



Estado do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO HORMÔNIO 17 α - METILTESTOSTERONA

Daniella Ventura Nogueira

Toledo – Paraná – Brasil

2019



Estado do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO HORMÔNIO 17 α - METILTESTOSTERONA

Daniella Ventura Nogueira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/Campus Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Cleber Antonio Lindino
Co-orientador: Nyamien Yahaut Sebastien
Orientador Externo: Luciana Paula Grégio D'Arce

Toledo – Paraná – Brasil

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Nogueira, Daniella Ventura
Avaliação ecotoxicológica do hormônio 17a-
metiltestosterona / Daniella Ventura Nogueira;
orientador(a), Cleber Antônio Lindino; coorientador(a),
Nyamien Yahaut Sebastien, coorientador(a)II, Luciana Paula
Grégio D'Arce, 2019.
63 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e
Ciências Exatas, Graduação em Ciências Biológicas Programa de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2019.

1. Ecotoxicidade/Ecotoxicologia. 2. Hormônio Esteróide.
3. Mutagenicidade e Genotoxicidade. I. Lindino, Cleber
Antônio. II. Sebastien, Nyamien Yahaut. III. D'Arce,
Luciana Paula Grégio. IV. Título.

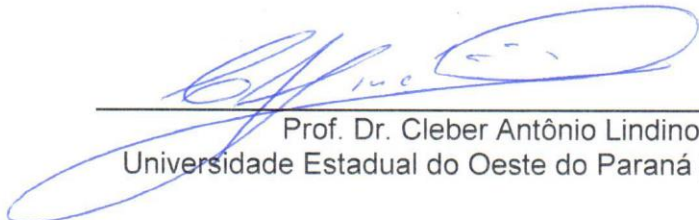
FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniella Ventura Nogueira

“Avaliação ecotoxicológica do hormônio 17 α -metiltestosterona”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Cleber Antônio Lindino
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Profª. Drª. Dilcemara Cristina Zenatti
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Márcia Antônia Bartolomeu Agustini
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em: 09 de setembro de 2019.

Local de defesa: Auditório do Gerpel – Unioeste Toledo.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às duas princesas que enchem minha vida, Emanuelli e Isabella, minhas filhas amadas. De certo modo isso tomou um pouco do tempo que era delas, mas consegui levar casa, filhas e estudo, e agradeço a Deus a oportunidade de poder as ver crescer de perto, mesmo com toda a correria. Elas que me deram vida, na verdade, elas que me deram luz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que eu chegasse até aqui, me capacitando. Seu colo é onde acho refúgio, é minha fortaleza, é onde encontro forças e é onde encontro paz. A Ele seja toda honra e toda glória. Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço a minha mãe, que sempre esteve ao meu lado, me deu forças através de suas palavras e de suas atitudes, me ajudando em todas as coisas, me impulsionando, se não fosse suas ajudas incessantes não teria concluído, tu sabes.

Agradeço ao meu marido Adriano pela força, ajuda e disposição em ficar com nossas filhas para que pudesse me dedicar aos dias no laboratório.

Agradeço ao meu orientador Cleber Lindino e meu coorientador Nyamien Sebastien, pelas suas grandiosas orientações, me mostrando o caminho a seguir no projeto, pela atenção, paciência e compreensão.

Agradeço à minha coorientadora Luciana D'Arce Rodrigues, que me recebeu de braços abertos em Cascavel e compartilhou comigo suas técnicas e me auxiliou muito nos testes e nas dúvidas com muito carinho e disposição.

Agradeço aos meus colegas Rayana, Guido e Alex pelas risadas, pelos desabafos, pelos cafés e pela ajuda sempre que precisei.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro.

“Ainda que eu conhecesse todo mistério e toda a ciência, se não tivesse amor, nada seria”.

1 Coríntios 13:2

הַעוֹלָם מֶלֶךְ, לְהִינּוּ-אֵלֵינוּ אֱלֹהֵינוּ אֱתָהּ בְרוּךְ

"BARUKH ATAH

ADONAI ELOHEINU MELEKH HÁ'OLAM”.

Bendito sejas, ADONAI, nosso Deus, Rei do Universo!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	17
PISCICULTURA E A 17A-METILTESTOSTERONA (MT).....	18
TOXICOLOGIA – TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	21
MATERIAL E MÉTODOS	25
CULTIVO DE <i>Daphnia magna</i>	25
PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES DE 17 α -METILTESTOSTERONA (MT).....	26
METODOLOGIA DE TESTE AGUDO COM <i>Daphnia magna</i>	26
METODOLOGIA DE TESTE CRÔNICO COM <i>Daphnia magna</i>	28
CULTIVO DE <i>Scenedesmus acuminatus</i>	29
METODOLOGIA DE TESTE CRÔNICO COM <i>Scenedesmus acuminatus</i>	30
SISTEMA - TESTE DE <i>Allium cepa</i>	33
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i>	37
ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>Daphnia magna</i>	37
Longevidade.....	37
Fecundidade	38
ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>Scenedesmus acuminatus</i>	44
ANÁLISE CITOGENÉTICA COM <i>Allium cepa</i>	49
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografias do cultivo de <i>Daphnia magna</i> (A) e do cultivo das microalgas para alimentação das dáfrias (B).....	25
Figura 2. Esquema do teste agudo com <i>Daphnia magna</i>	27
Figura 3. Fotografia do teste crônico com <i>Daphnia magna</i>	28

Figura 4. Esquema do teste crônico com <i>Daphnia magna</i> .	29
Figura 5. Fotografias do cultivo das <i>Scenedesmus acuminatus</i> . A) Microalgas observadas em microscópio óptico em aumento de 400x. B) Cultivo das microalgas sob luz e aeração constantes.	30
Figura 6. Fotografias da montagem do teste crônico com microalga. A) Preparo das soluções-teste. B) Teste sob luz e aeração constantes.	31
Figura 7. Fotografia da montagem do sistema-teste com <i>Allium cepa</i> e incubação em câmara de germinação.	33
Figura 8. Fotografias das etapas do sistema-teste após germinação e exposição aos tratamentos. A) Etapa de fixação ao Carnoy (3:1). B) Etapa após hidrólise em HCl. C) Etapa após exposição ao Reativo de Schiff para corar o material genético. D) Lâminas prontas para observação e contagem.	34
Figura 9. Número médio de posturas por tratamento no período de 21 dias	38
Figura 10. Ovos haploides encontrados nos tratamentos com MT nas concentrações de 1250	43
Figura 11. Teste de microalgas contaminado com bactérias não identificadas.	46
Figura 12. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em divisão celular. Ampliação de 400x. A) Intérfase. B) Prófase normal. C) Metáfase normal. D) Anáfase normal. E) Telófase normal. F) Célula binucleada. G) Núcleo lobulado. H) Broto nuclear. I) Células com dois micronúcleos. J) Célula com micronúcleo. K) Prófase com micronúcleo. L) Metáfase com perda cromossômica. M) Anáfase com ponte. N) Anáfase com perda e multipolaridade. O) Anáfase com ponte e perda.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de sobreviventes (longevidade) ao final dos 21 dias de ensaio. Os controles e os tratamentos com MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	38
Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) do número médio de posturas entre os tratamentos com MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.....	39
Tabela 3. Média e desvio padrão do número de neonatos produzidos por tratamento nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT.....	39
Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) do número médio de neonatos produzidos entre os tratamentos com MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.....	40
Tabela 5. Média e desvio padrão da primeira postura dos tratamentos nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT.....	40
Tabela 6. Média e desvio padrão do número de posturas e número de neonatos produzidos por tratamento nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT.....	41
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) do número médio de posturas entre os tratamentos com MT nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.	41
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) do número médio de neonatos produzidos entre os tratamentos com MT nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.....	42
Tabela 9. Biomassa produzida em cada tratamento e o Fator de Toxicidade (FT) calculado para cada concentração.....	44
Tabela 10. Comparação entre as repetições e os tratamentos com a microalga.	45
Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos com MT e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.....	46
Tabela 12. Biomassa algácea inicial do controle e a biomassa algácea final, produzida em cada tratamento.....	47
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos com MT e o controle.	47
Tabela 14. Comparação das médias entre os tratamentos com MT e o controle contaminados por bactérias. Teste de Tukey ($\alpha=0,05$). As letras diferentes (a e b) indicam que houve diferença estatisticamente significativa.	47
Tabela 15. Média e desvio padrão das anormalidades encontradas nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> das três repetições dos tratamentos.....	50

Tabela 16. Média e desvio-padrão das frequências de MN, BN, NL, CB e AC, por 5000 células, referente ao tratamento com MT e controles negativo e positivo em raízes de <i>Allium cepa</i>	51
--	----

RESUMO

NOGUEIRA, D. V. Avaliação ecotoxicológica do hormônio 17 α -metiltestosterona. Data: 09 de setembro de 2019. 64 páginas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2019.

No setor da piscicultura, principalmente para o cultivo de Tilápias-do-Nilo, foram desenvolvidas algumas técnicas para o aumento da produção de carne de peixe. Dentre elas, a masculinização dos alevinos, fase larval das tilápias, é uma técnica vantajosa, pois o macho é maior e produz mais carne além de produzir população monossexo que diminui a chance de superpopulação. Para que ocorra a masculinização, tem sido utilizado o hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) e sua administração se dá por meio de banhos de imersão contendo o hormônio ou adicionando-o na ração que é fornecida aos peixes. O seu uso tem gerado preocupações, pois, após seu uso, os efluentes dos tanques, contendo o hormônio, são lançados sem tratamento nos corpos hídricos atingindo ecossistemas aquáticos e conseqüentemente o ser humano por meio da ingestão de água contaminada. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos da MT por meio de testes ecotoxicológicos com ensaios agudos e crônicos com os organismos *Daphnia magna*, *Scenedesmus acuminatus* e genotoxicidade com *Allium cepa*, utilizando assim diferentes níveis tróficos para determinar o método que apresente o menor nível de toxicidade do hormônio. Foram realizados ensaios agudo e crônico com a MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ com *Daphnia magna*, no qual foi medida a imobilidade ou letalidade dos organismos, e a longevidade e fecundidade respectivamente. No ensaio crônico, com *Scenedesmus acuminatus*, nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi avaliado o crescimento/inibição das microalgas. No ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade com *Allium cepa* nas concentrações de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi avaliada a formação de alterações cromossômicas, alterações nucleares e micronúcleos de células em divisão nos meristemas das raízes da cebola. A análise estatística com *Daphnia magna* e *Scenedesmus acuminatus* foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas usando o Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Os resultados com *Allium cepa* foram verificados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, as comparações foram realizadas usando one-way ANOVA e quando houve diferença ($p < 0,05$), o teste de Dunnett foi aplicado. Para os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, a MT não se mostrou tóxica em nenhuma das concentrações testadas, como também para o ensaio de toxicidade crônica, a não ser pelo aparecimento de ovos de resistência (efípios) nas maiores concentrações, 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o ensaio crônico com *Scenedesmus acuminatus*, a MT inibiu o crescimento algáceo nas maiores concentrações testadas, sendo elas 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. No ensaio de genotoxicidade e de mutagenicidade houve aumento na formação de brotos nucleares e micronúcleos na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Os resultados deste estudo evidenciaram que o hormônio 17 α -metiltestosterona possui ação mutagênica e genotóxica sobre a cebola e inibição do crescimento da microalga testada, e que da mesma forma pode afetar outros organismos.

PALAVRAS-CHAVE: *Daphnia magna*; *Scenedesmus acuminatus*; *Allium cepa*; Genotoxicidade e Mutagenicidade; Ovos Haploides.

