferença significativa da taxa de sobrevivência entre os peixes tratados ou não com o hormônio masculinizante, corroborando os resultados do presente estudo. Pandiam e Sheela (1995) mostraram que os peixes revertidos sexualmente com hormônio apresentaram baixa taxa de sobrevivência, confirmando os dados deste experimento. Little *et al.* (2000) corroboram com os dados deste trabalho, relatando que a sobrevivência na fase de reversão sexual de tilápia do Nilo foi de 48,4%. Guerrero III e Guerrero (1997) estão de acordo com o presente trabalho, afirmando que a metiltestosterona não tem efeito sobre a sobrevivência na reversão sexual de tilápia do Nilo.



Tabela 4. Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas para as variáveis: crescimento (mm) e taxa de sobrevivência (%), aos 30 dias do experimento com larvas e juvenis de tilápia do Nilo para os tratamentos.

Estatísticas	Variáveis	
	Crescimento (mm)	Taxa de sobrevivência (%)
F para tratamentos	2,20 (0,1535) ^{ns}	0,66 (0,5343) ^{ns}
Levene ⁽¹⁾	3,44 (0,0660) ^{ns}	3,06 (0,0843) ^{ns}
Cramer-von Mises ⁽²⁾	0,07(0,2012) ^{ns}	0,09 (0,1394) ^{ns}
CV (%)	23,08	24,79
Médias dos tratamentos	BI	17,72
	RH	13,01
	RS	15,47

¹ Teste de Levene para homocedasticidade (igualdade das variâncias); ² Teste de Cramer-von Mises para a normalidade dos erros; ^{ns} - não significativo ($P > 0,05$); BI – banho de imersão, RH – ração com hormônio e RS – controle.

4.2. Porcentagem de Machos

A taxa de masculinização dos juvenis de tilápia Nilo encontra-se na Tabela 5. Pode-se observar que houve diferença significativa ($P = 0,0034$) entre os tratamentos. Através do teste de Tukey ($P > 0,05$), pode-se observar que a porcentagem de macho dos tratamentos BI e RH não diferiram significativamente entre si, apresentando valores de 86% e 94%, respectivamente. Galé *et al.* (1999) encontraram valores próximos ao tratamento BI do presente trabalho, com taxa de 83% de indivíduos do sexo masculino. Wassermann e Afonso (2003) observaram valores 91,6% para banho de imersão com MT. Bombardelli *et al.* (2007) encontraram valores de 47% a 71,92% de macho de tilápias após banho de imersão com MT, sendo inferiores aos encontrados no presente trabalho.

Bombardelli *et al.* (2004) apresentaram valores de reversão de 95% a 100%, com o uso de metiltestosterona. Mainardes-Pinto *et al.* (2000) encontraram



valores próximos aos dos autores acima, 96% a 100%. Bocek *et al.* (1992) e Phelps *et al.* (1995) utilizaram dietas com 60 mgMT.kg⁻¹ de ração assim como os autores anterior, fornecidas duas a quatro vezes ao dia na ração, obtiveram populações masculinas entre 95% e 99%, raramente 100%, devido à aparente resistência ao hormônio de 1% a 5% pelas fêmeas tratadas. Borges *et al.* (2005) observaram 62,27% de machos, quando submetidos à temperatura de 27°C, valores próximo ao tratamento controle do presente experimento 68%.

Tabela 5. Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas para a variável porcentagem de machos (%), aos 90 dias do experimento, com juvenis de tilápia do Nilo nos três tratamentos.

Estatísticas	Variável	
	% Macho	
F para tratamentos	9,50 (0,0034)**	
Levene ⁽²⁾	2,4 (0,1331) ^{ns}	
Cramer-von Mises ⁽³⁾	0,09 (0,1353) ^{ns}	
CV (%)	11,68	
Médias dos tratamentos ⁽¹⁾	BI	86 ^a
	RH	94 ^a
	RS	68 ^b

¹ Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$); ² Teste de Levene para homocedasticidade (igualdade das variâncias); ³ Teste de Cramer-von Mises para a normalidade dos erros; ^{ns} - não significativo ($P>0,05$); ** - significativo ($P<0,01$); BI – banho de imersão, RH – ração com hormônio e RS – controle.

4.3. Concentração da Testosterona

Os dados médios de concentração de testosterona (ngT.g⁻¹ carcaça) entre os tratamentos encontram-se na Tabela 6. Pode-se observar que houve diferença significativa para os tratamentos estudados ($P = 0,0118$), ao nível de 5% de probabilidade.



Pelo teste de Tukey, observa-se que a concentração de testosterona na carcaça dos peixes que receberam hormônio (BI e RH) diferiu significativamente do controle (RS), apresentando as médias de 1,8907, 2,1387 e 0,8080 ngT.g⁻¹ para os tratamentos BI, RH e RS, respectivamente. Discordando do presente estudo, Rothbard *et al.* (1990) observaram que tilápias do Nilo revertidas sexualmente, os valores encontrados da concentração de testosterona foram de 11,1 ngT.mL⁻¹ de plasma, para machos ativos e valores de 37,8 ngT.mL em machos revertidos.

