

Avaliação do impacto causado pela disponibilidade de 17 β -estradiol livre ou complexado à β -ciclodextrina no ambiente aquático sobre *Oreochromis niloticus* (tilápia)

[Impact evaluation caused by disponibility of free and complexed 17 β -estradiol into cyclodextrin in the aquatic environment in tilapia (*Oreochromis niloticus*)]

M.C.G. Silva, S.C.B.L. Silva, T.P. Santos, P.R.L. Soares, A.L.C. Andrade,
M.R.S. Cadena, P.G. Cadena*

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

RESUMO

Foram avaliados os efeitos tóxicos do hormônio 17 β -estradiol (E₂) livre e complexado à β -ciclodextrina (CD) sobre o comportamento e a fisiologia de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os peixes foram observados por 30 dias, em dois estágios do desenvolvimento (alevino e juvenil), pelo método *ad libitum*, para a confecção de um etograma. Posteriormente, juvenis foram divididos em três grupos: controle e expostos ao E₂ (10ng/L) livre e complexado à β -ciclodextrina (β -CD:E₂) por 90 dias. Foram avaliados o comportamento pelo método de varredura instantânea, o consumo de ração, o ganho de peso e a mortalidade em diferentes intervalos. Os alevinos e os juvenis apresentaram frequências de exibição comportamentais diferentes (P<0,05) nos eventos: *Afastar* (4,7 \pm 1,3 e 3,6 \pm 0,6%) e *Ondulação de repulsão* (2,3 \pm 0,9 e 1,3 \pm 1,0%). Os juvenis expostos ao complexo β -CD:E₂ apresentaram aumento (P<0,05) na exibição dos comportamentos agressivos, como *Afastar*, *Ataque caudal*, *Confronto prolongado*, *Perseguição*, *Fuga*, e menor mortalidade, quando comparados ao grupo exposto ao E₂ livre e controle. Pode-se concluir que a complexação do E₂ com a β -CD alterou a toxicidade do E₂, pois promoveu um aumento na frequência de exibição dos comportamentos agressivos e interferiu na mortalidade dos animais.

Palavras-chave: comportamento animal, etograma, complexo de inclusão, sobrevivência

ABSTRACT

Toxic effects of free and complexed 17 β -estradiol (E₂) hormone into β -cyclodextrin (CD) on the behavior and physiology of tilapia (*Oreochromis niloticus*) were evaluated. The fish were observed for 30 days in two stages of development (fingerling and juvenile) by the *ad libitum* method to make an ethogram. After this, juveniles were divided into three groups: control and exposed to free E₂ (10ng/L) and complexed into β -cyclodextrin (β -CD:E₂) for 90 days. The behavior was evaluated through scan sampling method, feed intake, body mass and mortality at different intervals. The fingerlings and juveniles showed behavioral patterns with different display frequencies (P<0.05) for events: *Move Away* (4.7 \pm 1.3 and 3.6 \pm 0.6%) and *Waving Repulsion* (2.3 \pm 0.9 and 1.3 \pm 1.0%). The juveniles exposed to β -CD:E₂ complex showed a significant increase (P<0.05) in the frequency of display of aggressive behaviors as *Move Away*, *Caudal Attack*, *Clash Extended*, *Chase*, *Escape* and decrease of mortality when compared to group exposed to free E₂ and control. In conclusion, complexation of E₂ into β -CD modified E₂ toxicity, because it promoted an increase in the frequency of display of aggressive behaviors and it affected the mortality of animals.

Keywords: animal behavior, ethogram, inclusion complex, mortality

INTRODUÇÃO

Devido às características químicas dos hormônios esteroides como a hidrofobicidade, a indústria farmacêutica vem utilizando

substâncias químicas para superar essa limitação, sendo possível complexar esses hormônios a ciclodextrinas (CDs) (Oishi *et al.*, 2008). CDs são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por um número variável de unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas α -(1,4). São

Recebido em 22 de agosto de 2016

Aceito em 22 de fevereiro de 2017

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: pabyton.cadena@ufrpe.br

estruturas troncocônica e se caracterizam por possuírem cavidade de natureza apolar, que contrasta com o exterior hidrofílico (Del Valle, 2004; Brewster e Loftsson, 2007). Devido a isso, podem formar complexos de inclusão hospedando moléculas hidrofóbicas em seu interior. São utilizadas com o objetivo de melhorar as características farmacocinéticas de substâncias, aumentando a biodisponibilidade, a estabilidade e diminuindo a volatilidade (Brewster e Loftsson, 2007). Seus efeitos tóxicos são conhecidos em humanos devido a sua ampla utilização na farmacêutica, na indústria alimentícia e de cosméticos, onde apresenta nefrotoxicidade por via parenteral, mas não foram relatados efeitos tóxicos por via oral (Del Valle, 2004; Brewster e Loftsson, 2007). Porém, os efeitos desses complexos de inclusão como poluente ambiental e seus efeitos em animais são pouco descritos na literatura. Adicionalmente, hormônios esteroides, quando complexados a CDs, podem se apresentar como disruptores endócrinos (DEs). Os DEs são persistentes e passíveis de sofrerem biomagnificação, principalmente em animais dulciaquícolas (Wu *et al.*, 2016), que são sensíveis a baixas concentrações em níveis subletais. Nesses casos, foram observadas principalmente alterações comportamentais e reprodutivas, que podem levar a desequilíbrios populacionais em ambientes aquáticos (Santos *et al.*, 2016; Denslow e Sepúlveda, 2008). Isso destaca a necessidade de maiores estudos dos efeitos de toxicidade decorrente da disposição desses complexos de inclusão entre CDs e fármacos na biota aquática.