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE HORMONE 17 α - METHYLTESTOSTERONE

ABSTRACT

Within the pisciculture sector, for the cultivation of Nile Tilapia, some techniques have been developed to increase fish meat production. Among them, the masculinization of fingerlings, larval phase of tilapia, is an advantageous technique because the male is larger and produces more meat and having a monosexual population reduces the chance of overpopulation. For masculinization to occur, the hormone 17 α -methyltestosterone (MT) has been used. It is administered by immersion baths containing the hormone or by adding it to the fish feed. Its use has raised concerns because, after its use, the effluents from the hormone-containing tanks are discharged untreated into water bodies reaching aquatic ecosystems and consequently humans through ingestion of contaminated water. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxic effects of MT by ecotoxicological tests with acute and chronic tests with the organisms *Daphnia magna*, *Scenedesmus acuminatus* and genotoxicity with *Allium cepa*, using different trophic levels to determine the method that presents the lowest level of hormone toxicity. Acute and chronic MT assays were performed at concentrations of 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ with *Daphnia magna*, which measured the immobility or lethality of organisms, and longevity and fecundity respectively. In the chronic assay with *Scenedesmus acuminatus* at concentrations of 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, growth / inhibition of microalgae was evaluated. And in the genotoxicity and mutagenicity assay with *Allium cepa* at concentrations of 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, the formation of chromosomal alterations, nuclear alterations and dividing cell micronuclei in onion root meristems was evaluated. Statistical analysis with *Daphnia magna* and *Scenedesmus acuminatus* was performed using Analysis of Variance (ANOVA) and treatment averages were compared using the Tukey test, with a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). *Allium cepa* results were verified by the Kolmogorov-Smirnov test, comparisons were performed using one-way ANOVA and when there was a difference ($p < 0.05$), the Dunnett test was applied. For acute toxicity tests with *Daphnia magna*, MT was not toxic at any of the tested concentrations, as well as for the chronic toxicity test, except for the appearance of resistance eggs (ephipians) at the highest concentrations, 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. For the chronic trial with *Scenedesmus acuminatus*, MT inhibited algal growth at the highest concentrations tested, being 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. In with onion the assay there was an increase in the formation of nuclear sprouts and micronuclei at a concentration of 750 $\mu\text{g L}^{-1}$, and this difference was statistically significant. The results of this study showed that the 17 α -methyltestosterone hormone has mutagenic and genotoxic action on onion and inhibition of growth of the tested microalgae, and may affect other organisms as well.

KEYWORDS: *Daphnia magna*; *Scenedesmus acuminatus*; *Allium cepa*; Genotoxicity and Mutagenicity; Haploid Eggs.

INTRODUÇÃO

Após a Revolução Industrial, a população humana aumentou significativamente e a demanda cada vez maior por alimentos tem levado à procura de opções diferenciadas e que sejam de fácil aquisição. Alimentos à base de carne de peixe é uma opção cada vez mais procurada no mercado por consumidores, ocasionando o crescimento da sua produção. Esse aumento da produção acarretou aos produtores a busca por tecnologias, meios de fácil manejo e cultivo das espécies comercializadas.

Em específico, a criação de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) vem crescendo e se desenvolvendo mundialmente, sendo necessário o uso de técnicas para seu cultivo. O hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) tem sido utilizado na piscicultura para a masculinização dos alevinos das tilápias, obtendo uma população monossexo de machos. O macho apresenta um crescimento mais rápido, é maior e produz mais carne. Além dessas vantagens, a população monossexo evita a reprodução precoce e a consequente superpopulação, reduzindo a taxa de crescimento. A administração de MT se dá por meio de banhos de imersão contendo o hormônio ou adicionando-o na ração que é fornecida aos peixes.

Após seu uso, os efluentes dos tanques são lançados, sem tratamento, nos corpos hídricos, atingindo ecossistemas aquáticos e consequentemente o ser humano por meio da ingestão de água contaminada.

Os desreguladores endócrinos (DEs) como a 17 α -metiltestosterona, podem causar danos à saúde, afetando o crescimento e a reprodução de organismos (MORAES et al., 2008). Alguns DEs podem persistir no meio ambiente e nos organismos, levando a um comprometimento das cadeias alimentares devido à bioacumulação (MREMA et al., 2013).

De acordo com Bila e Dezotti (2007), os efeitos da exposição aos DEs encontrados na literatura em animais são: feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo de peixes, répteis, pássaros e mamíferos; diminuição na eclosão de ovos de pássaro; em humanos são: câncer de mama, testículo e próstata; entre outros.

A exposição ao hormônio MT tem levado à interferência na diferenciação sexual de crocodilos, inibição de fatores bioquímicos em embriões de peixe-zebra,

diminuição na produção de ovos de *Pimephales promelas* (MURRAY et al., 2016; RIVERO-WENDT et al., 2016; ZERULLA et al., 2002), entre outras alterações. Conforme Rivero-Wendt et al. (2013), a MT influenciou significativamente o desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata*, diminuindo o número de desovas especialmente na menor concentração testada de 0,01 mg L⁻¹.

Esses dados têm causado grande alerta, pois suas alterações ocorrem em concentrações muito baixas, sendo necessários estudos aprofundados para estimar os efeitos tóxicos que a MT causa nos organismos. Sendo assim, este estudo buscou avaliar os níveis de toxicidade apresentado pelo hormônio 17 α -metiltestosterona por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna*, *Scenedesmus acuminatus* e *Allium cepa*, utilizando assim diferentes níveis tróficos para determinar o método que apresente o menor nível de toxicidade do hormônio.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

POLUIÇÃO AQUÁTICA

A água é um dos recursos naturais mais utilizados e indispensáveis ao ser humano. A qualidade da água é fortemente afetada pelas atividades antrópicas, sendo elas, os lançamentos de efluentes não tratados advindos das indústrias, os agrotóxicos, os dejetos da pecuária, os esgotos domésticos, os lixões urbanos, entre outros. Além de afetar a qualidade da água, essas ações antrópicas afetam também os ecossistemas aquáticos, causando grande preocupação ambiental.

Tais efluentes lançados direta ou indiretamente, poluindo a águas superficiais e crescentemente os lençóis freáticos, são consequências da primazia dada ao crescimento econômico de um país em detrimento da proteção dos seus recursos naturais (KNIE e LOPES, 2004).

Em vista disso, gigantescas quantidades de substâncias químicas chegam aos corpos hídricos provocando modificações negativas do seu estado químico, físico e biológico (KNIE e LOPES, 2004).

A autodepuração, uma particularidade dos rios, é a capacidade em poder se recuperar sozinho do impacto causado pelo lançamento de poluentes, mas o excessivo lançamento de poluentes nos corpos hídricos diminui tal capacidade de assimilação afetando a qualidade da água para usos pessoais e para o ecossistema (COLLISCHONN E TASSI, 2008).

Alguns dos poluentes que se pode citar e que vem sendo uma ameaça potencial aos organismos aquáticos e à saúde pública são os fármacos e Desreguladores Endócrinos (DE) (AQUINO et al., 2013). Os DE afetam a saúde, crescimento e reprodução dos seres vivos através da interferência dos mesmos no sistema endócrino (AMARAL, 2012). Estes desreguladores endócrinos pertencem à categoria de poluentes emergentes, podendo ser encontrados nos ecossistemas, e que podem causar danos à fauna, flora e à saúde humana, e que geralmente não são contemplados nas legislações ambientais.

Poluição Hormonal

Os hormônios são produtos químicos sintéticos ou naturais, sendo classificados como DE e estão presentes no meio ambiente na ordem de μg ou ng L^{-1} (AMARAL, 2012). Os hormônios estão presentes não somente em seres humanos, mas em animais e em vegetais, sendo parte vital para o metabolismo, muitas vezes com estruturas e funções diferentes dos humanos, mas com mecanismo que atua de forma semelhante, sendo que por meio desse mecanismo de ação hormonal que os hormônios atuam alterando o desenvolvimento, reprodução e funções dos seres vivos de diversas espécies (CULCLASURE, 1973). Sendo uma categoria recente de poluentes ambientais, os DE interferem nas funções mesmo com concentrações baixas (BILA e DEZOTTI, 2007).

Em animais os efeitos encontrados na literatura são: alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos; feminização de peixes machos; diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; e em humanos os efeitos citados são: o aumento da incidência de câncer de testículo, próstata e mama; a endometriose; redução da quantidade de esperma (BILA e DEZOTTI, 2007). De acordo com Carneiro et al. (2015), o aumento de incidência de carcinomas gastrointestinais, anomalias reprodutivas e malformações congênitas são características encontradas em populações que vivem próximas a perigosos depósitos de rejeitos em rios.

Medidas políticas corretivas são necessárias para evitar a contínua poluição sistemática dos recursos hídricos, mas também é imprescindível uma fiscalização rigorosa do manejo e da liberação de produtos químicos no meio ambiente, assim como um controle abrangente e hábil da qualidade das águas e seus respectivos pontos de contaminação (KNIE e LOPES, 2004).

A qualidade hídrica pode ser controlada mediante duas formas distintas: a análise química da água, que identifica e quantifica as substâncias químicas encontradas nela, e a análise biológica, que qualifica os efeitos causados pelas substâncias (KNIE e LOPES, 2004).

PISCICULTURA E A 17α -METILTESTOSTERONA (MT)

O conceito de pesca e aquicultura é diferente. De acordo com SEBRAE (2015), a pesca é a captura de animais, que independe do homem e seus cuidados, diferentemente da aquicultura, na qual se faz necessário o cultivo dos animais em

cativeiro, sendo o estoque privado. O cultivo de diversas espécies aquáticas como plantas aquáticas, crustáceos, moluscos e peixes designa-se aquicultura, sendo imprescindível a intervenção ou manejo do processo de criação para o aumento da produção (OLIVEIRA, 2009).

Alimentação, nutrição, renda e meios de subsistência, são fontes adquiridas por meio da pesca e aquicultura para centenas de milhões de pessoas. A metade dos peixes consumidos que são fornecidos pela aquicultura e a ligeira melhora no estado das unidades populacionais de peixes, devido à melhoria da gestão da pesca, promoveu o abastecimento mundial de peixe e atingiu novo recorde em 2014, de 20 kg per capita (FAO, 2016).

Cerca de US\$ 600 bilhões são movimentados todos os anos no setor de pesca, o que torna os negócios envolvendo o pescado, nove vezes maiores que os de carne de frango e sete vezes maiores que o de carne bovina, e a participação brasileira apresenta melhores condições de aumentar por meio da aquicultura (BRASIL, 2016).

Em 2014, China, Indonésia, Noruega, Europa e América do Sul, tiveram os mais importantes acréscimos na área de pesca. Treze dos 25 maiores países da pesca aumentaram suas capturas em mais de 100 mil toneladas em relação a 2013 (FAO, 2016).

Houve retração na piscicultura brasileira em 2017, mas em 2018 voltou a crescer. A produção total de peixes de acordo com o IBGE (BRASIL, 2018) foi de 519,3 mil toneladas, desses, 311,5 mil toneladas foram da produção específica da tilápia, isto representa um total de 60% da produção brasileira. O destaque se dá ao Paraná no qual 95% da produção foram de tilápia. Nova Aurora (PR) é o município líder de produção nacional dessa espécie e Toledo (PR) ficou em 5º lugar (BRASIL, 2018).

Este aumento na produção invariavelmente leva ao aumento da probabilidade de danos ambientais devido ao manejo inadequado e ao excesso de nutrientes e poluentes despejados em corpos d'água sem o devido tratamento.

Preocupações com esta atividade envolvem tratamento de resíduos, efeitos colaterais dos antibióticos, resíduos orgânicos compostos por nutrientes que são excretados pelos peixes, entre outros (SEBRAE, 2015).

Com o surgimento da piscicultura surgiu juntamente a necessidade de regularizar a atividade, atendendo os requisitos necessários de manejo dos

efluentes e avaliar os impactos no corpo hídrico receptor (CARDOSO, 2017). Mas ainda existe ausência acerca dessas questões, que representa um gargalo na obtenção de licenças ambientais, dificuldade esta levantada pelos próprios piscicultores (PASSADOR, 2006). Para a regularização das pisciculturas e garantir a preservação dos ecossistemas aquáticos é que se faz necessário o conhecimento dos impactos ambientais provenientes de tal atividade (CARDOSO, 2017).

Uma substância que vem sendo utilizada e comercializada sem nenhuma restrição e sem nenhum estudo prévio quanto à sua toxicidade para o ambiente é a 17 α -metiltestosterona, que é usada na aquicultura para a masculinização de Tilápias-do-Nilo.

Na criação das espécies de *Oreochromis niloticus* (Tilápio-do-Nilo) é mais vantajoso se ter apenas espécimes machos, pois atingem maior tamanho que a fêmea, impedindo a reprodução e conseqüentemente problemas com superpopulações (VALENTIM-ZABOTT et al., 2008). Essa masculinização, que acontece na fase de larvicultura, é de fundamental importância para a criação racional da Tilápia-do-Nilo (MEURER, 2005).

A técnica mais adotada para masculinização é a administração de hormônios masculinizantes, como o andrógeno 17 α -metiltestosterona (MT), o mais utilizado (BOMBARDELLI et al., 2007). A administração é feita mediante banhos de imersão com a água contendo o hormônio ou por meio de rações suplementadas com o hormônio. Zanardi et al. (2011), obtiveram maior êxito com o uso de rações suplementadas, com eficiência de 94% de machos obtidos, enquanto banhos de imersão apresentaram eficiência de 86%.

A utilização do hormônio em tanques de piscicultura pode ocasionar acúmulo nos sedimentos e na água, e por conseqüência, pode entrar em contato com o ambiente, nos corpos hídricos, podendo atingir populações aquáticas e o próprio ser humano pelo consumo de água (AMORIM, 2013).