Os mesmos autores mediram a redução da radioatividade em vários tecidos, em razão do tempo de larvas de *Oreochromis aureus* alimentadas com ração contendo MT radiomarcada (60 mgMT.kg⁻¹ de ração). O MT marcado emite radioatividade, indicando a quantidade do hormônio no músculo. Os autores testaram dois tratamentos: ração com hormônio, durante 11 semanas, e o outro com duas semanas. As amostragens foram nos dias zero, 1, 2, 3, 7, 14 e 28 após finalizar o experimento. Os valores encontrados para o tratamento com hormônio durante 11 semanas foram 140 e 170 ngMT.g⁻¹ de músculo, para os dias 0 e 1, respectivamente após o fim da aplicação hormonal. No terceiro dia, houve uma diminuição da concentração, atingindo 20 ngMT.g⁻¹ e no quinto dia, elevação novamente para 50 ngMT.g⁻¹ de músculo. A concentração do hormônio no peixe com 600 g (comercial) foi menor que 8,2 ngMT.g⁻¹.



Tabela 6. Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas na variável; concentração de testosterona na carcaça (ngT.g^{-1} carcaça) entre os tratamentos: banho de imersão (BI), ração com hormônio (RH) e ração sem hormônio (RS), com larvas e juvenis de tilápia do Nilo.

Estatísticas	Variável	
	Concentração de Testosterona (ngT.g^{-1} carcaça)	
F para tratamentos	5,17 (P = 0,0118)*	
F para Rep. (Trat)	0,54 (P = 0,8693) ^{ns}	
F para dias de amost.	2,25 (P = 0,0658) ^{ns}	
F para (Trat. X dias de amost.)	0,50 (P = 0,9005) ^{ns}	
CV (%)	55,92	
Médias	BI	1,8907 ^a
Tratamentos ⁽¹⁾	RH	2,1387 ^a
	RS	0,8080 ^b

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P > 0,05$); ^{ns} - não significativo ($P > 0,05$); * - significativo ($P < 0,05$).

Os dados de concentração de testosterona na carcaça de larvas e juvenis de tilápia em relação ao tempo de amostragem estão presentes na Tabela 7.

No primeiro dia de amostragem, não foi possível aplicar a estatística (houve apenas uma amostragem por tratamento), porque foi utilizado um “pool” de 0,5 g de carcaça para as análises da concentração de testosterona, pois as larvas pesavam aproximadamente 0,009 g, e a quantidade necessária seria muito grande (± 60 larvas para cada parcela), comprometendo o início do experimento, pois a quantidade de larvas disponíveis das três desovas não seria o suficiente. No 37^o dia, também houve apenas uma amostragem por tratamento, por não haver poços suficientes no “kit” para muitas amostragens.

Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos aos 30, 40, 45 e 90 dias.

Aos 30 dias de amostragem, o valor da concentração de testosterona na carcaça dos peixes submetidos aos tratamentos BI e RH não



diferiram significativamente entre si (2,668 e 1,560 ngT.g⁻¹, respectivamente). Os peixes que receberam a ração sem hormônio (RS) apresentaram a menor concentração de testosterona na carcaça (0,636 ngT.g⁻¹), mas não diferiu significativamente dos peixes do tratamento RH (Tabela 7). Sower e Iwamoto (1985) observaram que o uso de testosterona em ração comercial para peixe pode influenciar em várias funções fisiológicas, como maturidade sexual, desenvolvimento das gônadas e testículos. Os níveis de testosterona encontrados em *Acipenser baeri* foram de 0,40 ng.g⁻¹ (dieta com 1 mg de testosterona) até 7,0 ng.g⁻¹ (dieta com 10 mg de testosterona), valores próximos aos encontrados neste experimento.

Hirschenhauser *et al.* (2004) disseram que a Keto-testosterona é o hormônio mais efetivo na geração e estimulação das características secundárias sexuais, reprodução, espermatogêneses e na ovulação em *Oreochromis niloticus*.

Aos 40 dias experimentais (Tabela 7), os peixes submetidos ao tratamento RH apresentaram a maior concentração de testosterona na carcaça (1,784 ngT.g⁻¹), diferindo significativamente dos demais. Davie e Thorarensen (1997) estudaram o efeito anabolizante do hormônio natural (testosterona) e o sintético (17- α -metiltestosterona) em truta arco-íris. Utilizaram 30 mg de cada hormônio misturados a 500 μ L de óleo de cacau e aplicado na cavidade peitoral. Após 42 dias, os níveis de testosterona no controle foi de $6,1 \pm 3$ ngT.mL⁻¹ plasma, no tratamento com testosterona $14,44 \pm 0,84$ ngT.mL⁻¹ e no tratamento com 17- α -metiltestosterona $10,35 \pm 1,45$ ngT.mL⁻¹ plasma.

Comportamentos semelhantes ocorreram aos 45 e 90 dias (Tabela 7), quando a concentração de testosterona dos peixes do tratamento RH (2,322 e 2,812 ngT.g⁻¹, respectivamente), diferiram significativamente apenas do controle (0,696 e 1,206 ngT.g⁻¹).