Contaminantes naturais e sintéticos presentes em concentrações na faixa de pg/L a ng/L apresentam um risco à saúde dos ecossistemas, pois existe uma carência na avaliação dos seus efeitos fisiológicos, no conhecimento de suas fontes, no comportamento no ambiente e nos níveis tóxicos de concentração (Fernandes *et al.*, 2011). Entre esses contaminantes, os DEs têm despertado atenção científica por causa de sua distribuição generalizada e de seus efeitos potencialmente nocivos para a saúde (Wu *et al.*, 2016). Estes são capazes de mimetizar os efeitos moleculares de hormônios endógenos ou de causar desequilíbrio hormonal, por interferirem na sua síntese, na secreção, no transporte, no metabolismo e na excreção, conseqüentemente, na reprodução, no desenvolvimento e no

comportamento de espécies animais (Denslow e Sepúlveda, 2008). Estrógenos como o 17 β -estradiol (E₂) regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e suas funções reprodutivas, pois deles depende a formação dos ovários nas fêmeas (Guiguen *et al.*, 2010). Esse hormônio possui conformações reconhecidas pelos receptores e, portanto, é considerado responsável pela maioria dos efeitos disruptores, quando dispostos nos efluentes, como redução do tamanho das gônadas, feminização de peixes machos e problemas no desenvolvimento do sistema imune (Tilton *et al.*, 2005; McLachlan *et al.*, 2006; Seemann *et al.*, 2015).

Anteriormente, Santos *et al.* (2016) haviam estudado os efeitos de DEs presentes em contraceptivos orais combinados sobre o comportamento agressivo de *Betta splendens*. Hoje, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do 17 β -estradiol livre e complexado à ciclodextrina sobre o comportamento e a fisiologia de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Trata-se de um peixe de ampla aceitação pelo mercado consumidor, com produção mundial em 2014 de quase quatro milhões de toneladas (Species..., 2016), o qual apresenta agressividade natural, sendo assim um bom modelo animal para avaliar alterações comportamentais provenientes da exposição ao 17 β -estradiol livre e complexado à CDs.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – Leca, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. O 17 β -estradiol e a β -ciclodextrina (SIGMA, EUA) e os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. As tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram obtidas da Estação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike – Departamento de Pesca da UFRPE. Os protocolos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – Ceua/UFRPE, licença 001/2014. No laboratório, os animais foram aclimatados por 15 dias, sendo acondicionados em aquários aerados, em temperatura ambiente (27°C), sempre com densidade de um animal para aproximadamente 12 litros de água e ciclo de luz natural. *O. niloticus* foram alimentados *ad libitum*, com ração comercial extrusada (45% de proteína bruta) uma vez ao dia, com quantidade crescente

de acordo com o crescimento do animal. Em relação aos parâmetros abióticos, o pH e o oxigênio dissolvido (OD) foram aferidos semanalmente com potenciômetro e medidor de OD portátil, durante todos os experimentos. Foram utilizados *kits* comerciais da marca Alcon Labtest, para nitrito, amônia tóxica e amônia total.

Para a construção do etograma e análise comportamental comparativa, 14 animais, sendo sete alevinos ($9,7 \pm 1,1$ g, $3,8 \pm 0,2$ cm) e sete juvenis ($38,0 \pm 1,3$ g, $14,3 \pm 0,6$ cm) foram separados e alocados em aquários de 85L cada. O etograma foi construído pelo método *ad libitum* (Altmann, 1974) por 30 dias, a uma distância preestabelecida (2,5m), de modo a não influenciar na exibição comportamental. Foram utilizados indivíduos em estágios de desenvolvimentos distintos (alevinos e juvenis) para que houvesse a possibilidade de comparação do padrão comportamental em diferentes estágios de desenvolvimento. A coleta dos dados comportamentais com o etograma foi realizada pelo método de *scan sampling* (Altmann, 1974), por 30 minutos, com um minuto de observação e um minuto de intervalo.

