



**UFRPE**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MARILIA CORDEIRO GALVÃO DA SILVA

Efeitos tóxicos de hormônios esteroides livres e complexados a  
ciclodextrinas nos parâmetros biológicos de embriões e adultos de  
*zebrafish (Danio rerio)*

RECIFE

2017

MARILIA CORDEIRO GALVÃO DA SILVA

Efeitos tóxicos de hormônios esteroides livres e complexados a  
ciclodextrinas nos parâmetros biológicos de embriões e adultos de  
*zebrafish (Danio rerio)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biociência Animal pela  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Mestre em Biociência Animal.

Orientador:

**Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena**

Coorientador:

**Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior**

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586e Silva, Marília Cordeiro Galvão da  
Efeitos tóxicos de hormônios esteroides livres e complexados a ciclodextrinas nos parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*) / Marília Cordeiro Galvão da Silva. – 2017.  
86 f. : il.

Orientador: Pabyton Gonçalves Cadena.

Coorientador: Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências.

1. Disruptor endócrino 2.  $\beta$ - ciclodextrina 3. Paulistinha  
I. Cadena, Pabyton Gonçalves, orient. II. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, coorient. III. Título

CDD 636.089

MARILIA CORDEIRO GALVÃO DA SILVA

Efeitos tóxicos de hormônios esteroides livres e complexados a  
ciclodextrinas nos parâmetros biológicos de embriões e adultos de  
*zebrafish (Danio rerio)*

Data de defesa: 22/02/2017

Resultado: Aprovada

---

Marilia Cordeiro Galvão da Silva

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal  
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

---

Profa. Dra. Maria do Carmo de Barros Pimentel (1° Titular)  
Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal de Pernambuco.

---

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá (2° Titular)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

***Dedico***

*Este trabalho a minha família,  
em especial aos meus pais Márcio e Rosa,  
ao meu irmão Márcio e ao meu amor Gledyson.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, aquele que faz sua obra pelas mãos dos homens e que não privilegia os capacitados e sim capacita os privilegiados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, por toda ciência, oportunidade e suporte necessários para execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior pela atenção e apoio.

Aos colaboradores Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá e a Elton, por abdicar de seus dias de descanso para obtenção de parte dos dados, pelo aprendizado e por estarem sempre dispostos a ajudar, colaborando de forma inestimável na realização de parte da pesquisa.

Aos meus pais Márcio e Rosa e ao irmão Márcio, que são o motivo pelo qual sigo nesta caminhada com muita fé e força para jamais desanimar. Ao meu amor e companheiro Gledyson que desde os tempos de graduação me incentiva a sempre crescer mais, mesmo diante da falta de tempo, atenção e estresse advindos da elaboração deste trabalho, por todo zelo e carinho. Amo vocês.

A Toddy, meu amigo cão que trouxe aos meus dias mais alegria e amor imensuráveis, tornando meus dias mais suaves.

Aos meus amigos de Laboratório que acompanharam e colaboraram durante todo o processo, em especial a Thamiris, por estar sempre presente nos aspectos pessoais e acadêmicos, a Jadson, pela ajuda na obtenção de dados e por todo apoio insubstituível, e a todos Priscila, André, Stephannie, Tiago, Niely, Amanda e os demais amigos que compõem o grupo de pesquisa do LECA.

Aos todos os familiares e demais amigos que ficaram felizes com aprovação no programa de Pós-Graduação.

Aos integrantes da banca examinadora.

À CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro como auxílio indispensável no desenvolvimento desta pesquisa.

Sou grata a todos!

*“Não terás mais necessidade de sol para  
te alumiar, nem de lua para te iluminar:  
permanentemente terás por luz o Senhor,  
e teu Deus por esplendor.”.*