Tabela 7. Testes de hipóteses na análise de variância e médias obtidas na variável concentração de testosterona na carcaça ($\text{ngT}\cdot\text{g}^{-1}$) dos peixes das amostragens, no início, 30, 37, 40, 45, 60 e 90 dias após o início do experimento, dentro de cada tratamento: banho de imersão (BI), ração com hormônio (RH) e ração sem hormônio (RH) em larvas e juvenis de tilápia do Nilo.

Estatísticas	Variáveis						
	1 ^(A)	30	37 ^(A)	40	45	60	90
F para tratamentos	-	6,21 (P = 0,0202)*	-	13,57 (P = 0,0059)**	6,19 (P = 0,0178)*	2,10 (P = 0,1853) ^{ns}	4,52 (P = 0,0438)*
CV (%)	-	54,6	-	27,85	46,69	66,07	35,71
Médias	BI 0,5040	2,6680 ^a	1,7160	0,7960 ^b	1,6770 ^{ab}	2,3084 ^a	2,3136 ^{ab}
Tratamentos ⁽¹⁾	RH 0,6720	1,5600 ^{ab}	2,6640	1,7840 ^a	2,3220 ^a	2,6612 ^a	2,8120 ^a
	RS 0,3600	0,6360 ^b	0,6200	0,6120 ^b	0,6960 ^b	1,0183 ^a	1,2060 ^b

¹ Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tuckey (P>0,05); ^A Coletado apenas uma amostra por tratamento; ^{ns} - não significativo (P>0,05); * - significativo (P<0,05); ** - significativo (P<0,01).



A concentração de testosterona em “tinca-tinca” (*Chelidonichthys kumu*) nos peixes controle foi de 1,0 ngT.mL⁻¹ no plasma. Os peixes que receberam 80 mgT.kg⁻¹ de peixe apresentaram, após 35 dias a concentração de 20 ngT.mL⁻¹ de plasma (Vaimikka *et al.*, 2005), considerando que as quantidades de hormônio encontrada no plasma foram superiores ao presente experimento que utilizou a carcaça do peixe.

Não houve diferença significativa na concentração de testosterona dos peixes nos diferentes tratamentos aos 60 dias de amostragem variando de 1,018 a 2,661 ngT.g⁻¹ de carcaça (Tabela 7).

Em “yellowfin tuna” (*Thunnus albacares*) Stéquent *et al.* (2001) verificaram que, de fevereiro até outubro, a concentração média de testosterona era de 7 a 13 ngT.mL⁻¹ no plasma e de novembro a janeiro (período chuvoso) obteve um pico de 25 ngT.mL⁻¹ no plasma (fase de reprodução).

Rinchard *et al.* (1999) utilizaram 15 ngMT na ração para a reversão sexual de peixes “muskellunge” (*Esox mosquinogy*), durante 60 dias, e obtiveram 65% de machos e 18 ngMT.mL⁻¹ no plasma. Após o período de quatro a dez dias do término da aplicação do hormônio, os níveis de testosterona diminuíram em até 90%, como no presente trabalho, voltando aos valores normais após 21 dias do final do experimento.

Nash *et al.* (2000) observaram que, em um período de 30 horas, a concentração de testosterona na maioria trutas arco-íris, esteve entre 2 a 4 ng.mL⁻¹ no plasma e, em três períodos, observaram picos de 13, 11 e 16 ng.mL⁻¹ no plasma com auxílio de um cateter na aorta dorsal.

Observando a Figura 19, nota-se um pico de testosterona aos 30 dias, quando as larvas foram submetidas ao banho de imersão, enquanto as larvas alimentadas com hormônio na ração apresentaram um pico de testosterona aos



37 dias. A seguir, tanto BI quanto RH diminuíram os valores até 40 dias, e após houve um aumento nas concentrações de testosterona, nos dois tratamentos (RH e BI), sugerindo que o hormônio utilizado na reversão sexual das tilápias pode ter influenciado no processo de maturação sexual dos peixes.