Para os testes de exposição química, os animais foram submetidos a concentrações dos hormônios em teste de toxicidade crônica, em sistema semiestático por 90 dias, e divididos em três grupos de peixes juvenis alocados em aquários de 85L, com sete animais cada, sendo quatro machos e três fêmeas por grupo, identificados mediante sexagem manual, por meio do exame da papila urogenital (Ávila e Romagosa, 2005). Os grupos foram: controle (grupo C) sem adição do hormônio, 17β -estradiol (grupo E) na concentração de 10ng/L, com adição de solução aquosa do complexo de inclusão β -ciclodextrina – 17β -estradiol (β -CD:E2), na proporção de 1:1 em mol/L, mantendo-se a concentração de E2 em 10ng/L (grupo BE). A técnica de coprecipitação (Del Valle, 2004; Oishi et al., 2008) foi utilizada para formação dos complexos de inclusão entre a β -CD e o hormônio E₂ em meio aquoso. A β -CD foi primeiramente solubilizada em água, e o E₂ dissolvido em etanol (10%), com posterior evaporação do álcool. A solução de E₂ foi

adicionada sob agitação à solução de CD para permitir a complexação deles. Os complexos de inclusão formados foram armazenados sob refrigeração (4°C) para posterior uso. Houve renovação completa da água dos aquários semanalmente e reposição das concentrações hormonais utilizadas.

Durante os testes de exposição química com os animais, foi mensurado o comportamento animal conforme descrito anteriormente. Os dados comportamentais foram agrupados a cada 30 dias, somando três períodos de exposições distintos (zero a 30, 30 a 60 e 60 a 90 dias). O consumo médio de ração foi avaliado diariamente conforme descrito por Zuanon et al. (2009). Após a determinação do tempo para a saciedade, os restos de ração foram removidos dos aquários para evitar contaminação. Para a avaliação do ganho de peso, foi mesurada a diferença entre os pesos inicial e final dos animais. A mortalidade foi verificada diariamente. Os resultados foram expressos na forma de média e desvio-padrão e comparados por análise de variância simples (*One Way ANOVA*). Quando o resultado foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando-se o *software* Origin Pro Academic 2015 (*Origin Lab*. Northampton, MA USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Para os parâmetros físico-químicos, a temperatura da água nos aquários não apresentou variação maior que 0,5°C durante o experimento e o pH apresentou faixa entre 6,7 e 7,3. Para o OD, os valores sempre foram superiores a 9mg/L. Para o nitrito, foram encontrados valores de 0,25mg/L, e não foram observados valores de nitrito. Para amônia tóxica, foram encontrados valores inferiores a 1mg/L.

Entre os dados obtidos a partir do método *ad libitum* (Altmann, 1974) para a elaboração do etograma, foram identificados 24 comportamentos, agrupados nas categorias: Alimentação, Locomoção, Social e Resposta ao estresse, que podem ser observados na Tab. 1.

Avaliação do impacto...

Tabela 1. Etograma dos alevinos e juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Evento	Sigla	Descrição
Categoria Alimentação		
Forragear	FO	O animal posiciona-se quase de maneira vertical, próximo ao substrato, procurando alimento.
Procurar	PR	O animal se mantém próximo à lâmina d'água e nada obliquamente, procurando alimento
Capturar rápido	CR	O animal nada até a lâmina d'água, captura o alimento na superfície e volta subitamente ao fundo do aquário, podendo repetir diversas vezes.
Capturar prolongado	CP	O peixe permanece se alimentando na superfície da água, fazendo movimentos rápidos com a boca em direção ao alimento, a fim de ingeri-lo.
Regurgitar	RG	O animal, depois de saciado, ingere o alimento, mastiga e lança as partículas novamente na água pela boca.
Categoria Social		
Afugentar	AG	O animal nada em direção ao oponente rapidamente, podendo ou não haver contato, provocando o afastamento do outro.
Afugentar prolongado	AP	O animal (1) passa a ocupar uma boa parte da área do aquário e afugenta os outros animais (2), que ficam restritos a um pequeno espaço.
Afastar	AT	O animal (1) se afasta com um movimento curto do oponente (2) após sofrer um ataque.
Exibição lateral	EL	O peixe se aproxima lateralmente do outro, abre a boca, mas não ocorre contato físico com o oponente. Esse comportamento pode culminar em um ataque.
Ataque lateral	AL	O peixe abre a boca e percorre com ela o corpo do oponente, fechando-a no momento do contato. O ataque pode ocorrer nas laterais medianas do corpo, no dorso, nas nadadeiras do outro animal.
Ataque rápido	AR	O peixe nada próximo à lâmina d'água e desce rapidamente, fazendo um ataque ao oponente.
Ataque caudal	AC	O animal nada próximo ao oponente, fechando a boca quando esta entra em contato com a nadadeira caudal do adversário.
Ataque frontal	AF	Dois peixes sobrepõem suas mandíbulas e um deles empurra o outro, ou ambos se empurram mutuamente em movimentos rápidos.
Confronto prolongado	CG	Dois animais realizam ataques mútuos com movimento rotatório.
Ondulação	ON	O peixe ondula o corpo no sentido anteroposterior quando está próximo ao oponente.
Ondulação de repulsão	OR	O peixe agredido exhibe ondulações rápidas e intensas com o corpo que levam à repulsão do peixe agressor.
Perseguição	PE	O peixe segue o oponente enquanto este foge, podendo culminar em ataque do peixe agressor.
Fuga	FU	O peixe se afasta do oponente que o persegue ou ataca.
Fuga prolongada	FR	O animal se afasta do oponente, ficando restrito a um pequeno espaço por longo período de tempo.
Categoria Locomoção		
Nadar lento	NL	O animal movimenta a nadadeira caudal lentamente, a fim de que seu deslocamento ocorra também de modo lento.
Nadar rápido	NR	O animal movimenta sua nadadeira caudal rapidamente, fazendo com que ele se desloque mais rápido no corpo d'água. Esse comportamento pode ser seguido por qualquer ataque.
Nadar junto	NJ	Três ou mais peixes nadam na mesma direção, apresentando comportamento de cardume, podendo permanecer assim por vários minutos.
Ficar parado	FP	O peixe permanece parado.
Categoria Resposta ao estresse		
Respiração aérea	RA	O peixe utiliza a respiração aérea mesmo sob condições de aeração.