A 17 α -metiltestosterona (MT) merece uma atenção especial, pois há algumas evidências de distúrbios causados por esse composto como malformações de cauda, edemas, desenvolvimento anormal da cabeça e atraso de incubação da espécie *Danio rerio*, e, a nível bioquímico, a MT diminuiu a síntese de vitelogenina (VTG), a colinesterase e a lactato desidrogenase (RIVERO-WENDT et al., 2016). Na pesquisa de Murray et al. (2016), observou-se que em temperaturas para produzir fêmeas se desenvolviam machos pela presença da MT e a exposição a ela na fase

embrionária resultou em órgãos sexuais primários hermafroditos, atraso no desenvolvimento renal e masculinização do clítero-penis (CTP). Em amostras colhidas em campo, foi verificada a presença de MT nas gemas dos ovos e no plasma de todas as idades de uma população de crocodilos (MURRAY et al., 2016).

TOXICOLOGIA – TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

O estudo dos efeitos nocivos de substâncias químicas ou biológicas sobre os seres vivos é denominado toxicologia. Tais substâncias de interesse podem ser de origem natural encontrada no ambiente ou produtos químicos sintéticos. Os dados toxicológicos são coletados determinando a toxicidade aguda, que é o início rápido de sintomas, incluindo morte no limite extremo, sendo este um ensaio importante quando o organismo é exposto acidentalmente a produtos químicos puros, mas a grande preocupação na toxicologia ambiental é a exposição crônica a doses relativamente baixas e em longo prazo (BAIRD, 2002).

A importância de estudos dos efeitos nocivos das substâncias químicas sobre os organismos, a toxicologia, remete-se à forte influência destes nos ecossistemas (MANAHAN, 2013). De acordo com Ronco et al. (2004) a capacidade da substância tóxica ter certo efeito nocivo sobre organismos ou comunidades é chamada toxicidade.

A interação entre a ecologia e a toxicologia pode ser complexa envolvendo grande número de organismos, e é conhecida como ecotoxicologia (MANAHAN, 2013). Conforme Nour et al. (2014), para estimar o efeito tóxico de determinado composto, fornecendo dados para avaliar os riscos ao ambiente aquático, são empregados ensaios ecotoxicológicos com organismos padronizados.

Por meio dos ensaios ecotoxicológicos pode-se verificar resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes em áreas contaminadas, o que não acontece com apenas a análise química de cada composto presente nas áreas, por isso se faz necessária tal avaliação ecotoxicológica (SISINNO et al., 2006).

Conforme descrito por Rodrigues et al. (2009), os estudos baseados em evidências puramente químicas são limitados, e dentre essas limitações encontram-se a baixa capacidade de detecção analítica; a elevada variedade de substâncias presentes em efluentes líquidos; as interferências pelos fenômenos químicos de antagonismo e sinergismo que dificultam sobretudo no processo de interpretação de

resultados. Por isso os testes ecotoxicológicos são importantes para a integração de dados químicos, físico-químicos e biológicos e obtenção de informações objetivas, para subsidiar as tomadas de decisões para proteção do meio ambiente.

A finalidade da análise ecotoxicológica é saber, em qual grandeza, as substâncias químicas, isoladas ou misturadas, são nocivas, e como e onde se manifestam seus efeitos (KNIE e LOPES, 2004).

Nos ensaios ecotoxicológicos, os efeitos agudos sobre a sobrevivência ou imobilidade dos organismos-teste são observados quando tais organismos são expostos à presença de substâncias em altas concentrações, durante curtos períodos de tempo. Os efeitos crônicos sobre a reprodução, crescimento, comportamento, entre outros, são observados quando expostos à baixa concentração e períodos de tempo maiores durante o ciclo de vida do organismo. Na ausência desses efeitos, deve-se levar em consideração o acúmulo das substâncias químicas, que podem atingir níveis elevados no organismo, causando efeitos deletérios ao longo do tempo (CETESB, 2011).

De acordo com Pompêo et al. (2015), as análises ecotoxicológicas podem ser de dois tipos: com substâncias específicas, por exemplo os fármacos, sendo realizados ensaios com o objetivo da obtenção de dados para registros químicos, e a outra é para constatação dos valores encontrados em relação aos padrões permitidos pelas legislações vigentes.

Assim como a água, o sedimento também deve ser analisado, pois funciona como um sumidouro temporário de poluentes, sendo liberados para a coluna de água sob determinadas condições ambientais, afetando assim direta ou indiretamente os organismos.

A Resolução nº 357/2005 do CONAMA, estabelece que a utilização de ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos ou outros métodos cientificamente reconhecidos deverão ser utilizados para investigação de possíveis interações entre substâncias como também a presença de contaminantes não listados na resolução (BRASIL, 2005), como é o caso do hormônio 17 α -metiltestosterona.

Para o emprego de ensaios ecotoxicológicos, alguns representantes de grupos foram selecionados, sendo eles: bactérias, algas, protozoários, microcrustáceos e peixes, levando em consideração os diferentes níveis tróficos (KNIE e LOPES, 2004).

Dentro de um dos grupos, a *Daphnia magna* é um microcrustáceo planctônico de água doce, conhecida popularmente como pulga d'água, com tamanho médio de 5 a 6 mm, sendo um consumidor primário, alimentando-se de algas unicelulares. A escolha de tal espécie é devido a: terem reprodução, em condições favoráveis, assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas geneticamente idênticas, assegurando assim a uniformidade de respostas nos ensaios; a cultura em laboratório sob condições controladas ser fácil; o manuseio ser simples; a espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos; o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto; é internacionalmente reconhecida como organismo-teste sendo utilizada há décadas (KNIE e LOPES, 2004).

Dentro dos representantes das algas existem as microalgas que são algas verdes planctônicas, representantes dos produtores primários de água doce. Sendo a base do ciclo de vida, pois servem de alimento para outros organismos. Destacam-se também pela manutenção do equilíbrio do ambiente aquático, pois participam dos ciclos biogeoquímicos, mais especificamente do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício. São indicadoras da poluição aquática, sendo usadas há quase 100 anos em pesquisas (KNIE E LOPES, 2004).

Outro método toxicológico que é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais, é a avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* (cebola) (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Para Fernandes et al. (2007), a utilização de plantas em bioensaios apresenta vantagens quando comparados aos bioensaios com animais, pois são sensíveis e de fácil realização.

De acordo com Grant (1982) e Caritá e Marin-Morales (2008), o sistema-teste com *Allium cepa* é um eficiente método para analisar a genotoxicidade e mutagenicidade de ambientes aquáticos contaminados e o potencial genotóxico de substâncias químicas, por sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste de mamíferos. O sistema-teste de *A. cepa* é um teste de resposta rápida, de baixo custo e é favorável na avaliação de danos cromossômicos e alterações no ciclo mitótico por ter cromossomos grandes e reduzidos ($2n=16$), tornando assim um teste amplamente utilizado no monitoramento de contaminações ambientais (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O sistema-teste de *Allium cepa* tem sido utilizado há mais de 40 anos para detectar agentes mutagênicos, contribuindo para a aplicação no monitoramento ambiental, além de ter de baixo custo, é de fácil manuseio e curta duração. Esse teste apresenta resultados consistentes que podem servir de alerta para outros sistemas biológicos, pois o DNA é comum a todos os organismos, caracterizando uma ferramenta importante para estudos de monitoramento ambiental (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Para Rank e Nielsen (1993), as aberrações cromossômicas induzidas por produtos químicos têm sido detectadas por meio de diferentes estudos com *A. cepa*. Uma forte evidência de mutagenicidade da substância em análise é o aumento da presença de micronúcleos (MN), e de genotoxicidade, o aumento das aberrações cromossômicas (AC) (RIBEIRO, 2003). Já o índice mitótico (IM) é usado como indicador de proliferação normal das células (GADANO et al., 2002), e por meio do seu aumento ou diminuição, pode-se avaliar o nível de citotoxicidade (FERNANDES et al., 2007).

Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações de organismos vivos à poluição ambiental (ANDRADE, 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Biomonitoramento (LEB), localizado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), em Toledo-PR.

CULTIVO DE *Daphnia magna*

A metodologia utilizada para o cultivo da espécie *Daphnia magna* foi a norma ABNT NBR 12713/09 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Os organismos foram cultivados em água reconstituída (meio M4) (Anexo A) de acordo com a norma com pH de 7,6 e com dureza de 225 mg CaCO₃ L⁻¹. Após preparação da água reconstituída, esta foi aerada para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 horas (BRASIL, 2009).

Os organismos foram mantidos em incubadora, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, e temperatura entre 18° e 22°C, mantendo-os em recipientes adequados com até 25 org. L⁻¹ (Figura 1).

Figura 1. Fotografias do cultivo de *Daphnia magna* (A) e do cultivo das microalgas para alimentação das dáfneas (B).



Fonte: a autora

A água de cultivo foi trocada no mínimo uma vez na semana, para evitar diferenças de temperatura maiores que 2°C.

Para alimentação dos organismos foram cultivadas algas unicelulares *Scenedesmus acuminatus*. O fornecimento de alimento às dáfrias foi diário, de aproximadamente 10^6 células por mililitro por organismo.

Para o cultivo das algas preparou-se o meio cultura CHU (Anexo B) de acordo com a norma ABNT NBR 12713/09, no qual foi ajustado o pH entre 7,0 e 7,2 e autoclavado durante 15 minutos a 121°C. A cultura foi mantida sem fotoperíodo com aeração e luz constante com temperatura de 20° a 30°C (Figura 1).

PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES DE 17 α -METILTESTOSTERONA (MT)

Em balança analítica Shimadzu ATY224 (± 1 mg) pesou-se 2 mg de MT, diluindo-se em 1 litro de água de diluição (meio descrito na norma para montagem dos ensaios) (Anexo A), obtendo assim a solução-estoque e a partir desta foram feitas as concentrações.

Para a espécie *Daphnia magna* foram realizados ensaios com concentrações de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 35 $\mu\text{g L}^{-1}$, 55 $\mu\text{g L}^{-1}$, 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT, juntamente com o controle contendo somente água de diluição, e com concentrações de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT, juntamente com o controle contendo somente água de diluição.

METODOLOGIA DE TESTE AGUDO COM *Daphnia magna*

A metodologia de teste agudo seguiu também a norma ABNT NBR 12713/09 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Foram expostos neonatos de *Daphnia magna*, de 2 a 26 horas de idade, nas concentrações de MT e controle por um período de 48 horas. A água de diluição foi preparada de acordo com a norma e foi usada como diluente para as concentrações de MT e controle. Após o preparo da água de diluição a mesma foi aerada por pelo menos 12 horas para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH (BRASIL, 2009).

Foram utilizados recipientes de 50 mL para realização do ensaio nos quais foram colocados em cada recipiente 25 mL da solução-teste e água de diluição no

controle. Para cada concentração e controle, foram utilizadas 2 réplicas contendo 10 organismos cada, sendo um total de 20 organismos por tratamento. Os neonatos foram transferidos para os recipientes de forma a evitar a alteração da concentração final da solução-teste, e para isso utilizou-se pipeta de Pasteur e uma rede de malha fina.

Os recipientes foram tampados para evitar a evaporação das soluções e levados a incubadora BOD, com temperatura entre 18°C e 22°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, sem alimentação.

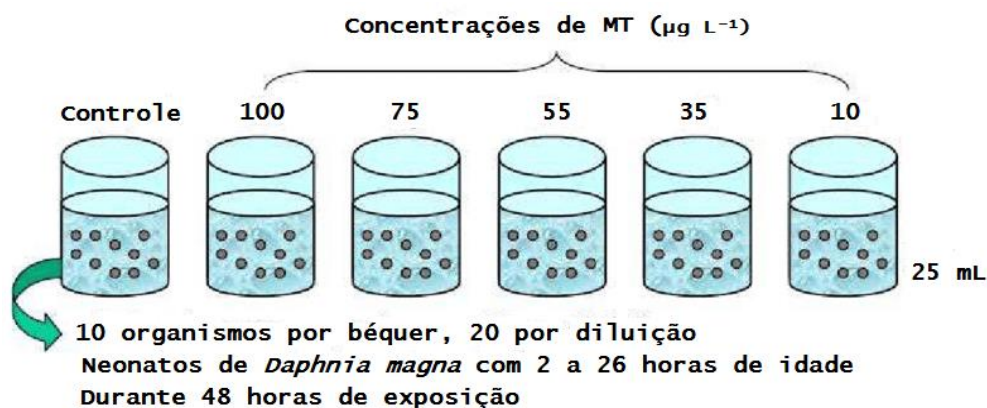
O teste de sensibilidade foi realizado tendo como objetivo verificar as condições em que os organismos se encontram para uma posterior análise toxicológica. Os resultados obtidos neste teste devem estar dentro de uma faixa conhecida de sensibilidade a uma substância de referência.