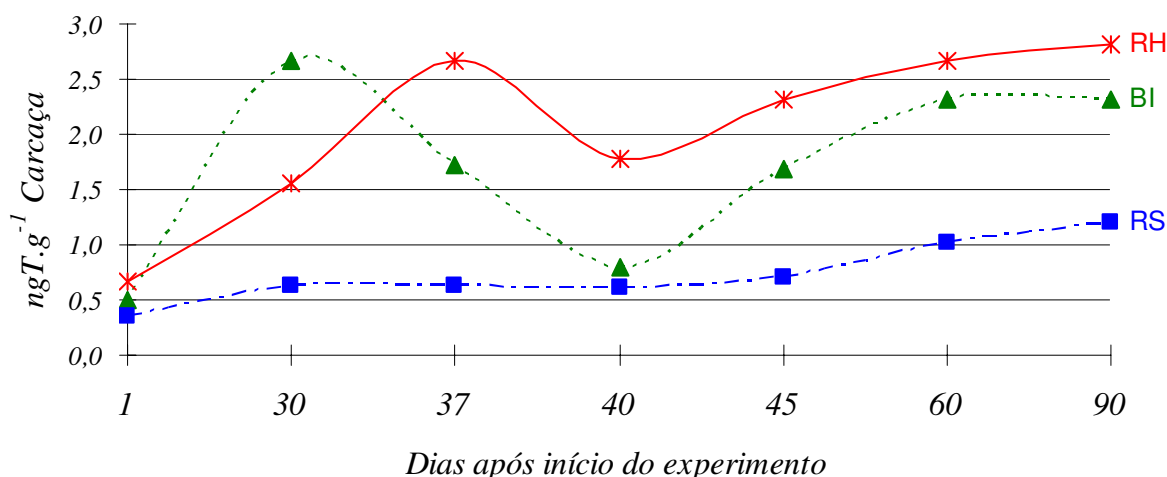


Figura 19. Curva da concentração de testosterona na carcaça de larvas e juvenis de tilápia do Nilo, no período inicial, no 30^o, 37^o, 40^o, 45^o, 60^o e 90^o dias após o início do experimento, nos tratamentos ração com hormônio (RH), banho de imersão (BI) e controle (RS) em nanograma (ng) do hormônio (MT) por grama (g) de carcaça de tilápia do Nilo. O valor do desvio padrão para cada curva de concentração dentro dos tratamentos (RH, BI, e RS) foram, respectivamente, 1,088, 0,899 e 0,577; e para o coeficiente de correlação foram, respectivamente, os seguintes: 0,849, 0,598 e 0,967.

O efeito do uso do 17- α -metiltestosterona no processo de reversão sexual em ciclídeos, induz à diferenciação gonadal para machos, aceleram o processo de maturação dos espermatozoides (Carvalho, 1985) discordando de Rothbard *et al.* (1990), que o tratamento de larvas com andrógenos (testosterona) não afetam os níveis de testosterona plasmática dos peixes quando atingem a maturidade sexual. Afirma ainda que os baixos níveis de testosterona em peixes revertidos podem estar relacionados com a ausência de fêmeas nos viveiros.



Dados observados no presente experimento mostraram que a testosterona induz o processo de maturação dos machos. O elevado nível de testosterona observado em *Oreochromis mossambicus* (18 ngT.mL⁻¹ de plasma em machos e 9,5 ngT.mL⁻¹ de plasma fêmeas) foi devido à maturidade sexual e ao processo de ovulação (Rocha e Reis-Henriques, 1996).

Lee *et al.* (1995) relatam que a indução do MT em garoupa (*Epinephelus tauvina*) provoca alterações nas gônadas e degeneração dos tecidos ovarianos, resultando em um efeito direto nos ovários e uma proliferação de espermatogônias, ocorrendo uma mudança no metabolismo gonadal, durante a indução sexual, sendo produzido o 11-oxoandrógeno pelos tecidos gonadais dos machos. Em "*Monopterus albus*", após desova, é reduzido o acúmulo excessivo de MT, durante essa fase de inatividade reprodutiva (Yeung *et al.*, 1993).

Goudie *et al.* (1986) estudaram tilápias submetidas à reversão sexual e mostraram uma rápida diminuição do MT radioativo no músculo, sendo 90% do hormônio marcado, eliminado em menos de 24 horas e, menos de 1% representando 5 ngMT.g⁻¹ de tecido, pôde ser detectado em 21 dias após o final do tratamento.

Budworth e Senger (1993) afirmaram que, após terem injetado um miligrama de testosterona em truta arco-íris, observaram, nas primeiras horas, um pico de 20 ng.mL⁻¹, quando os peixes apresentaram um intervalo de 150 a 185 ngT.mL⁻¹ no plasma. Com o tempo, esse hormônio foi eliminado para a água do aquário, sendo, depois de 12 horas, observadas concentrações de 1 ngT.mL⁻¹.

A ração desperdiçada, não ingerida ou não metabolizada pode liberar quantidade significativa de metiltestosterona nos tanques de cultivo de reversão sexual de tilápia, colocando em risco à exposição de metiltestosterona ao trabalhador e os organismos aquáticos e terrestres. Contreras Sánchez *et al.*



(2000) e Fitzpatrick *et al.* (2000) observaram que a metiltestosterona acumulou-se nos sedimentos dos tanques em níveis de 2 a 6 ng.g⁻¹, 28 dias após o início do tratamento hormonal e após 84 dias, os níveis de testosterona foram de 2,8 ng.g⁻¹. Isso demonstra a persistência da metiltestosterona no solo por aproximadamente três meses após cessar o tratamento.

Phelps *et al.* (2000) observaram que durante o experimento, houve uma elevação da concentração do MT na água até o 14^º dia. Logo após, a curva de crescimento começou a diminuir, mas aumentou os níveis de testosterona nos sedimentos. Kirk *et al.* (2002) relataram que os andrógenos estão presentes em efluentes de estação de tratamento de esgoto, com uma concentração variando entre 2 a 4.033 ng.L⁻¹ de dihidrotestosterona e, em águas fluviais, as concentrações de andrógenos estavam acima de 100 ng.L⁻¹.