Na Fig. 1, é possível observar os eventos comportamentais dos alevinos (A) e juvenis (J) de *O. niloticus*, em que, na categoria Social, os mesmos comportamentos foram apresentados pelos dois grupos, mas com frequências de exibição diferentes ($P < 0,05$) para os eventos: *Afastar* (A $4,7 \pm 1,3$ e J $3,6 \pm 0,6\%$) e *Ondulação de repulsão* (A $2,3 \pm 0,9$ e J $1,3 \pm 1,0\%$). Os alevinos apresentaram maior frequência de exibição nesses comportamentos. Na categoria Locomoção, o comportamento *Nadar rápido* (A $9,2 \pm 2,8$ e J $3,0 \pm 1,6\%$) foi mais observado nos alevinos em comparação aos juvenis. Em relação às outras categorias de Alimentação e Resposta ao estresse, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos estudados.

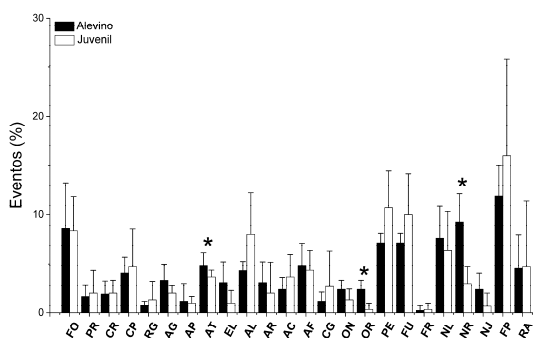


Figura 1. Eventos comportamentais exibidos por *O. niloticus* alevinos e juvenis. Siglas: FO - *Forragear*; PR - *Procurar*; CR - *Capturar rápido*; CP - *Capturar prolongado*; RG - *Regurgitar*; AG - *Afugentar*; AP - *Afugentar prolongado*; AT - *Afastar*; EL - *Exibição lateral*; AL - *Ataque lateral*; AR - *Ataque rápido*; AC - *Ataque caudal*; AF - *Ataque frontal*; CG - *Confronto prolongado*; ON - *Ondulação*; OR - *Ondulação de repulsão*; PE - *Perseguição*; FU - *Fuga*; FR - *Fuga prolongada*; NL - *Nadar lento*; NJ - *Nadar rápido*; FP - *Nadar junto*; RA - *Respiração aérea*. *Médias com diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na Tab. 2a, são observados os resultados das frequências de exibição dos comportamentos de juvenis de *O. niloticus* sob exposição ao E_2 e à β -CD: E_2 e ao grupo controle, no intervalo de zero a 30 dias. Na categoria Alimentação, foi observado um aumento (Tab. 2a) significativo ($P < 0,05$) na frequência de exibição do comportamento *Procurar* no grupo BE em relação ao grupo E. Na categoria Social, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na exibição do comportamento *Afugentar prolongado* no grupo E em relação aos grupos BE e C. Ainda, houve um aumento (Tab. 2a) significativo ($P < 0,05$) na