A substância de referência utilizada no teste foi o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), avaliando a sensibilidade dos organismos-teste. O ensaio de sensibilidade foi realizado conforme as condições do ensaio agudo definitivo (ISO, 2012).

Os resultados do teste agudo e de sensibilidade foram avaliados após 48 horas, observando a imobilidade ou letalidade das dáfias, calculando a porcentagem por concentração a partir do total de organismos testados. O resultado do teste é expresso em Concentração Efetiva Inicial Mediana - CE(I)50 48h, que corresponde à concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos em 48 horas.

O esquema do teste agudo pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Esquema do teste agudo com *Daphnia magna*.



Fonte: Google Imagens.

METODOLOGIA DE TESTE CRÔNICO COM *Daphnia magna*

A metodologia de teste crônico foi baseada na norma ABNT NBR 13373/03 – Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), com algumas adaptações (organismo usado foi *Daphnia magna* e não *Ceriodaphnia* sp. de acordo com a norma; que determina 25 mL da solução-teste em cada recipiente e foram adicionados 50 mL).

No teste crônico os neonatos de *Daphnia magna*, de 2 a 26 horas de idade, foram expostos às mesmas concentrações supracitadas por um período de 21 dias. Para cada tratamento foram utilizadas 10 réplicas contendo um organismo por recipiente, num total de 10 organismos por concentração. Foram utilizados recipientes de 100 mL contendo 50 mL da solução-teste que foram tampados evitando assim a evaporação das soluções (Figura 3).

Figura 3. Fotografia do teste crônico com *Daphnia magna*.



Fonte: a autora.

Os neonatos foram transferidos para os recipientes de forma a evitar a alteração da concentração final da solução-teste, e, para isso, utilizou-se pipeta de Pasteur e uma rede de malha fina.

Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e temperatura de 18°C a 22°C. Os neonatos receberam alimentação diariamente, sendo fornecida como alimento a alga clorofícea *Scenedesmus acuminatus* cultivada de acordo com o item 4.1.

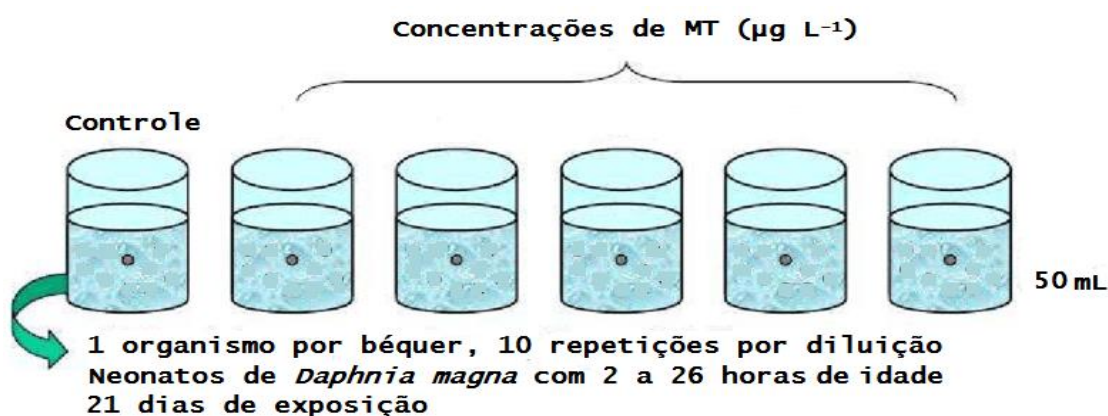
Em todos os dias eram observados a sobrevivência dos organismos e a partir da segunda semana, quando começaram a se reproduzir, eram retirados os neonatos e contabilizados, deixando somente a fêmea adulta no recipiente. A solução-teste foi trocada nos dias 7 e 14 do experimento.

Os parâmetros analisados no teste foram: longevidade e fecundidade de acordo com a norma ANBT NBR 13373. A longevidade foi obtida pela sobrevivência dos organismos até o final do teste (21 dias), expressando o parâmetro em número de dáfias sobreviventes. A fecundidade foi avaliada pela contagem de neonatos gerados pelas fêmeas no período de 21 dias e o número médio de posturas por tratamento.

As dáfias que morreram antes de completar 18 dias não foram contabilizadas. No caso de morte das fêmeas adultas antes do dia 18, exclui-se o número de filhotes que ela reproduziu, pois após este período a reprodução é muito flutuante e a ausência de filhotes neste período não irá interferir nos dados. Os eventuais machos são contabilizados no final do teste apenas para dados de longevidade. Os resultados obtidos quanto à longevidade e fecundidade nas soluções-teste são comparados aos resultados do controle.

O esquema do teste crônico pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Esquema do teste crônico com *Daphnia magna*.

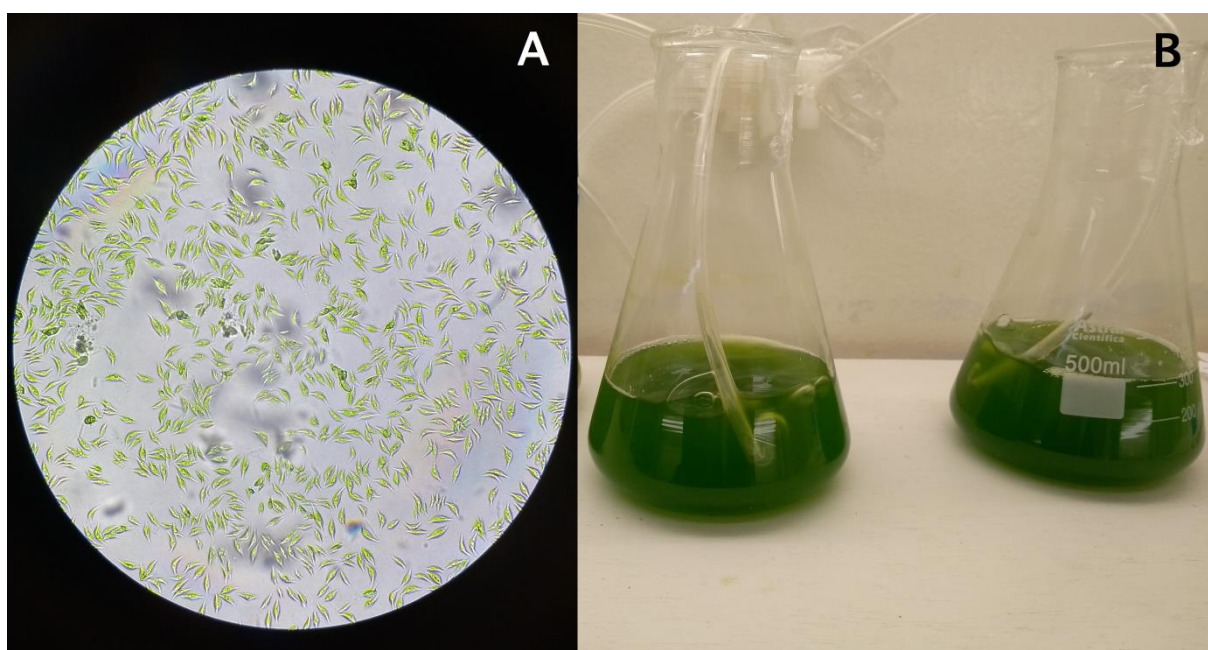


Fonte: Google Imagens.

CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus*

A metodologia utilizada para o cultivo da espécie *Scenedesmus acuminatus* foi a norma ABNT NBR 12648/11 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). As microalgas foram cultivadas em meio CHU (Anexo B). Após o preparo o pH do meio foi ajustado entre 7,0 e 7,2, aerado durante 30 minutos e autoclavado em autoclave vertical FANEM 415 durante 15 minutos a 121°C. Foi adicionado um inóculo de microalga contendo 10^4 células mL^{-1} . A cultura foi mantida sob aeração e luz constante e temperatura de 20°C a 30°C (Figura 5).

Figura 5. Fotografias do cultivo das *Scenedesmus acuminatus*. A) Microalgas observadas em microscópio óptico em aumento de 400x. B) Cultivo das microalgas sob luz e aeração constantes.



Fonte: a autora.

METODOLOGIA DE TESTE CRÔNICO COM *Scenedesmus acuminatus*

A metodologia de teste crônico seguiu a norma ABNT NBR 12648/11 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), com algumas adaptações (ao invés da mesa agitadora, o teste foi realizado com aeração constante; e a pré-cultura ocorreu em meio CHU e não em

meio DIN, já que o desenvolvimento das mesmas foi melhor em meio CHU), na qual as microalgas são expostas às concentrações de MT e controle por um período de 96 horas (BRASIL, 2011).

Três dias antes da montagem do ensaio foi feito o preparo da pré-cultura de microalgas que seria utilizada no ensaio. Foi preparado o meio CHU, ajustado o pH entre 7,0 e 7,2, aerado por 30 minutos e autoclavado durante 15 minutos a 121°C. O meio foi distribuído em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura e um inóculo de microalga contendo 10^6 células mL^{-1} , sendo que a concentração inicial da pré-cultura ficou na ordem de 10^4 células mL^{-1} .

Para a montagem do ensaio todas as vidrarias, meios de culturas e bancadas foram esterilizados evitando assim contaminação de outras espécies. As vidrarias e os meios foram devidamente autoclavados e as bancadas foram devidamente esterilizadas com sabão, água e álcool a 70% v/v.

Para a montagem do ensaio foi preparado o meio DIN (Anexo C) de acordo com a norma ABNT NBR 12648/11, aerado por 30 minutos, ajustado o pH em $8,0 \pm 0,2$ e autoclavado durante 15 minutos a 121°C (BRASIL, 2011).

Para as diluições de MT foi utilizada a solução-estoque, água destilada, inóculo e meio de cultura DIN. As concentrações foram de 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT. No controle foi introduzido meio de cultura DIN, água processada e o inóculo. As diluições foram seguidas de acordo com a norma ABNT NBR 12648/11, preparo das soluções-teste com substâncias químicas utilizando meio DIN.

Os tratamentos foram mantidos sob luz constante, temperatura de 23°C a 27°C e com aeração constante, durante período de 96 horas (Figura 6).

Figura 6. Fotografias da montagem do teste crônico com microalga. A) Preparo das soluções-teste. B) Teste sob luz e aeração constantes.



Fonte: a autora.

A biomassa algácea do controle foi determinada no início do ensaio e no final do ensaio em todos os tratamentos pela contagem celular ao microscópio óptico em câmara de Neubauer.

Ao final do ensaio foi feita a contagem das células em todos os tratamentos. A biomassa final foi subtraída da biomassa inicial, calculando-se assim a biomassa produzida durante o ensaio.

O fator de toxicidade (FT) foi determinado em cada concentração por meio do cálculo da porcentagem de inibição (IC) (Equação 1), de acordo com a norma ABNT NBR 12648/11 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) (BRASIL, 2011):

$$IC = \frac{Mc - Ma}{Mc} \times 100$$

Em que:

IC é a porcentagem de inibição da multiplicação das células algáceas;

Ma é a média do número de células das soluções-teste;

Mc é a média do número de células do controle.

SISTEMA - TESTE DE *Allium cepa*

Antes da montagem do ensaio, as placas de Petri e papel germitest foram autoclavados em autoclave vertical FANEM 415 a 121°C durante 20 minutos, para esterilização e realizada a assepsia das bancadas, BOD e pinças utilizando água, sabão e Lysoform®.

As sementes de *Allium cepa* (cebola) utilizadas foram da TopSeed® da Agristar. A metodologia consiste em primeiramente germinar as sementes de cebola em placas de Petri contendo papel filtro e água destilada, colocar em incubadora BOD com temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (Figura 7). Após aproximadamente 3 dias, quando as raízes já tiverem atingido 1 cm de comprimento, a placa de Petri e papel filtro foram trocados por novos e as sementes foram umedecidas com a concentração de MT, permanecendo por mais 72 horas.

Figura 7. Fotografia da montagem do sistema-teste com *Allium cepa* e incubação em câmara de germinação.