6. Conclusões

Os dados do presente trabalho permitiram concluir que:

- Para a reversão sexual da tilápia pode-se utilizar a ração com hormônio ou o banho de imersão, embora a ração contendo hormônio mostrasse taxas mais elevadas de masculinização.

- As concentrações de testosterona na carcaça foram maiores para o tratamento ração com hormônio, embora não se tenha diferenciado do banho de imersão.

- As concentrações de testosterona aumentam com a ingestão e/ou absorção do hormônio, eliminando em até dez dias após o final do tratamento.

- Provavelmente, o hormônio 17- α -metiltestosterona, induziu à maturação sexual dos machos tratados, uma vez que os níveis hormonais voltaram a subir, após a eliminação do hormônio, diferenciando dos animais que não havia contato com a indução hormonal.



7. Referências

AFONSO, L. O. B.; LEBOUTE, E. M. Método para sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus*. In: **ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA**, 4, Porto Alegre, RS. *Anais...* Porto Alegre, RS, 1993. p. 100-3. 1993.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effects of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX - XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam v. 1/2, n. 142, p.187-199, 2001.

BAROILLER, J. F.; D´COTTA, H. Environment and Sex determination in farmed fish. **Comp. Biochem. Physio. Part C**, Beaulieu, v. 130, n. 4, p. 399-409, 2001.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v.197, n. 1, p. 283-301, 2001.

BEHRENDTS, L. L.; SMITHERMAN, R. O. Development of cold tolerance population of red tilapia through introgressive hybridization, **J. World Maric. Soc.** Louisiana, v. 15, n. 1, p. 172–178, 1984.

BOCEK, A.; PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Effect of feeding frequency on Sex-reversal and on growth of Nilo tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Appl. Aquac.**, Binghamton, v. 1 n. 3 p. 97-103, 1992.



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

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C. Masculinization of larvae of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) by immersion baths with alpha-methyltestosterone. **Rev. Bras. Zootec.**, Maringá v. 34, n. 2, p. 365-372, 2005.

BOMBARDELLI R. A.; SANCHES E. A.; HENRIQUE PINTO D. F.; MARCOS R. M.; BARBERO L. Idade de maior sensibilidade de tilápias-do-Nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Rev. Bras. Zootec.** Viçosa, v.36 n.1, p. 1-6, 2007.

BORGES, A. M.; MORETTI, J. O. C.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Produção de populações monosexo macho de tilápia-do-Nilo da linhagem Chitralada, **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.40, n.2, p.153-159, 2005.

BOYD, C. Water quality management for ponds fish culture. 9. ed. *In*:_____. **Developments in aquaculture and fisheries science**. New York: Elsevier, 1992. 482p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 51 de 24 de maio de 1991. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 de maio de 1991. Seção I. p. 9989.



BRASIL. MINISTROS DE ESTADO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA. **Relatório apresentado pelos membros da comissão nomeada pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária através da portaria n.º. 51 sobre o uso de promotores do crescimento hormonal em pecuária de corte.** Brasília, 1994. 130p.

BRINN, R. P.; URBINATI, E. C. **Cortisol exógeno em Matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae, Günther, 1869): variáveis fisiológicas na maturação final e crescimento inicial da prole.** 86 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, CAUNESP Jaboticabal – SP, 2003.

BUDWORTH, P. R.; SENGER, P. L. Fish-to-fish testosterone transfer in a recirculation-water system. **Prog. Fish-Cult.**, Washington, v. 55, n. 1, p. 250-254, 1993.

CARDOSO, O. M. C.; SILVA, T. J. P.; SANTOS, W. L. M. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranol em fígado de bovinos abatidos no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 1001–1014, 1999.

CARVALHO, E. D. **Indução da reversão de sexo em *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) com uso do hormônio masculinizante 17- α -metiltestosterona: freqüência de machos e crescimento.** 1985. 166 p.



Dissertação (Mestrado em Ecologia) Depto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1985.

COLLINS, S. S.; BELK, K. E.; CROSS, H. R. The EEC ban against growth-promoting hormones. **Nutr. Rev.**, Texas, v. 47, n. 8, p. 238-246, 1989.

CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; FITZPATRICK, M. S.; MILTON, R. H.; SCHRECK, C. B. Masculinization of Nile tilapia with steroids: Alternative treatments and environmental effects. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6., 2000, Bergen. **Proceedings of the Sixth**, p. 205-252.

CURTIS, L. R.; DIREN, F. T.; HURLEY, M. D.; SEIM, W. K.; TUBB. R. A. Disposition and elimination of 17- α -methyltestosterone in Nile tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 99 n. 1, p. 193-201, 1991.

DAVIE, P. S.; THORARENSEN, H. Heart growth in rainbow trout in response to exogenous testosterone and 17- α -metilttestosterona, **Comp. Biochem. Physiol.**, Birmingham, v. 117, n. 2, p. 227-230, 1997.