frequência de exibição dos comportamentos agressivos *Afastar*, *Ondulação*, *Perseguição*, *Fuga*, *Fuga prolongada* no grupo BE; esse último comportamento, apenas observado neste grupo. Para a categoria Locomoção, também foi observado um aumento (Tab. 2a) significativo ($P > 0,05$) da exibição do comportamento *Nadar Rápido* no grupo BE. Na Tab. 2b, é possível observar os comportamentos exibidos pelos peixes sob exposição ao E_2 , à β -CD: E_2 e ao grupo controle, no intervalo de 30 a 60 dias. Na categoria Alimentação, foi observado um aumento (Tab. 2b) significativo ($P < 0,05$) na frequência de exibição do comportamento *Procurar* no grupo BE em relação aos grupos E e C. Para a categoria Social, verificou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) para o grupo BE nos comportamentos: *Afastar*, *Exibição lateral*, *Ataque caudal*, *Ataque frontal*, *Confronto prolongado*, *Ondulação*, *Ondulação de repulsão*, *Perseguição*, *Fuga* e *Fuga prolongada*. Na categoria Locomoção, o grupo BE apresentou um aumento ($P < 0,05$) na exibição dos comportamentos *Nadar lento* e *Nadar rápido* (Tab. 2b).

Na Tab. 2c, são observados os resultados da exibição comportamental dos juvenis no intervalo de 60 a 90 dias de experimento. Não houve eventos significativos ($P > 0,05$) nas categorias Alimentação e Resposta ao estresse. Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) em alguns comportamentos das categorias Social e Locomoção, com aumento de frequência (Tab. 2c) para o grupo BE em *Ataque frontal*, *Nadar lento* e *Nadar rápido*. Ainda, os animais do grupo BE não apresentaram a exibição do comportamento *Afastar* ($P < 0,05$). Adicionalmente, foi observado o escurecimento corporal dos animais submetidos durante os experimentos. O consumo médio de ração entre os grupos não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$), pois todo o alimento foi consumido. Para avaliação do ganho de peso, também não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a comparação do grupo C ($28,9 \pm 9,3g$ e $42,5 \pm 10,5g$), grupo E ($25,0 \pm 6,4g$ e $34,6 \pm 12,0g$) e grupo BE ($31,0 \pm 9,0g$ e $39,4 \pm 8,2g$) no intervalo de zero e 90 dias. Essa diferença não significativa ($P > 0,05$) entre a morfometria nos grupos C ($12,1 \pm 1,8$ e $13,4 \pm 1,4$), E ($10,9 \pm 0,8$ e $12,2 \pm 1,7$) e BE ($12,5 \pm 1,7$ e $13,1 \pm 1,8$) também foi observada no mesmo intervalo de tempo. Em relação à taxa de mortalidade, foram encontrados os valores de C 42,9%, E 28,6% e BE 14,3%, respectivamente, após 90 dias.

Avaliação do impacto...

Tabela 2. Eventos comportamentais de *O. niloticus* expostos a hormônios livres e complexados à ciclodextrina em 30 (A), 60 (B) e 90 (C) dias de exposição. Para os eventos exibidos: FO - Forragear; PR - Procurar; CR - Capturar rápido; CP - Capturar prolongado; RG - Regurgitar; AG - Afugentar; AP - Afugentar prolongado; AT - Afastar; EL - Exibição lateral; AL - Ataque lateral; AR - Ataque rápido; AC - Ataque caudal; AF - Ataque frontal; CG - Confronto prolongado; ON - Ondulação; OR - Ondulação de repulsão; PE - Perseguição; FU - Fuga; FR - Fuga prolongada; NL - Nadar lento; NR - Nadar rápido; NJ - Nadar junto; FP - Ficar parado; RA - Respiração aérea