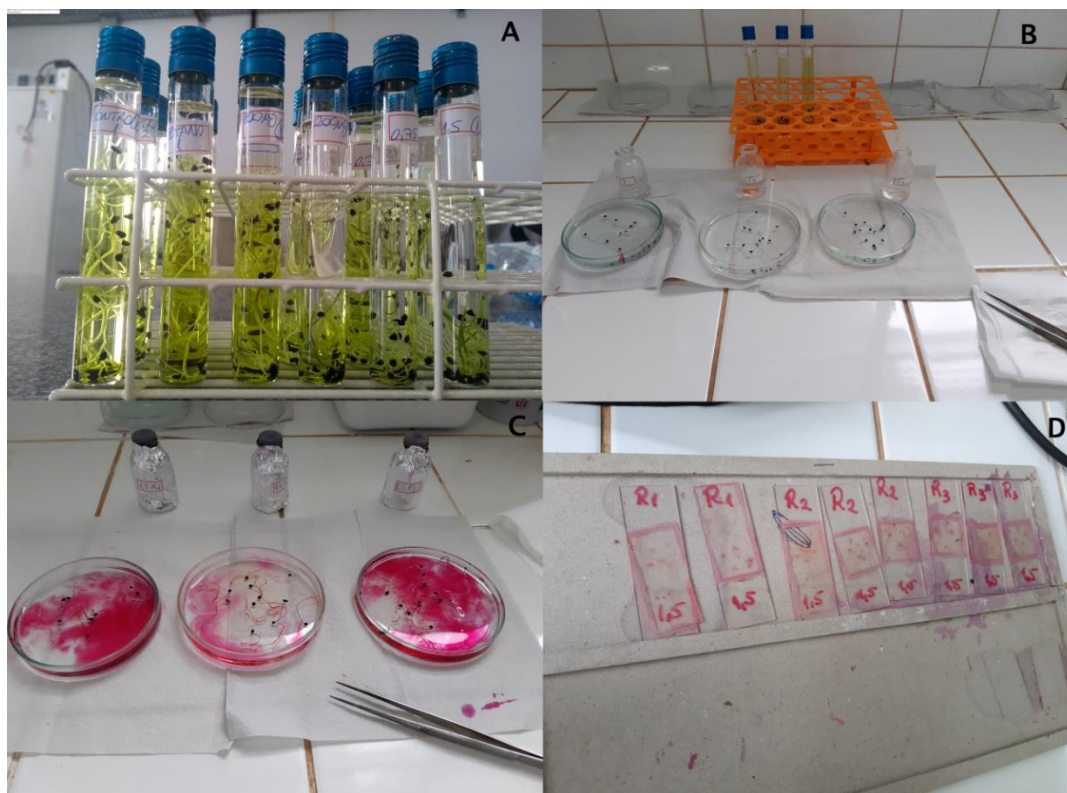
Fonte: a autora.

Os tratamentos foram o controle negativo contendo somente água destilada, o controle positivo contendo metilmetano sulfonato (MMS), na concentração de 4×10^{-4} mol L⁻¹, e os tratamentos com MT nas concentrações de 750 e 1500 µg L⁻¹, menor e maior concentração respectivamente dos testes anteriores, já que são concentrações muito baixas.

Após o período de exposição à MT, houve a preparação das raízes que foram fixadas em Carnoy (3:1) por 24 horas. Após este período, as raízes foram lavadas em água destilada em placa de Petri e então submetidas a hidrólise com HCl 1 mol

L⁻¹ em banho-maria por 8 minutos a 60°C. Novamente as raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos e transferidas para um recipiente âmbar contendo Reativo de Schiff¹¹, no qual foram deixadas por 40 minutos para corar o material genético. Após o período de 40 minutos, as raízes foram lavadas novamente em água destilada para retirada do excesso de corante, e, em seguida, a região meristemática foi cortada com auxílio de lâmina e adicionada uma gota de solução de carmim acético a 2% m/v para evidenciar o citoplasma. A lamínula foi colocada sobre o material na lâmina, aquecida e macerada para espalhar as células. O excesso de corante foi retirado com papel absorvente e a lâmina foi comprimida com o polegar direito (Figura 8). A montagem das lâminas seguiu o protocolo proposto por Grant (1982).

Figura 8. Fotografias das etapas do sistema-teste após germinação e exposição aos tratamentos. A) Etapa de fixação ao Carnoy (3:1). B) Etapa após hidrólise em HCl. C) Etapa após exposição ao Reativo de Schiff para corar o material genético. D) Lâminas prontas para observação e contagem.



Fonte: a autora.

¹¹ Composição do Reativo de Schiff: 3g de fucsina básica, 6g de metabissulfito de sódio, 60 mL de HCl 1 mol L⁻¹, água destilada para completar 1L.

O material foi observado em microscópio óptico em aumento de 400x, o qual foi verificado a presença de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN) que são indicativos de genotoxicidade, e células binucleadas e micronúcleos (MN), evidenciando mutagenicidade. Foi feita a contagem de 5000 células por tratamento.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas dos testes crônicos com *Daphnia magna* e *Scenedesmus acuminatus* foi utilizado o software Action[®]™, versão 3.3.2, da Estatcamp. Foram determinados pelo programa, a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis por meio de Análise de Variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas usando o Teste de Tukey. O nível de significância utilizado nas análises estatísticas foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

Para as análises estatísticas com *Allium cepa*, a distribuição dos dados e a normalidade foram verificadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as comparações foram realizadas usando one-way ANOVA. Quando diferenças significativas foram observadas ($p < 0,05$) após a comparação com o controle negativo, o teste de Dunnett foi aplicado. O SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., Chicago, IL) foi usado para realizar as análises estatísticas. Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Para o teste de sensibilidade a concentração encontrada de CE(I)50 foi de 0,7 mg L⁻¹ de dicromato de potássio, causando efeito agudo em 50% dos organismos expostos a essa substância, estando dentro das concentrações limites estabelecidas (entre 0,6 mg L⁻¹ e 1,7 mg L⁻¹) pela ISO 6341/2012, aptas para os testes (ISO, 2012).

A MT não se mostrou tóxica aos organismos de *Daphnia magna*, revelando assim ausência de toxicidade aguda. Como as concentrações de MT são subletais, isto é, em baixas concentrações seu efeito é silencioso, não sendo detectado efeito no teste de toxicidade aguda diante das concentrações testadas.

Para Magalhães e Ferrão Filho (2008), a toxicidade aguda nem sempre reflete o potencial deletério de uma substância, pois concentrações subletais podem causar uma série de efeitos, considerada 'morte ecológica', impedindo o organismo de realizar funções vitais no ecossistema como o desenvolvimento dos ovos, crescimento, deformações de órgãos reprodutores, problemas na percepção química e motora, entre outros, não causando a morte imediata do organismo, mas podendo progredir até a mesma. Tais efeitos indiretos e subletais podem ocorrer a médio/longo prazo, em diferentes intensidades, sendo assim imprescindível a realização do teste de toxicidade crônica para complementar a avaliação.

ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Daphnia magna*

Diante da ausência de toxicidade aguda, realizou-se então o teste de toxicidade crônica nas mesmas concentrações.

Longevidade

A longevidade foi expressa por número de sobreviventes ao final do ensaio (21 dias). Os tratamentos com MT, tanto nas concentrações 10-100 µg L⁻¹ quanto nas concentrações de 750-1500 µg L⁻¹, não foram tóxicos quanto à sobrevivência dos organismos (Tabela 1).

No controle houve a morte de dois organismos. Tal valor não interfere nos resultados, sendo o ensaio válido, pois de acordo com a norma ABNT NBR 13373/03, os resultados são considerados válidos quando a letalidade dos organismos adultos no controle for menor ou igual a 20% (BRASIL, 2003).

Tabela 1. Tabela de sobreviventes (longevidade) ao final dos 21 dias de ensaio. Os controles e os tratamentos com MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Concentrações 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$		Concentrações 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Tratamentos	Número de Sobreviventes	Tratamentos	Número de Sobreviventes
Controle	8	Controle	8
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	10	750 $\mu\text{g L}^{-1}$	7
35 $\mu\text{g L}^{-1}$	10	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	9
55 $\mu\text{g L}^{-1}$	8	1250 $\mu\text{g L}^{-1}$	9
75 $\mu\text{g L}^{-1}$	8	1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	9
100 $\mu\text{g L}^{-1}$	8	-	-

Fecundidade

Em relação ao número médio de posturas por tratamento nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, pode-se observar na Figura 9 que a concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ teve menor número médio de postura em relação aos demais tratamentos, mas estatisticamente essa variação não foi significativa, isto é $p\text{-valor} > 0,05$. (Tabela 2). O MT não interferiu na reprodução dos organismos.

Figura 9. Média e desvio padrão do número de posturas por tratamento no período de 21 dias nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

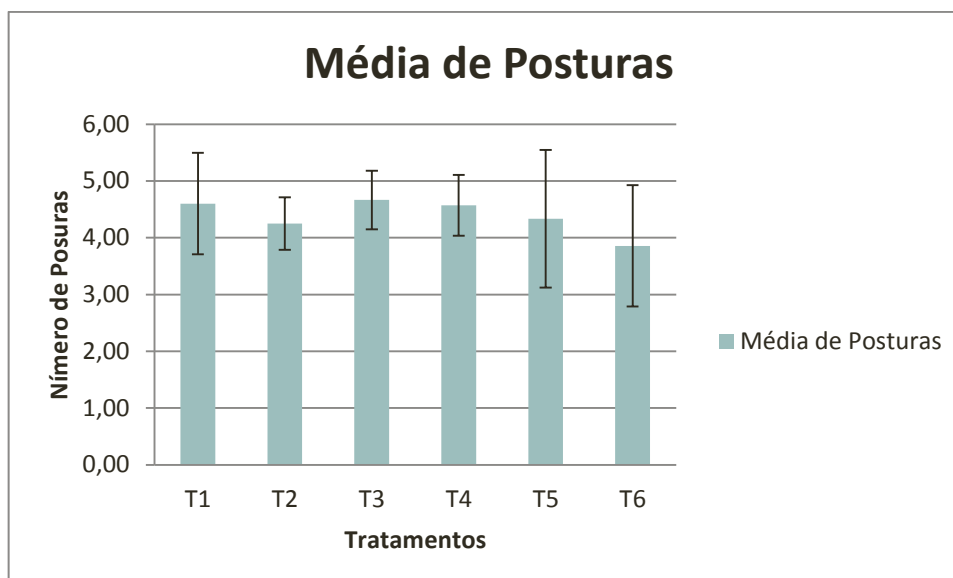


Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) do número médio de posturas entre os tratamentos com MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor $> 0,05$, não sendo estatisticamente significativo.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Tratamentos	5	8,133333	1,626666	0,31803	0,900018
Resíduos	54	276,2	5,114814		

Em relação ao número médio de neonatos por tratamento (Tabela 3), os tratamentos não alteraram a reprodução das fêmeas. Este dado pode ser confirmado na Tabela 4, pelo p-valor $> 0,05$, permanecendo dentro do limite, evidenciando assim que as concentrações usadas não foram tóxicas quanto à reprodução das dáfnias.

Tabela 3. Média e desvio padrão do número de neonatos produzidos por tratamento nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT.

Tratamentos	Número Médio de Neonatos
Controle	32,4 \pm 8,41
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	26,25 \pm 3,81
35 $\mu\text{g L}^{-1}$	29,86 \pm 8,11

55 $\mu\text{g L}^{-1}$	35,86 \pm 5,55
75 $\mu\text{g L}^{-1}$	26,5 \pm 6,86
100 $\mu\text{g L}^{-1}$	27,71 \pm 8,30

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) do número médio de neonatos produzidos entre os tratamentos com MT nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Tratamentos	5	590,55	118,11	0,482785	0,787566
Resíduos	54	13210,7	244,642592		

No tratamento de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ocorreu atraso na maturidade sexual, sendo a primeira postura média do tratamento no 10^o dia, enquanto que nos demais tratamentos a postura média ocorreu no 7^o e 8^o dia (Tabela 5). Em uma das réplicas do tratamento com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, a primeira postura ocorreu somente no 14^o dia. Resultados semelhantes foram encontrados por Dietrich et al. (2010), que observaram atraso na primeira reprodução dos organismos expostos à carbamazepina (CBZ) e ao diclofenaco (DIC).

Tabela 5. Média e desvio padrão da primeira postura dos tratamentos nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT.