D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J. F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Mol. Reprod. Dev.**, Hoboken, v. 59, n. 3, p.265-276, 2001



DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; ZANARDI, M. F.; NAKAGHI, L. S. O.; VALENTIN, F. N.; MALHEIROS, E. B. Efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento e reversão sexual de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), variedade Chitralada. In: AQUACIENCIA 2006a. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. **Efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento e reversão sexual de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), variedade Chitralada.** CD-ROOM

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; GABRIEL NETO, A.; STÉFANI, M. V. de; ZANARDI, M. F.; TAKAHASHI, E. L. H.; SANTOS, M. A. dos; MALHEIROS, E. B. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir do banho de imersão com diferentes doses de hormônio 17- α -metiltestosterona. In: AQUACIENCIA 2006b. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. **Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir do banho de imersão com diferentes doses de hormônio 17- α -metiltestosterona.** CD-ROOM

DIAZ, M. **Análisis de viabilidad y crecimiento hasta el levante de triploides y diploides de tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*, Linné).** Manaus: p.33-45, INPA, 1994. p. 33-45. (Boletim Científico, 2).

DUARTE, K. M. R.; SILVA, F. M. S. M.; MEIRELLES, C. F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção, 2002, **Cienc. Rur.**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 731-737, 2002.



EPSTEIN, S. S. Chemical additives in beef industry. Section on environmental health policy. **Int. J. Health Serv.**, New York, v. 20, n. 2, p. 277-280, 1990.

FITZPATRICK, M. S.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; SCHRECK, C. B. Methyltestosterone persist in the environment after use for masculinizing Nile tilapia. In: HART, B.; BROWN, B., Book of abstracts, **Aquaculture America 2000**. World Aquaculture Society, New Orleans, Louisiana, p. 112. 2000.

GALE, W. L.; FITZPATRICK, M. S.; LUCERO, M.; CONTRERAS-SANCHEZ, W. M.; SCHRECK, C. B. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. **Aquaculture**, Amsterdam, v.178, n. 1 p. 349-357, 1999.

GANNAM, A.; LOVELL, R. T. Effects of feeding 17-alfametilttestosterona, 11-ketosterona, 17-beta-estradiol, and 3,5,3'-triidothyronine to channel catfish, *Ictalurus punctatus*, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 377-388, 1991.

GOLTERMAN, H, L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwaters**. 2. ed. Oxford: 1978. p.213. (IBP Handbook 8).

GOMELSKY, B., CHERFAS, N. B.; PERETZ, Y.; BEM-DOM, N.; HULATA, G.; Hormonal sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 265-270, 1994.



GOUDIE, C. A.; SHELTON, W. L. PARKER, N. C. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated blue tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 58, n. 3/4, p. 215-226. 1986.

GUERRERO III, R.D. GUERRERO L.A. Effects of Androstenedione and methyltestosterone on *Oreochromis niloticus* Fry treated for sex reversal in outdoor Net Enclosure. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE**, 4., 1997, Orlando. Proceedings... v.12, n. 1, 1997, p.772-777. 1997.

GUERRERO III, R. D.; SHELTON, W. L. An aceto-carminic squash Method for sexing juvenile fish. **Progr. Fish-Cult.**, Washington, v. 36, n. 1, p. 56, 1974.

HEITZMAN, R. J. Coordination of information on residues of veterinary drugs in the European Community. **Anal. Chim. Acta**, Bethesda, v. 275, n. 1/2, p.17-22, 1983.

HIOTT, A. E.; PHELPS, R. P. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 112, n. 4, 301-308, 1993.

HIRSCHENHAUSER, K.; TALORSKY, M.; OLIVERA, T.; CENÁRIO, A. V. N.; OLIVEIRA, R. F. A test of the challenge hypothesis in cichlid fish, In: Simulated partner and territory intruder experiments, **Anim. Behav.**, Bloomington v. 68, n. 4, p. 741-750. 2004.



HOFFMAN, B.; BLIETZ, C. Application of radioimmunoassay (RIA) for the determination of residues of anabolic sex hormones. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v. 57, n. 1, p.239-246, 1983.

JESUS, E. G. de; HIRANO, T.; INUI, Y. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Colorado, v. 82, n. 1 p. 369-376, 1991.

JOHNSTONE, R.; MACINTOSH, D. J.; WRIGHT, R. S. Elimination of orally administered 17α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (Tilápia) and *Salmo gairdneri* (Rainbow trout) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 249-257, 1983.

KARAYÜCEL, I.; PENMAN, D.; KARAYÜCEL, S.; McANDREW, B. Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Isr. J. Aquacult.**, Bamidgeh, v. 55, n. 1, p. 114-122, 2003.

KIRK, L. A.; TYLER, C. R.; LYE, C. M.; SUMPTER, J. P. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. **Environ. Tox. Chem.**, Brussels, v. 21, n. 5, 972-979. 2002.

KUBITZA, F. Tilápia - **tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2000. 289 p.



KUSTER, M.; ALDA, M. de.; BARCELÓ, D. Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil. **Handb. Environ. Chem.**, Barcelona, v. 5, n. 10, p. 1-24. 2005.

LEONHARDT, J. H.; URBINATI, E. C. Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). 1997. 128p. **Tese** (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal 1997.