Eventos	A: 0 – 30 dias			B: 30 – 60 dias			C: 60 – 90 dias		
	C	E	BE	C	E	BE	C	E	BE
FO	6,3±3,5	5,7±3,9	6,6±3,3	1,6±1,4 ^a	0,7±0,9 ^a	4,8±1,9 ^b	1,6±0,5	2,2±1,9	2,4±0,5
PR	0,3±0,4 ^a	0,1±0,3 ^{ab}	1,0±0,9 ^{ac}	0,1±0,3 ^a	0,1±0,3 ^a	1,6±1,3 ^b	0,0±0,0	0,2±0,4	0,0±0,0
CR	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,5±0,7 ^b	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
CP	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
RG	0,1±0,3	0,2±0,4	0,3±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
AG	2,9±3,2	2,8±3,1	2,4±2,6	1,0±1,7	0,7±1,2	1,1±1,1	0,2±0,4	2,6±3,1	0,0±0,0
AP	0,2±0,6 ^a	6,2±3,9 ^b	2,9±2,4 ^a	3,8±3,1 ^a	7,0±2,6 ^b	4,3±1,8 ^a	4,8±0,8	4,4±3,1	5,8±0,4
AT	1,8±1,4 ^a	2,2±1,7 ^{ab}	3,2±2,4 ^b	0,7±1,3 ^a	0,5±1,0 ^a	3,1±2,6 ^b	0,2±0,4 ^a	2,2±1,4 ^b	0,0±0,0 ^a
EL	0,8±0,9	0,6±0,6	1,2±1,2	0,7±1,0 ^a	0,4±0,7 ^a	3,0±1,9 ^b	0,8±0,4	0,2±0,4	1,4±1,5
AL	5,8±2,9	8,2±3,8	5,3±2,5	5,8±2,5	6,0±1,8	6,0±1,5	6,2±1,6	6,6±2,7	5,4±1,3
AR	8,3±3,7	5,2±1,6	7,0±2,7	5,6±2,5	5,7±2,3	6,5±1,2	5,6±1,1	5,4±2,3	6,6±1,5
AC	1,7±1,9 ^a	3,3±2,5 ^{ab}	5,0±2,3 ^b	1,4±2,0 ^a	0,6±1,0 ^a	4,0±1,8 ^b	0,2±0,4	2,6±2,8	2,6±1,1
AF	3,4±4,7 ^a	2,2±1,6 ^{ab}	7,9±3,2 ^b	2,2±2,2 ^a	0,1±0,3 ^{ab}	7,3±2,9 ^b	1,2±0,8 ^a	1,4±1,5 ^a	5,0±1,0 ^b
CG	0,4±0,9 ^a	1,4±2,4 ^{ab}	3,0±2,2 ^b	0,2±0,6 ^a	0,5±1,3 ^a	3,0±1,8 ^b	0,8±0,8	0,8±1,0	2,0±1,0
ON	1,0±1,0 ^a	1,3±1,3 ^{ab}	2,7±1,8 ^b	1,1±0,9 ^a	0,5±1,0 ^{ab}	2,2±1,2 ^{ac}	0,4±0,5	0,6±0,8	0,8±0,8
OR	0,6±0,6	0,7±1,0	1,7±1,6	0,7±1,0 ^a	0,3±0,5 ^a	1,8±0,9 ^b	0,6±0,8	0,0±0,0	0,4±0,8
PE	9,0±2,4 ^a	7,2±3,2 ^{ab}	11,5±3,6 ^{ac}	5,7±2,4 ^a	5,3±2,2 ^a	9,5±3,8 ^b	4,6±1,1	6,8±2,1	5,0±1,4
FU	8,9±2,1 ^a	7,3±2,9 ^{ab}	11,6±3,5 ^{ac}	5,7±2,4 ^a	5,3±2,2 ^a	9,5±3,8 ^b	4,6±1,1	6,8±2,1	5,2±1,6
FR	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,6±0,8 ^b	0,2±0,4 ^a	0,0±0,0 ^a	1,0±1,0 ^b	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±2,2
NL	6,0±3,4	6,9±4,5	8,0±2,9	2,6±2,1 ^a	3,6±1,5 ^a	8,0±1,8 ^b	3,2±0,8 ^a	3,0±1,5 ^a	7,0±3,0 ^b
NR	2,2±1,1 ^a	0,7±1,0 ^a	5,3±3,0 ^b	1,1±1,1 ^a	0,3±0,5 ^a	3,5±2,5 ^b	1,6±0,5 ^a	0,4±0,5 ^{ab}	3,6±2,8 ^{ac}
NJ	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^c	0,2±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0
FP	8,1±4,4 ^a	23,6±7,4 ^b	12,3±7,3 ^a	15,3±8,1	25,4±14,1	17,3±7,4	20,6±1,1 ^a	8,4±3,0 ^b	25,4±2,8 ^c
RA	7,2±2,7	7,2±3,7	4,6±3,4	3,5±1,7	4,5±4,6	6,5±2,5	2,6±1,3	5,4±3,2	7,4±5,3

Os dados foram comparados estatisticamente dentro dos intervalos de 30 dias. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

DISCUSSÃO

Os comportamentos observados em *O. niloticus* são característicos do gênero, devido à semelhança aos observados em outros ciclídeos, como *Geophagus surinamensis* (Acará-corró), *Astronotus ocellatus* (Apaiari) e *Pterophyllum scalare* (Acará-bandeira) (Carvalho, 2009). Por ser uma espécie territorialista, *O. niloticus* apresentou uma hierarquia de dominância e submissão estabelecida por confrontos entre os indivíduos. Tais comportamentos agonísticos foram decorrentes de agrupamentos sociais, nos quais foi observada uma hierarquia de dominância e submissão em que os animais maiores geralmente são dominantes, e os menores submissos (Merighe *et al.*, 2004). Em relação à comparação dos comportamentos exibidos entre alevinos e juvenis, com base no etograma desenvolvido, foi observada uma maior frequência de comportamentos ativos nos alevinos, o que pode estar relacionado à maior atividade locomotora destes. Larvas e alevinos

de peixes diurnos (como a tilápia) apresentam maior atividade metabólica nessas fases de desenvolvimento (Vera *et al.*, 2009), o que poderia justificar essa diferença observada no presente estudo.