Tratamentos	Média da Primeira Postura
Controle	8,0 ^o Dia \pm 0,0
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	8,0 ^o Dia \pm 0,5
35 $\mu\text{g L}^{-1}$	8,0 ^o Dia \pm 0,6
55 $\mu\text{g L}^{-1}$	7,7 ^o Dia \pm 0,8
75 $\mu\text{g L}^{-1}$	7,8 ^o Dia \pm 1,2
100 $\mu\text{g L}^{-1}$	10,0 ^o Dia \pm 2,0

De acordo com Miguel (2016) estudando o hormônio EE₂ (17 α -etinilestradiol) não afetou a segunda geração, mostrando que os organismos adquiriram resistência ao contaminante. Isso pode ser verificado no presente estudo, sendo que, mesmo atrasando a primeira postura do tratamento com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, isto não afetou o número de neonatos reproduzidos, assim como também pode ser verificado que mesmo na primeira postura o número de neonatos foi inferior aos outros tratamentos, mas na segunda postura o número de neonatos já tinha alcançado os números obtidos nos outros tratamentos.

Para Miguel (2016), os organismos expostos ao contaminante acabaram por criar uma resistência ao mesmo, causando efeitos sutis, mas que a longo prazo podem causar danos à biota aquática.

Em relação ao número médio de posturas e número médio de neonatos produzidos por tratamento nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, pode-se observar na Tabela 6 que não houve diferença entre os tratamentos, comprovada pelo teste estatístico (Tabelas 7 e 8).

Tabela 6. Média e desvio padrão do número de posturas e número de neonatos produzidos por tratamento nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT.

Tratamentos	Número Médio de Postura	Número Médio de Neonatos por Tratamento
Controle	1,33 \pm 0,52	3,00 \pm 1,67
750 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,17 \pm 0,41	2,67 \pm 1,63
1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,67 \pm 0,87	3,89 \pm 1,96
1250 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,44 \pm 0,53	3,22 \pm 1,30
1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,25 \pm 0,46	3,29 \pm 1,25

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) do número médio de posturas entre os tratamentos com MT nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Tratamentos	4	4,72	1,18	1,952205	0,118189
Resíduos	45	27,2	0,604444		

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) do número médio de neonatos produzidos entre os tratamentos com MT nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Tratamentos	4	24,68	6,17	1,677643	0,171797
Resíduos	45	165,5	3,677777		

Pode-se observar que o número médio de posturas e o número médio de neonatos produzidos nas concentrações de 750-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 6) são baixíssimos em relação ao tratamento com as concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 7 e Tabela 3). Tal dado pode ter relação com a contaminação por bactérias não identificadas, das microalgas usadas para a alimentação das dáfrias, podendo ter levando as dáfrias a não conseguirem se alimentar das microalgas diminuindo assim sua reprodução.

Pereira e Gonçalves (2008) em seu estudo observaram que as melhores taxas de reprodução eram encontradas em situações em que a comida era abundante, e que a escassez de alimento faz com que os organismos invistam em crescimento do que em reprodução.

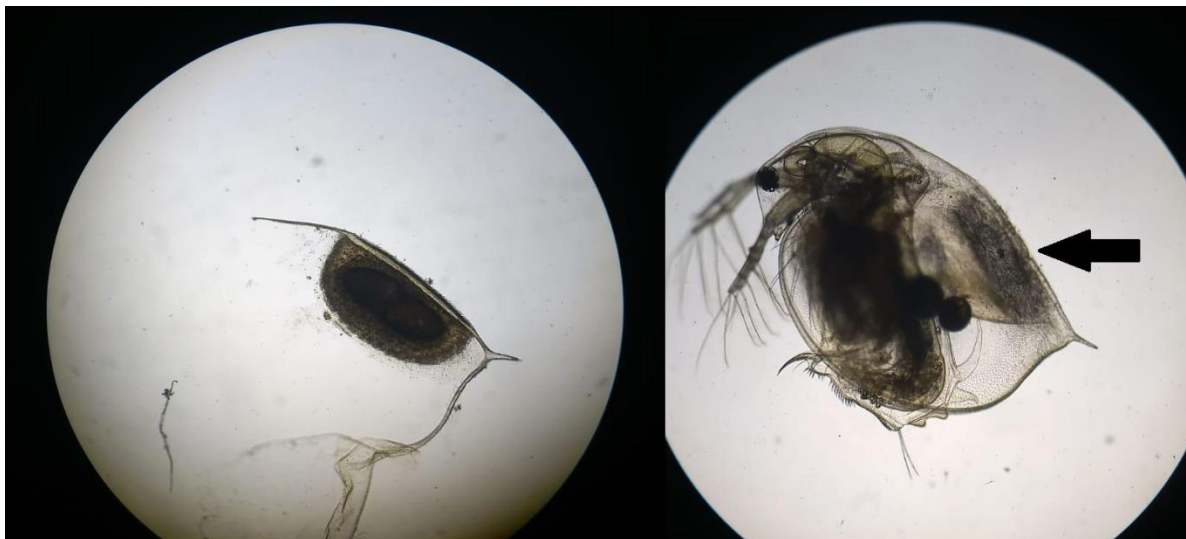
De acordo com Polishchuk e Vijverberg (2005), a importância para o organismo é manter-se vivo frente a um ambiente precário, retendo seu potencial reprodutivo para melhores condições no futuro.

As consequências mais devastadoras dos estrogênios ambientais ocorrem provavelmente na transferência da mãe para o feto ou para os ovos, resultando na ruptura do balanço hormonal no receptor, causando anormalidades reprodutivas, ou produzindo mudanças que resultarão em câncer quando a prole alcançar idade adulta (BAIRD, 2002).

De acordo com Lyche et al. (2013), os efeitos dos desreguladores endócrinos podem não ser tão intensos, não levando necessariamente o animal a se tornar infértil, mas podendo prejudicar seus descendentes.

O que pode ser verificado nos tratamentos com MT nas concentrações de 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi a formação de ovos haploides (Figura 10).

Figura 10. Ovos haploides encontrados nos tratamentos com MT nas concentrações de $1250 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1500 \mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: a autora.

A reprodução das dáfias ocorre por reprodução assexuada por meio de partenogênese, principalmente quando as condições de desenvolvimento são adequadas, produzindo mais fêmeas que alcançarão idade adulta. Essas fêmeas adultas se reproduzirão assexuadamente novamente se as condições favoráveis como alimentação, baixa densidade populacional e os principais fatores ambientais e de qualidade química da água forem adequados (ROMERO e CANTU, 2008). Frente a condições desfavoráveis e de estresse, as fêmeas irão produzir ovos haploides (não fecundados) que vão se desenvolver e eclodir organismos machos, iniciando a reprodução sexuada, isto é, os machos fecundarão as fêmeas produzindo ovos de resistência chamados efípios, que permanecerão no sedimento até que as condições ambientais sejam favoráveis novamente, e então eclodem (DE MEESTER et al., 2006).

Essa formação dos ovos haploides pode ter relação com estresse causado pelo hormônio, já que no controle não houve a formação dos ovos haploides.

ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Scenedesmus acuminatus*

A MT se mostrou tóxica para a microalga *Scenedesmus acuminatus* nas concentrações mais altas, inibindo até 41% do aumento da biomassa algácea, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Biomassa produzida em cada tratamento e o Fator de Toxicidade (FT) calculado para cada concentração.

	Biomassa Algácea Produzida (cél. mL⁻¹)	Fator de Toxicidade (FT)
Controle	108 x 10 ⁴	-
750 µg L ⁻¹	123,25 x 10 ⁴	NI
1000 µg L ⁻¹	117 x 10 ⁴	NI
1250 µg L ⁻¹	64,25 x 10 ⁴	40%
1500 µg L ⁻¹	63,75 x 10 ⁴	41%

NI-Não Inibiu

Czarny et al. (2019) testaram vários hormônios sobre o crescimento da cianobactéria *Anabaena variabilis*, e identificaram efeito tóxico, isto é, a inibição do crescimento algáceo. Para a testosterona a inibição ocorreu numa concentração de 50-100x10³ µg L⁻¹ após o 7º dia de exposição. Para progesterona, o efeito tóxico foi o mais forte, provocando a morte celular das cianobactérias a uma concentração de 75-100x10³ µg L⁻¹ no 13º dia e as menores concentrações inibiram o crescimento a partir do 2º dia. Para o hormônio 17α-etinilestradiol também foi verificado inibição do crescimento a partir do 2º dia de exposição.

Para Pocock e Falk (2014) o efeito negativo no crescimento e fotossíntese da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* ocorreu a uma concentração de 2,964x10⁻³ µg L⁻¹ do hormônio 17-α-etinilestradiol. Os dados obtidos por Liu et al. (2010) mostraram que a diatomácea *Navicula incerta* teve o crescimento inibido pelos hormônios 17α-etinilestradiol e 17β-estradiol e os valores de CE50 foram de 3,21 e > 10x10³ µg L⁻¹, respectivamente, confirmando o efeito tóxico dos estrogênios nas células das algas. A pesquisa de Balina et al. (2015) mostrou que o efeito inibitório de algas verdes *Desmodesmus communis* começou em uma concentração de 4-8 µg L⁻¹ de 17α-etinilestradiol, nas concentrações de 80-100 µg L⁻¹ houve redução de

50% do crescimento e em concentrações 100-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ reduziram o crescimento ao mínimo e chegaram a causar até mesmo a destruição das células.

De acordo com Czarny et al. (2019), verificou-se que a alga verde *Chlorella vulgaris* foi mais sensível aos efeitos dos vários hormônios testados do que *Scenedesmus armatus*. Assim como os dados obtidos por Salomão et al. (2014), que verificaram que a espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* foi mais sensível aos estrogênios testados do que *Desmodesmus subspicatus*. Os dados apresentados demonstram a importância de testar a mesma substância química em diferentes espécies.

Perron e Juneau (2011) em seu estudo conseguiram mostrar que várias espécies têm sensibilidade diferente aos desreguladores endócrinos, e que os mesmos podem ter efeitos drásticos nos fluxos de energia do fotossistema II. Para Balina et al. (2015) o efeito dos hormônios ocorreu no sistema fotossensorial das algas.

Wang et al. (2013) observaram que algumas mudanças específicas das espécies testadas, *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella* sp., ocorreram para combater o estresse oxidativo representado pelos estrogênios, mas que quanto à toxicidade elas eram tolerantes.

A toxicidade observada de MT sobre o crescimento da microalga foi medida por meio da Equação 1 descrita na metodologia. O crescimento algáceo foi inibido (Tabela 9), mostrando que MT foi tóxica nas maiores concentrações testadas, 1250 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

De acordo com os testes estatísticos essa variação não foi significativa. Isso pode ser explicado pelo fato de os tratamentos terem apenas duas repetições e os valores de umas das repetições terem se aproximado do controle (Tabela 10), não apresentando valores estatisticamente significativos (Tabela 11).

Tabela 10. Comparação entre as repetições e os tratamentos com a microalga.

	TRATAMENTOS									
	Controle		750 $\mu\text{g L}^{-1}$		1000 $\mu\text{g L}^{-1}$		1250 $\mu\text{g L}^{-1}$		1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2
Biomassa Inicial	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43
Biomassa Final	137,5	164,5	160	172,5	135	185	150	64,5	92,5	121

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos com MT e o controle, no qual o p-valor > 0,05, não sendo estatisticamente significativo.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat.F	p-valor
Fator	4	6745,75	1686,4375	1,46548	0,33774
Resíduos	5	5753,875	1150,775		

No segundo ensaio realizado com as mesmas concentrações houve certa contaminação das microalgas por bactérias não identificadas. Tal contaminação pode ter inibido o crescimento algáceo do controle, mas contribuiu para o crescimento das microalgas nos tratamentos como pode ser observado na Tabela 12. Após 96 horas de teste pode-se observar a inibição do controle e o crescimento dos tratamentos (Figura 11). O crescimento da biomassa das microalgas foi de 5,12 vezes o do controle, na concentração de $1500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 11. Teste de microalgas contaminado com bactérias não identificadas.



Fonte: a autora.

Tabela 12. Biomassa algácea inicial do controle e a biomassa algácea final, produzida em cada tratamento.

	Biomassa Algácea Inicial (cél. mL⁻¹)	Biomassa Algácea Final (cél. mL⁻¹)
Controle	46 x 10 ⁴	43,43 x 10 ⁴
750 µg L ⁻¹	-	117,36 x 10 ⁴
1000 µg L ⁻¹	-	179,6 x 10 ⁴
1250 µg L ⁻¹	-	180,76 x 10 ⁴
1500 µg L ⁻¹	-	222,36 x 10 ⁴

Estes valores foram estatisticamente significativos em relação ao controle como pode ser observado na Tabela 13, no qual p-valor < 0,05, pela ANOVA, e pelo Teste de Tukey, no qual as letras “a” e “b” indicam que as médias são diferentes dentro do tratamento (Tabela 14).

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos com MT e o controle.