LEE, S. T. L.; KIME, D. E.; CHAO, T. M.; LIM H. S.; CHOU, R.; LAM, T. J.; TAN, C. H. *In Vitro* metabolism of testosterone by gonads of the grouper (*Epinephelus tauvina*) before and after sex onversion with 17- α -metiltestosterona. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 99. n. 1, p. 41-49, 1995.

LITTLE, D. C.; COWARD, K.; BHUEL, R. C.; PHAM, T. A. Effect of broodfish exchange strategy on the spawning performance and sex steroid hormone levels of *Oreochromis niloticus* broodfish in hapas. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 186, n. 44, p.77-88, 2000.

LONE, K. P. Natural Sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods and epidemiology. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, London, v. 37, n. 2, p. 93-209, 1997.



LOVSHIN, L. L. Tilápia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In.: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Panorama Aqüicultura, 1997. Anais... p.137-164.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; DE CAMPOS, B. E. S.; DA SILVA, A. L. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17 a-Metiltestosterona, **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.

McANDREW, B. J. Sex control in tilapiines In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. (Ed.) **Recent advances in aquaculture IV**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 87- 98.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; Mauerwerk, V. L.A.; Freccia, A. Uso da *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. CD-ROM

NASH, J. P.; DAVAIL-CUISSET, B.; BHATTACHARYYA, S. SUTER, H. C.; Le MENN, F.; KIME, D. E.; An enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17, 20 β -dihydroxy-4-pregenn-3-one using acetylcholinesterase as tracer: application to measurement of diet patterns in



rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol. Biochem.**, Talence, v.22, n. 4, p.355-363, 2000.

PALERMO NETO, J. Anabolizante e pecuária de corte. **Rev. Educ. Cont. CRMV – São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 10-15, 1998.

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

PATTERSON, R. L.; SALTER, L. J. Anabolic agents and meat quality: a review. **Meat Science**, Savoy, v. 14, n. 4, p. 191-220, 1985.

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

PHELPS, R. P; SALAZAR, G. C.; ABE, V.; ARGUE, B. Sex reversal and nursery growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), free-swimming in earthen ponds. **Aquac. Res.** Malden, v. 26, n. 1, p. 293-295. 1995.

PHELPS, R. P.; POLPMA, T. J. Sex reversal of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J.E. (Eds.) Tilapia aquaculture in the Americas. Louisiana: **World Aquacult. Soc.**, v. 2, n. 1, p.34-59, 2000.

PHELPS, R. P.; FITZPATRICK, M. S.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; WARRINGTON, R. I.; ARNDT, J. T. Detection of MT in pond water after treatment



witch MT food. Report. **Pond Dynamics/Aquaculture CRSP**. Oregon States University, Covallis, Oregon, p. 57-59, 2000.

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

POPMA, T. J., PHELPS, R. P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling productions techniques. In: **AQUICULTURA BRASIL'98**, 1998, Recife. *Anais...* Recife: SIMBRAQ, 1998. p.127-145. 1998.

RANA, K. Reproductive biology and the hatchery rearing of tilapia eggs and fry. **In: MUIR, J. F. ROBERTS, R. J. (Edit)**. Recent advances in aquaculture, Croom London, Helm, 1988, v. 3, p. 349-406.

RICO, A. G. Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. **J. Anim. Sci.**, Savou, v. 57, n. 1, p. 226-232, 1983.

RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; GARCIA-ABIADO, M. A.; OTTOBRE, J. Uptake and depletion of plasma 17- α -metylttestosterone during induction of masculinization in muskellunge (*Esox masquinongy*). In: _____. **Effect on plasma steroids and sex reversal..** v. 64, n.1, p. 512-525. 1999. (Steroids)

ROCHA, M. J.; REIS-HENRIQUES, M. A. Plasma and urine level of C₁₈, C₁₉ and C₂₁ steroids in na *Asynchronous fish*, the tilapia *Oreochromis mossambicus*



(*Teleostei, Cichlidae*). **Comp. Biochem. Physiol.**, Birmingham, v. 115, n. 3. p. 257-264, 1996.

ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B. L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17- α -ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. **Aquaculture**, Amsterdam v. 89, n. 3/4, p. 365-376 1990.

SHELTON, W. L.; HOPKINS, K. D.; JENSEN, G. L. Use of hormones to produce monosex tilapia for aquaculture. In: SMITHERMAN, R. O. SHELTON, W. L., GROVER, J. H. (Ed). **Culture of exotic fishes symposium**. Alabama University: Fish Culture Section/ Animal Fishers Society Auburn, p.10-33. 1978.

SIMONE, D. A. The effects of the synthetic steroid 17- α -metilttestosterone on the growth and organ morphology on the chanel (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**. Amsterdam. v. 84, n. 1, p. 81-93. 1990.

SILVA, C. A. H. **Utilização de dietas microencapsuladas para reversão sexual de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 47p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centeo de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal: Finep, 1995. 70 p.



SOWER, S. A.; IWAMOTO, R. N. The identification of sex steroid, testosterone in various commercial salmon diets, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 11-17, 1985.

SPECKER, J. L.; CHANDLEE, M. K. Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 217, n. 1, p. 663-672, 2003.