Em relação aos estudos de exposição química, os parâmetros abióticos foram mensurados para comprovar que as modificações nos parâmetros biológicos analisados foram decorrentes da exposição ao estradiol livre (E₂) e complexado à ciclodextrina (β-CD:E₂) e não decorrentes de variações nos parâmetros físico-químicos da água. Esses resultados obtidos, de acordo com Kubitza (2000), estão na faixa ideal de conforto para a espécie. Diante disto, as alterações comportamentais exibidas pelos animais estão relacionadas à exposição química aos hormônios. Os resultados produzidos no presente estudo demonstraram que o E₂ livre assim como a β-CD:E₂ interferiram no comportamento animal, alterando a exibição dos comportamentos ao longo do tempo nos animais juvenis de *O.*

niloticus. Em relação ao efeito do E₂ complexado à β-CD, foi observado um aumento na exibição de comportamentos agressivos (Tab. 2) no grupo BE comparado aos grupos E e C, o que pode provocar maior estresse entre os indivíduos. Essas respostas biológicas ao estresse, provocadas por poluentes, podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes (Lupi et al., 2007). De acordo com Brewster e Loftsson (2007), as CDs apresentam baixa toxicidade, mas, devido ao fato de alterarem as propriedades físico-químicas das moléculas complexadas, podem também alterar-lhes a toxicidade. Isso foi observado no presente trabalho, pois houve diferenças significativas na exibição dos comportamentos (P<0,05) entre os grupos BE e E. Em peixes, existem poucos estudos sobre os efeitos tóxicos de moléculas complexadas à CDs. Estudo utilizando a hidropropil-β-ciclodextrina não complexada foi realizado em *Danio rerio*. O desenvolvimento de larvas foi afetado com concentrações acima de 1% (p/v), e testes de toxicidade com peixes adultos não foram relatados (Maes et al., 2012). É possível que a complexação do 17β-estradiol com a ciclodextrina tenha causado a maior absorção do hormônio pelos animais, devido a sua capacidade de manter moléculas hidrofóbicas mais biodisponíveis, como visto no trabalho de Paula et al. (2007), no qual, em estudos de solubilidade, a complexação de β-CD a 17β-estradiol aumentou a solubilidade aquosa deste, assim como a retenção do fármaco na pele. O autor atribuiu esse efeito à maior biodisponibilidade do hormônio quando complexado. Observou-se, ao longo do experimento (90 dias), devido ao aumento de exibição dos comportamentos agressivos, um aumento de lesões em alguns indivíduos do grupo BE. No último intervalo de tempo analisado (60-90 dias), também foi observado que os peixes não respondiam mais aos comportamentos agressivos, como visto pela redução significativa (P>0,05) no ato *Afastar* (Tab. 2C) dos animais submissos. O comportamento de *Nadar rápido* para os indivíduos dominantes do grupo BE apresentou maior frequência (Tab. 2), o que pode estar relacionado ao fato de os outros animais não reagirem ou não serem considerados uma ameaça.

Já no grupo exposto ao 17β-estradiol (E₂) livre, houve diminuição da agressividade (zero - 60

dias), conforme visto em alguns comportamentos, como: *Perseguição*, *Fuga e Ataque frontal* (Tab. 2), com frequências de exibição inferiores ao grupo controle. Os peixes do grupo E apresentaram o ato de *Ficar parado* superior se comparado aos demais grupos. Esse mesmo efeito já foi observado em estudo anterior do presente grupo (Santos et al., 2016), em que ocorreu diminuição dos comportamentos agressivos, assim como aumento da inatividade em peixes machos de *Betta splendens* expostos ao E₂. Esses resultados corroboram os de Shappell et al. (2010), que também observaram que o E₂ diminuiu a agressividade de *Pimephales promelas*. Adicionalmente, durante as observações, notou-se o escurecimento corporal dos peixes submissos em todos os grupos experimentais, o que pode estar relacionado a situações de estresse (Volpato et al., 1989). Os mesmos autores relataram ainda outros fatores, como a posse prévia do território e a condição hierárquica anterior, como possíveis explicações para o escurecimento corporal. Esses dois fenômenos também foram observados no presente estudo.

Quanto aos parâmetros zootécnicos, a exposição hormonal não alterou o ganho de peso e o comprimento dos animais. Foi observado que, durante todo o experimento, os animais se alimentaram normalmente, não havendo diferença estatística (P<0,05) entre os grupos experimentais. Em relação à sobrevivência dos animais, observou-se uma maior taxa de mortalidade no grupo controle. Raju et al. (2008) sugeriram que o E₂ pode apresentar propriedades imunoprotetoras, o que poderia justificar o observado no presente trabalho. Ainda, a menor taxa de mortalidade foi observada no grupo β-CD:E₂. A complexação com a ciclodextrina aumenta a estabilidade (Del Valle, 2004; Brewster e Loftsson, 2007) da molécula hospedeira, o que poderia ter potencializado o efeito imunoprotetor do estradiol.