	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat.F	p-valor
Fator	4	89125,064	22281,266	8,547448	0,002889261
Resíduos	10	26067,74	2606,774		

Tabela 14. Comparação das médias entre os tratamentos com MT e o controle contaminados por bactérias. Teste de Tukey ($\alpha=0,05$). As letras diferentes (a e b) indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

Tratamentos	Médias	Grupos
Controle	1,50	b
750 µg L ⁻¹	117,37	ab
1000 µg L ⁻¹	179,60	b

1250 $\mu\text{g L}^{-1}$	180,77	b
1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	222,37	b

Druzhinina et al. (2008) testaram a conversão de 17 α -metiltestosterona (MT) para metandrostenolona (META) através da bactéria *Pimelobacter simplex* utilizando ciclodextrinas para solubilização da MT em altas concentrações (até 20 g L^{-1}), obtendo grande êxito na degradação da MT para META.

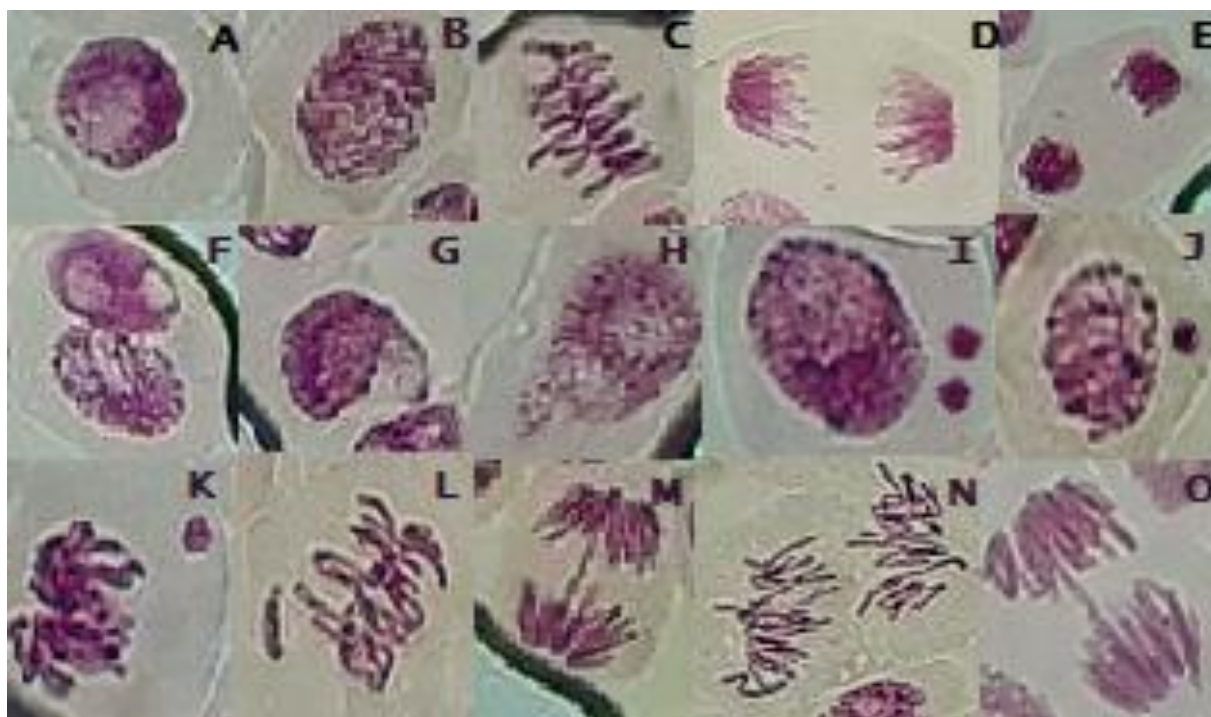
No presente estudo, as concentrações de MT foram relativamente baixas (até 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$), com isso, as bactérias encontradas nas amostras podem ter degradado a MT sem a necessidade de subprodutos.

Esses dados corroboram com os encontrados por Homklin et al. (2012), que isolaram bactérias encontradas em um viveiro masculinizador de tilápia do Nilo, das espécies *Rhodococcus equi*, *Nocardioides aromaticivorans* e *Nocardioides nitrophenolicus*, e observaram que em concentrações de 1-10 mg L^{-1} , todas as cepas degradaram a MT para produtos sem potência androgênica.

ANÁLISE CITOGENÉTICA COM *Allium cepa*

As fases que são consideradas normais e as alterações encontradas na divisão celular nos meristemas de *Allium cepa* podem ser localizadas na Figura 12.

Figura 12. Células meristemáticas de *Allium cepa* em divisão celular. Ampliação de 400x. A) Intérfase. B) Prófase normal. C) Metáfase normal. D) Anáfase normal. E) Telófase normal. F) Célula binucleada. G) Núcleo lobulado. H) Broto nuclear. I) Células com dois micronúcleos. J) Célula com micronúcleo. K) Prófase com micronúcleo. L) Metáfase com perda cromossômica. M) Anáfase com ponte. N) Anáfase com perda e multipolaridade. O) Anáfase com ponte e perda.



Fonte: a autora.

As aberrações cromossômicas (Figura 12, L, M, N e O) podem ocorrer espontaneamente ou pela exposição a agentes físicos ou químicos, sendo caracterizadas por mudanças estruturais de um cromossomo ou no número total de cromossomos (RUSSEL, 2002). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), existem agentes clastogênicos que induzem quebras cromossômicas, e agentes aneugênicos que resultam em perdas cromossômicas, atrasos, multipolaridade, pontes, c-metáfases e aderências.

Os micronúcleos (Figura 12, I, J e K) são menores que o núcleo principal, contêm material cromatínico, e são provenientes de quebras (fragmentos de cromossomos) ou perdas cromossômicas (cromossomos inteiros), não sendo incluídos no núcleo principal durante a mitose (FENECH et al., 1999; MANELLI-OLIVEIRA et al., 2003; BONOMO, 2014). Além das perdas e quebras alguns autores citam também a formação de micronúcleos por meio de distúrbios do fuso mitótico (MANELLI-OLIVEIRA et al., 2003) e consequência de danos nas células parentais, não reparados ou reparados de forma errada (BONOMO, 2014).

Para Caritá e Marin-Morales (2008) aberrações cromossômicas podem levar também a anormalidades nucleares (Figura 12, G e H). Os núcleos lobulados são decorrentes de anáfases multipolares com pontes cromossômicas. No momento da reestruturação nuclear, o envoltório acompanha a distribuição irregular do material genético. Os brotos nucleares têm relação com a reorganização do envoltório nuclear, no qual o broto se desprende do núcleo formando um micronúcleo, podendo ser expulso da célula sob a forma de minicélula (CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008).

As células binucleadas (Figura 12, F) podem ser formadas por meio da divisão mitótica a partir de uma célula binucleada pré-existente ou por um processo incompleto da divisão celular (MANELLI-OLIVEIRA et al., 2003).

Os resultados dos testes com MT mostraram que as duas concentrações testadas, 750 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, induziram alterações nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas por 72 horas, em relação ao controle negativo (Tabela 15).

Tabela 15. Média e desvio padrão das anormalidades encontradas nas células meristemáticas de *Allium cepa* das três repetições dos tratamentos.

TRATAMENTOS	MN	AN	CB	AC
CN	11,33 ± 9,45	19,33 ± 9,02	2,67 ± 2,52	20,33 ± 10,02
CP	79,67 ± 3,79*	56,33 ± 17,47*	10,67 ± 5,03	30,67 ± 14,57
750 $\mu\text{g L}^{-1}$	25,33 ± 11,85*	41,67 ± 7,02**	6,67 ± 2,52	32,00 ± 3,61
1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	14,67 ± 4,04	22,67 ± 8,02	6,67 ± 3,79	31,33 ± 14,50

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; MN: Micronúcleos; AN: Anormalidades Nucleares; CB: Célula Binucleada; AC: Aberrações Cromossômicas * Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pelo teste de Dunnett. ** Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pela ANOVA.

Na Tabela 16 pode-se observar que na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ os resultados de MN e AN foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

Diferença estatística na frequência de MN foi detectada ($p < 0,05$) por meio do teste de Dunnett e para AN a diferença estatística ($p < 0,05$) foi detectada pela ANOVA.

Tabela 16. Média e desvio-padrão das frequências de MN, BN, NL, CB e AC, por 5000 células, referente ao tratamento com MT e controles negativo e positivo em raízes de *Allium cepa*.

	MN	AN	CB	AC
CN	0,0016 \pm 0,0008	0,0039 \pm 0,0018	0,0005 \pm 0,0005	0,0041 \pm 0,0020
CP	0,0159 \pm 0,0007*	0,0113 \pm 0,0035*	0,0021 \pm 0,0010	0,0063 \pm 0,0028
750 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,0051 \pm 0,0024*	0,0083 \pm 0,0014**	0,0013 \pm 0,0005	0,0064 \pm 0,0007
1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,0029 \pm 0,0008	0,0045 \pm 0,0016	0,0013 \pm 0,0007	0,0063 \pm 0,0029

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; MN: Micronúcleos; AN: Anormalidades Nucleares; CB: Célula Binucleada; AC: Aberrações Cromossômicas * Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pelo teste de Dunnett. ** Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pela ANOVA.

Micronúcleos e anormalidades nucleares são produtos de aberrações cromossômicas. Apesar da concentração de 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT não ter apresentado dados estatisticamente significativos, pode-se observar na Tabela 1 que houve aumento de aberrações cromossômicas em relação ao controle negativo, não descartando a hipótese de que tais alterações acarretariam produtos como anormalidades nucleares e micronúcleos, como encontrados na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em estudos feitos por Rivero-Wendt et al. (2013), na concentração de 0,01 mg L^{-1} de MT, verificou-se alterações na frequência de MN e AN em *Astyanax bimaculatus*, evidenciando-se que o MT tem ação genotóxica moderada e causa alterações no sistema reprodutivo de espécies nativas, demonstrando risco ambiental.

A baixa frequência de alterações encontradas nas concentrações testadas de MT pode ser explicada por Cavalieri et al. (2000). De acordo com o autor, os ensaios de mutagenicidade detectam frequência de alta mutação de substâncias carcinogênicas potentes, e estrogênios podem ser fracamente mutagênicos. Nesse sentido os autores citam que as condições do ensaio de mutagenicidade podem ter que ser redesenhadas para detectar baixas frequências de mutação em múltiplos loci gênicos com alta exatidão e precisão.

Duas possíveis explicações para a diminuição na frequência de anormalidades na concentração mais alta do hormônio envolvem a possível adsorção nas fibras celulósicas, por interação química com os grupos hidroxila, diminuindo a disponibilidade para as células e a possibilidade de formação de aglomerados ou a dimerização (união de dois monômeros) da molécula que altera suas propriedades químicas e pode afetar sua interação com as células da *A. cepa* (DELLAGRECA et al., 2002).

CONCLUSÃO

A formação de micronúcleos e anormalidades nucleares na concentração de 750 L^{-1} foi estatisticamente significativa, ficando o alerta para ação mutagênica do hormônio 17α -metiltestosterona. O sistema-teste *Allium cepa* se mostrou eficaz para detectar o menor nível de toxicidade do hormônio.

O MT foi tóxico para as microalgas, que tiveram seu crescimento inibido nas maiores concentrações de MT, $1250 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

No ensaio com *Daphnia magna* houve o aparecimento de ovos haploides nas maiores concentrações $1250 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1500 \mu\text{g L}^{-1}$, podendo ocorrer tal alteração pelo estresse causado pelo MT.

De acordo com os dados obtidos, cada espécie age de forma diferente a exposição à mesma substância, sendo imprescindíveis outras espécies para testar o grau de toxicidade do MT.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o MT causa efeitos tóxicos em baixas concentrações. Diante do exposto é indispensável que tenham estudos mais aprofundados desta substância, obtendo assim um valor máximo de lançamento nos corpos hídricos, para que o hormônio seja inserido na Resolução nº 357/2005 do CONAMA, havendo tratamento dos efluentes das pisciculturas para posterior lançamento nos corpos hídricos, minimizando assim possíveis danos aos ecossistemas aquáticos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, B. R. do. Degradação eletroquímica de desreguladores endócrinos: o hormônio metiltestosterona. **Dissertação** (Pós-Graduação em Química), USP – Universidade de São Paulo, São Carlos. 2012.

AMORIM, F. S. Determinação de 17 α -metiltestosterona em amostras de sedimentos de tanques de piscicultura de peixes tilápia do nilo. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade de Brasília, UNB, Brasília, 2013.

ANDRADE, B. R. G. Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *Allium cepa* da parationa metilica antes e após aplicação dos processos UV e UV/H₂O₂. **Tese**, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

AQUINO, S. F. de.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. de L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.18 n.3, jul/set 2013, 187-204.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2^o ed – Porto Alegre: Bookman, 2002.