STÉQUERT, B.; RODRIGUEZ, J. N.; CUSSET, B.; LE MENN, F. Gonadosomatic index and seasonal variations of plasma sex steroids in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the western Indian ocean, **Aquat. Living. Resour**, Les Ulis, v.14, n. 1, p. 313-318, 2001.

THORGAARD, G.H. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W.S.; D.J. Randall; E.M. Donaldson (eds). **Fish Physiology**, New York, Academic Press, v.9B, n. 1, p. 405-434. 1983.

VAIMIKKA, A.; JOKINEN, E. T.; KORTEL, R.; PAUKKU, S.; PIRHONEN, J. RANTALAS, M. J.; TASKINEN, J.; Effects of testosterone and β -glucan on immune functions in tench. **J. Fish Biol.** v. 66, n. 1, p. 348-361, 2005.



VIJAYAN, M. M.; BALLANTYNE, J. S.; LEATHERLAND, J. F. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 82, n. 3, p. 476 -486, 1991.

ZANARDI, M. F.; DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; SANTOS, M. A. dos Comparação entre métodos de reversão sexual de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), variedade Chitralada. In: AquaCiências 2006: 2006, Bento Gonçalves - RS, **Anais...** CD-ROOM

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 113-139, 2002.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersio. **Aquacult. Res.**, Malden, v. 34, n. 1, p. 657, 2003.

WOHLFARTH, G. W.; HULATA, G. I. **Applied genetics of tilapias**. Manila: ICLARM Studies and Reviews, 1981 v.6, 26 p.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.33, n. 1, p. 329-354, 1983.

YEUNG, W. S. B.; CHEN, H.; CHAN, S. T. H. The *in vitro* metabolism of radioactive androstenedione and testosterone by the gonads of the protogynous



Monopterus albus at different sexual phase: a time course and seasonal study.

Gen. Comp. Endocrinol, New York, v. 89, n.1, p. 313-322, 1993.

YOSHIOKA, M.; OKUMURA, T.; AIDA, K.; FUJISE, Y. A proposed technique for quantifying muscle progesterone content in minke whales *Balaenoptera acutorostrata*. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 72, n. 2, p. 368-370, 1994.



ANEXOS



Anexo 1

Solução Tampão Fosfata Salina com Gelatina

Ingredientes:

- Fosfato de sódio dibásico (10 mM) - HNa_2PO_4
 - Fosfato de sódio monobásico (10 mM) NaH_2PO_4
 - Cloreto de sódio (140 mM) NaCl
 - Gelatina de microbiologia (marca Merck)
-
- SOLUÇÃO A: pese 0,7098 g de fosfato de sódio dibásico em 500 mL água destilada.
 - SOLUÇÃO B: pese 0,68995 g de fosfato de sódio monobásico para 100 mL de água destilada.
 - Pese 4,098 g de cloreto de sódio
 - Pese 0,5 g de gelatina.

Preparo:

Com o auxílio de um peagâmetro em um termômetro coloque no agitador com purga 400 mL da solução A e adicione a solução B vagorosamente até que o pH estabilize em 7,3 (± 450 mL).

Depois de misturado diluir o NaCl e a gelatina em ± 150 mL da solução A + B, aquecendo a 30°C (não deixe ultrapassar 40°C) e conserve em $\pm 6^\circ\text{C}$ por no máximo 7 dias.



Anexo 2

Porcentagem de recuperação hormonal.

- Validação da metodologia de extração para valores de 0, 1, 3, 6 e 12 ng de MT.

- SOLUÇÃO A: pesa-se em uma balança analítica 10 mg de 17- α -metiltestosterona, dissolva em um mL de álcool absoluto e complete o volume com PBSG até atingir 10 mL em um balão volumétrico de 10 mL, tendo uma concentração de (1 mg de MT.mL⁻¹).
- SOLUÇÃO B: pegue 100 μ L da solução A, coloque em um balão volumétrico de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 10 mL, tendo uma concentração de (10 μ g de MT.mL⁻¹).
- SOLUÇÃO C: pegue 100 μ L da solução B, coloque em um balão volumétrico de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 10 mL, tendo uma concentração de (100 ng de MT.mL⁻¹).
- SOLUÇÃO D: pegue 100 μ L da solução C, coloque em um balão volumétrico de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 10 mL, tendo uma concentração de (10 ng de MT.mL⁻¹).



- SOLUÇÃO E: pegue 1,8 mL da solução C, com uma pipeta graduada coloque em um balão volumétrico de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 10 mL, tendo uma concentração de (18 ng de MT. mL⁻¹).
- SOLUÇÃO F: pegue 1 mL da solução E, coloque em uma proveta graduada de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 6 mL, tendo uma concentração de (3 ng de MT.mL⁻¹).
- SOLUÇÃO G: pegue 1 mL da solução E, coloque em uma proveta graduada de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 3 mL, tendo uma concentração de (6 ng de MT.mL⁻¹).
- SOLUÇÃO H: pegue 2 mL da solução E, coloque em uma proveta graduada de 10 mL e complete com PBSG até atingir os 3 mL, tendo uma concentração de (12 ng de MT.mL⁻¹).