CONCLUSÃO

Foi possível a construção de um etograma para o estudo comportamental de *O. niloticus* e, sendo o comportamento animal um parâmetro afetado pela presença de substâncias tóxicas, a complexação do E₂ com a β-CD alterou a toxicidade do E₂, pois aumentou a frequência de exibição principalmente dos comportamentos

agressivos e também aumentou a sobrevivência dos animais. Não foram observadas alterações em relação ao ganho de peso, à morfometria e ao consumo de alimento entre os grupos estudados. Isso gera a necessidade do desenvolvimento de medidas de controle do descarte dos hormônios complexados a ciclodextrinas no ambiente, pois estes podem apresentar toxicidade diferente de suas formas não complexadas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por permitir o desenvolvimento desse projeto; ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro (Processo 477215/2013-0).

REFERÊNCIAS

- ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, v.48, p.227-267, 1974.
- ÁVILA, M.C.; ROMAGOSA, E. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): tempo de pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. *Bol. Inst. Pesca*, v.31, p.55-64, 2005.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v.59, p.645-666, 2007.
- CARVALHO, T.B. *A interferência da luminosidade na agressividade e hierarquia social de ciclídeos*. 2009. 106f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP.
- DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Proc. Biochem.*, v.39, p.1033-1046, 2004.
- DENSLow, N.; SEPULVEDA, M. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. In: BABIN, P.J.; CERDA, J.; LUBZENS, E. (Eds.). *The fish oocyte - from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer, 2008. p.255-322.
- FERNANDES, A.N.; GIOVANELA, N.; ALMEIDA, C.A.P. *et al.* Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. *Quím. Nova*, v.34, p.1526-1533, 2011.
- GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A.; PIFERRER, F.; CHANG, C.F. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.165, p.352-366, 2010.
- KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiá: F. Kubitza, 2000. 285p.
- LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. *Rev. Fafibe*, n.3, p.1-6, 2007.
- MAES, J.; VERLOOY, L.; BUENAFE, O.E.; WITTE, M.A.P. *et al.* Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. *Plos One.*, v.7, p.1-9, 2012.
- MCLACHLAN, J.A.; SIMPSON, E.; MARTIN, M. Endocrine disruptors and female reproductive health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.20, p.63-75, 2006.
- MERIGHE, G.K.F.; PEREIRA, E.M.S.; NEGRÃO, J.A.; RIBEIRO, S. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, p.828-837, 2004.
- OISHI, K.; TOYAO, K.; KAWANO, Y. Suppression of estrogenic activity of 17-beta-estradiol by beta-cyclodextrin. *Chemosphere*, v.73, p.1788-1792, 2008.
- PAULA, D.; OLIVEIRA, D.C.R.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Efeito promotor de beta-ciclodextrinas modificadas na permeação *in vitro* do estradiol. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.43, p.111-120, 2007.
- RAJU, R.; BLAND, K.I.; CHAUDRY, I.H. Estrogen: a novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. *Mol. Med.*, v.14, p.213-221, 2008.

- SANTOS, B.D.; SILVA, M.C.G.; SANTOS, T.P.; SILVA, S.C.B.L. *et al.* Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, p.387-396, 2016.
- SEEMANN, F.; KNIGGEB, T.; DUFLOTB, A.; MARIEB, S. *et al.* Sensitive periods for 17 β -estradiol exposure during immune system development in seabass head kidney. *J. Appl. Toxicol.* v.36, p.815-826, 2016.
- SHAPPELL, N.W.; HYNDMANB, K.M.; BARTELL, S.E.; SCHOENFUSS, H.L. Comparative biological effects and potency of 17 α - and 17 β -estradiol in fathead minnows. *Aquat. Toxicol.*, v.100, p.1-8, 2010.
- SPECIES Fact Sheets of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), 2016. FAO Available in: <<http://www.fao.org/fishery/species/3217/en>>. Accessed in: 12 Sep. 2016.
- TILTON, S.C.; FORAN, C.M.; BENSON, W.H. Relationship between *ethinylestradiol-mediated* changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.24, p.352-359, 2005.
- VERA, L.M.; CAIRNS, L.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MIGAUD, H. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chronobiol. Int.*, v.26, p.666-681, 2009.
- VOLPATO, G.L.; FRIOLI, P.M.A.; CARRIERI, M.P. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanisms. *Bol. Fisiol. Anim.*, v.13, p.7-22, 1989.
- WU, H.; LI, G.; LIU, S.; HU, N. *et al.* Monitoring the contents of six steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in chicken, fish and aquaculture pond water samples using pre-column derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction with the aid of experimental design methodology. *Food Chem.*, v.192, p.98-106, 2016.
- ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; VERAS, G.C.; TAVARES, M.M. *et al.* Tolerância aguda e crônica de adultos de beta, *Betta splendens*, à salinidade da água. *Rev. Bras. Zootec.*, v.38, p.2106-2110, 2009.