BALINA, K.; BALODE, M.; MUZIKANTE, L.; BLUMBERGA, D. Impact of synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on growth of microalgae *Desmodesmus communis*. **Agron. Res.**, 13, 445–454, 2015.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, 144 (2016) 475 – 483.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007.

BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; PINTO, D. F. H.; MARCOS, R. M.;

BARBERO, L. Idade de maior sensibilidade de tilápias-do-nylo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.1-6, 2007.

BONOMO, M. M. Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em *Carica papaya* L. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

BRASIL. 2005. **Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA**. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

BRASIL. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 16 p., 2003.

BRASIL. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.373**: Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 12 p., 2003.

BRASIL. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. São Paulo, 2016.

BRASIL. IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 43, p.1-49, ISSN 0101-4234, 2016.

BRASIL. IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 43, p.1-49, ISSN 0101-4234, 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Vegetal, 365 p., 2009.

BRASIL. MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de Desenvolvimento da**

Aquicultura Brasileira – 2015/2020. Brasília/DF, 2015.

CABRERA G. L.; RODRIGUEZ D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, 426: 211-214. 1999.

CARDOSO, A. S. Uso de ferramentas integradas para avaliação da qualidade da água de um sistema de piscicultura no semiárido de Pernambuco, Brasil. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade de Pernambuco, Recife. 2017.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A.. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72, 722-725, 2008.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. da S.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. Dossie Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **Abrasco**, Rio de Janeiro, 623 p., 2015.

CAVALIERI, E.; FRENKEL, K.; LIEHR, J. G.; ROGAN, E.; ROY, D. Chapter 4: Estrogens as endogenous genotoxic agents – DNA adducts and mutations. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 27, 75-93, 2000.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Considerações da CETESB sobre ensaios ecotoxicológicos e de bioacumulação, em contraponto ao documento apresentado pela SEP na 5a Reunião do GT de Dragagem.** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/E4B1AB8F/Doc_ConsidBioacumulacao_CETESB.pdf>. Acesso em: 24 julho 2017.

COLLISCHONN, W.; TASSI, R. **Introduzindo hidrologia.** Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Hidráulicas, IPH UFRGS, 2008.

CULCLASURE, D. F. **Sistema endócrino.** 1973.

CZARNY, K.; SZCZUKOCKI, D.; KRAWCZYK, B.; SKRZYPEK, S.; MIĘKOŚ, E.; GADZAŁA-KOPCIUCH, R. Inhibition of growth of *Anabaena variabilis* population by single and mixed steroid hormones. **J. Appl. Phycol.** 31, 389–398, 2019.

DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; PREVITERA, L.; TEMUSSI, F.; ZARRELLI, A. Solid-state photodimerization of steroid enones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 9011-9015, 2002.

DE MEESTER, L., VANOVERBEKE, J.; DE GELAS, K.; RTELLES, R.; SPAAK, P. Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations- a conceptual framework. **Arch Hydrobiol.**, v.167, p.217-244, 2006.

DIETRICH, S.; PLOESSL, F.; BRACHER, F.; LAFORSCH, C. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. **Chemosphere**, Volume 79, Issue 1, March, , Pages 60-66, 2010.

DRUZHININA, A. V.; ANDRYUSHINA, V. A.; STYTSENKO, T. S.; VOISHVILLO, N. E. Conversion of 17 α -methyltestosterone to methandrostenolone by the bacterium *Pimelobacter simplex* vkpm ac-1632 with the presence of cyclodextrins. **Applied Biochemistry And Microbiology**, vol. 44, n^o. 6, 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp, 2016.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER E.; BONASSI, S. The HUMAN MicroNucleus Project-an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutat. Res.**, 428, pp. 271-283, 1999.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin

herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Volume 88, Issue 3, Pages 252-259, 2007.

GADANO A.; GURNI A.; LÓPEZ P.; FERRARO G.; CARBALLO M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. L. **J Ethnopharmacol** 81: 11-16, 2002.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium cepa*, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research** 99, 273-291, 1982.

HOMKLIN, S.; ONG, S. K.; LIMPIYAKORN, T. Degradation of 17 α -methyltestosterone by *Rhodococcus* sp. and *Nocardioides* sp. isolated from a masculinizing pond of Nile tilapia fry. **Journal of Hazardous Materials**, 221– 222, 35– 44, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6341**: Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test. 4 ed. 22p. 2012.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos – Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 289 p.: il. ISBN 85-97391-05-4, 2004.

LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. 682, 71–81, 2009.

LIU, Y.; GUAN, Y.; GAO, Q.; TAM, N. F. Y.; ZHU, W. Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. **Chemosphere**, 80, 592–599, 2010.

LYCHE, J. L.; GRZEŚ, I. M.; KARLSSON, C.; NOURIZADEH-LILLABADI, R.; BERG, V.; KRISTOFFERSEN, A. B.; SKÅRE, J. U.; ALESTRØM, P.; ROPSTAD, E. Parental exposure to natural mixtures of POPs reduced embryo production and altered gene transcription in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 424-434, 2013.

MAGALHÃES, D. de P.; FERRÃO FILHO, A. da S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, 12 (3): 355-381, 2008.

MANAHAN, S.E. **Química ambiental**, Porto Alegre: Bookman, 9ª. Ed, 2013.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; DIAS, V. M. Micronúcleos centrômero-positivos em células tumorais tratadas com afidicolina. **Anais**. São Paulo: Comissão de Pesquisa do ICB/USP, 2003.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SCHAMBER, C. R.; BOMBARDELLI, R. A. Fontes protéicas suplementadas com aminoácidos e minerais para a Tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.1-6, 2005.

MIGUEL, M. Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). **Dissertação** (Escola de Engenharia de São Carlos), Universidade de São Paulo - USP. 2016.

MORAES, N. V.; GRANDO, M. D.; VALERIO, D. A. R.; OLIVEIRA, D. P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2008.

MREMA, E. J.; RUBINO, F. M.; BRAMBILLA, G.; MORETTO, A.; TSATSAKIS, A. M.; COLOSIO, C. Persisten organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. **Toxicology**, v. 307, p. 74-88, 2013.

MURRAY, C. M.; EASTER, M.; MERCHANT, M.; RHEUBERT, J. L.; WILSON, K. A.; COOPER, A.; MENDONÇA, M.; WIBBELS, T.; MARIN, M. S.; GUYER, C. Methyltestosterone alters sex determination in the *American alligator* (*Alligator mississippiensis*). **General and Comparative Endocrinology**, 236, 63–69, 2016.

NOUR, E. A. A.; CANDELLO F. P.; SANTOS E. M. R. dos; BARRETO, A. S.; DOMINGUES L. M. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contaminaion**, v. 09, n. 1, 77-85, 2014.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, vol.2, nº1, fev, 2009.

PASSADOR, C. S.; PASSADOR, J. L.; ROSA, A.B. de S.; ALVES, T. Arranjo Produtivo Local de Aquicultura do Baixo São Francisco. **Anais. EnAPG – Encontro de Administração Pública e Governança**. São Paulo/SP – 22 a 24 de novembro de 2006.

PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F. Daphnia fitness over a food gradient: Is body size the single trait predicting exploitative ability? **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, 44:169-179, 2008.

PERRON, M.-C. & JUNEAU, P. Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria. **Environmental Research**, 111(4), 520–9, 2011.

POCOCK, T.; FALK, S. Negative Impact on Growth and Photosynthesis in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the Presence of the Estrogen 17 α -Ethinylestradiol. **PLoS ONE**, 9, e109289, 2014.

POLISHCHUK, L. V.; VIJVERBERG, J. Contribution analysis of body mass dynamics in Daphnia. **Oecologia**, 144: 268-277, 2005.

POMPEO, M.; SILVA, D. C. V. R. da; PAIVA, T. C. B. de. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 340, cap. 22, 2015.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified Allium test as a tool in the screening of the

genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**. 118: 49-53, 1993.

RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K., **Mutagênese Ambiental**, first ed., Canoas, pp. 174, 2003.

RIVERO-WENDT, C. L.; MIRANDA-VILELA A. L.; FERREIRA M. F.; BORGES A. M.; GRISOLIA C. K. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Genet Mol Res**. Sep 23;12(3):3862-70, 2013.

RIVERO-WENDT, C. L. G.; OLIVEIRA, R.; MONTEIRO, M. S.; Inês Domingues, I.; SOARES, A. M. V. M.; GRISOLIA, C. K. Steroid androgen 17 α -methyltestosterone induces malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 44, 107–113, 2016.

RODRIGUES, D. O.; SILVA, S. L. R. da; SILVA, M do S. R. da. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazonica**, vol. 39 (4), p. 935 – 942, 2009.

ROMERO, P. R.; CANTÚ, A. M. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. **Instituto Nacional de Ecología**, 2008.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004.

RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc., p. 595-621, 2002.

SALOMÃO, A. L.; SOROLDONI, S.; MARQUES, M.; HOGLAND, W.; BILA, D. M. Effects of single and mixed estrogens on single and combined cultures of *D.*

subspicatus and *P. subcapitata*. **Bull Environ Contam Toxicol**, 93:215–221, 2014.

SEBRAE – Serviço De Apoio Às Micro E Pequenas Empresas. **Aquicultura no Brasil – Série de estudos mercadológicos**. Brasília/DF. 2015. Disponível em: <[https://bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](https://bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)>. Acesso: 27 de fevereiro de 2019.

SISINNO, C.L.S.; BULUS, M.R.M.; RIZZO, A.C.; MOREIRA, J.C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, p.137-140, 2006.

VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. R.; PIAU, R. J.; TORRES, M. B. A.; RÖNNAU, M.; SOUZA, J. C. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. **Homeopathy**, volume 97, p. 190-195, 2008.

WANG, P.; WONG, M. H.; TAM, N. F. Y. Antioxidant responses of two microalgae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella* sp., to estradiol and ethinylestradiol. **Journal of Applied Phycology**, Volume 25, Issue 3, pp 891–903, 2013.

ZANARDI, M. F.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; URBINATI, E. C.; FAGUNDES, M.; SANTOS, M. A. dos.; MATAQUEIRO, M. I. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nylo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.7-11, 2011.

ZERULLA, M.; LÄNGE, R.; STEGER-HARTMANN, T.; PANTER, G., HUTCHINSON, T.; DIETRICH, D. R. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicology Lett.** 131 (1-2): 51-63, 2002.

ANEXOS

Anexo A – Água reconstituída (Meio M4)

Soluções descritas para o Meio M4:

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
3	KCl	5,8	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
4	NaHCO ₃	64,8	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
5	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,21	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	LiCl	6,12	
	RbCl	1,42	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3,04	
	CuCl ₂ .2H ₂ O ^a	0,335	
	ZnCl ₂ ^a	0,260	
6	CoCl ₂ .6H ₂ O ^a	0,200	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	NaNO ₃	0,548	
	H ₃ BO ₃	5,719	
	NaBr	0,032	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,126	
	NH ₄ VO ₃	0,0011 5	
	KI	0,006 5	
Na ₂ SeO ₃	0,004 38		
7	Na ₂ SiO ₃	21,465	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL, deixando em agitação até o clareamento da solução
8	Na ₂ EDTA.7H ₂ O ^b	0,500	Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água processada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121 °C durante 15 min
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,199 1	
9	KH ₂ PO ₄	0,286	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	K ₂ HPO ₄	0,368	
10	Hidrocloreto de tiamina	0,750	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL. Congelar em volume adequado no máximo até 30 dias
	Cianocobalamina (vitamina B12)	0,010	
	D (+) Biotina	0,007 5	

^a Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel-alumínio.

^b O EDTA é fotodegradável.

Volume das soluções para o preparo da água reconstituída para cultivo – Meio M4:

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume mL	3,2	0,8	0,8	0,8	0,1	0,5	0,2	5,0	0,5	0,1 ^a
^a Descongelar e adicionar imediatamente.										

Volume das soluções para preparo da água de diluição:

Solução	1	2	3	4
Volume mL	3,2	0,8	0,8	0,8

Anexo B – Preparo do meio de cultura para microalgas

Soluções para preparo do meio de cultura:

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	NaNO ₃	25,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
4	K ₂ HPO ₄	7,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
5	KH ₂ PO ₄	17,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
6	NaCl	2,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
7	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	50,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	KOH	31,0	
8	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL. Acidificar a solução com 1 mL de HCl 1N
9	H ₃ BO ₃	11,42	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
10	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,008 82	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,001 44	
	MoO ₃	0,000 71	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,001 57	
	Co(NO ₃).6H ₂ O	0,000 49	

Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura:

Solução	1 a 6	7 a 10
Volume mL	10	1