Isaías 60:19

## RESUMO

A progesterona ( $P_4$ ) e o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) são hormônios esteroides produzidos industrialmente como fármacos para terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos. Devido às características químicas dos hormônios esteroides como a hidrofobicidade, utiliza-se substâncias para aumentar a solubilidade aquosa como os complexos de inclusão entre hormônios e ciclodextrinas (CDs). Hormônios livres ou complexados a CDs podem ser classificados como desreguladores endócrinos (DEs) que são substâncias capazes de modificar o funcionamento endócrino de organismos aquáticos. É ampla a utilização de medicamentos com princípios ativos complexados a CDs, porém seus efeitos como poluente ambiental são pouco descritos na literatura. No presente estudo, foi utilizado o *zebrafish* (*Danio rerio*) devido às suas características favoráveis para estudos toxicológicos. Diante disto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de hormônios esteroides livres como  $P_4$  e  $E_2$  e complexados a ciclodextrinas ( $P_4L$  e  $E_2L$ ), bem como os medicamentos de uso comercial, como progesterona micronizada ( $P_4M$ ) e estradiol transdérmico ( $E_2T$ ) em animais adultos e no desenvolvimento embrionário. Foram realizados testes de toxicidade aguda com os hormônios utilizando embriões de *D. rerio* baseado nas normas da OCDE, foi avaliada a frequência cardíaca, sobrevivência e efeitos teratogênicos. Também foram realizados testes de toxicidade crônica com animais adultos expostos aos hormônios para avaliação do comportamento animal e capacidade reprodutiva. A análise dos resultados dos testes de toxicidade aguda com embriões expostos a progestágenos e estrógenos, demonstraram que  $P_4L$  e  $E_2L$  causaram nos animais expostos maior percentual de teratogenicidade como, edema de pericárdio (Ep), edema de saco vitelínico (Esv) e deformação da coluna (Dcl). Na avaliação comportamental (30 - 60 dias) dos animais adultos expostos aos progestágenos e estrógenos, os animais expostos a  $P_4M$ ,  $E_2L$  e  $E_2T$  exibiram maiores frequências de exibição de comportamentos agressivos como *Afugentar*, *Perseguição*, *Fuga* e *Ataque*. Na análise da capacidade reprodutiva, os animais expostos ao  $E_2T$  apresentaram aumento no número de ovos viáveis. Diante dos resultados obtidos, foi possível observar maior toxicidade dos hormônios  $P_4L$  e  $E_2L$  quando comparados aos hormônios complexados as ciclodextrinas ( $\beta$ -CD- $P_4$  e  $\beta$ -CD- $E_2$ ) indicando que a complexação reduziu a toxicidade dos hormônios em relação aos parâmetros estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Disruptor Endócrino, Paulistinha, Progesterona, Estradiol,  $\beta$ -ciclodextrina e Fármacos.

## ABSTRACT

Progesterone ( $P_4$ ) and  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) are steroid hormones industrially produced as drugs for hormone replacement therapy and contraceptive methods. Due to the chemical characteristics of steroid hormones such as hydrophobicity, substances are used to increase aqueous solubility as the inclusion complexes between hormones and cyclodextrins (CDs). Free hormones or complexed into cyclodextrin can be classified as endocrine disruptors (ED), being substances capable of modifying the endocrine functioning of aquatic organisms. It is wide the use of drugs with active principles complexed into CDs, but their effects as an environmental pollutant are not well described in the literature. In the present study, the zebrafish (*Danio rerio*) was used due to good characteristics for toxicologic studies. The objective of this study was to evaluate the effects of free steroid hormones such as  $P_4$  and  $E_2$  and complexed into cyclodextrins ( $P_4L$  and  $E_2L$ ) as well as commercially available drugs, such as micronized progesterone ( $P_4M$ ) and transdermal estradiol ( $E_2T$ ) in adult animals and embryonic development. Acute toxicity test was realized with hormones using *D. rerio* embryos according to OECD guidelines. The heart frequency, survival and teratogenic effects were evaluated. Also, chronic toxicity test was assayed with adult's animals for evaluation of animal behavior and reproductive capacity. The analysis of the results of the acute toxicity tests with embryos exposed to progestins and estrogens showed the free hormones ( $P_4L$  and  $E_2L$ ) caused in exposed animals a higher percentage of teratogenic effects such as pericardial edema (Pe), yolk sac edema (Yse) and spinal deformation (Sd). In the behavioral evaluation (30 - 60 days) of the adult animals exposed to the progestins and estrogens, the animals exposed to  $P_4M$ ,  $E_2L$  and  $E_2T$  exhibited higher frequencies of aggressive behaviors such as Chase away, Persecution, Escape and Attack. In the analysis of the reproductive capacity, the animals exposed to  $E_2T$  showed an increase in the number of viable eggs. According to the results obtained, it was possible to observe higher toxicity of the hormones  $P_4L$  and  $E_2L$  when compared to the complexed hormones into cyclodextrins ( $\beta$ -CD- $P_4$  and  $\beta$ -CD- $E_2$ ) indicating that the complexation reduced the toxicity of the hormones in relation to the studied parameters.

**KEYWORDS:** Endocrine Disruptor, Zebrafish, Sex Hormones, Progesterone, Estradiol,  $\beta$ -cyclodextrin and Drugs.

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

**Tabela 1:** Propriedades Físico-Químicas do  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ).....16

**Tabela 2:** Quantidade média de estrógenos diariamente excretada na urina de humanos.....17

**Tabela 3:** Propriedades Físico-químicas da Progesterona ( $P_4$ ) .....18

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- P<sub>4</sub>L** - Progesterona Livre  
**E<sub>2</sub>L** - Estradiol Livre  
**β-CD-P<sub>4</sub>** - Progesterona complexada a ciclodextrina  
**β-CD-E<sub>2</sub>** - Estradiol complexado a ciclodextrina  
**P<sub>4</sub>M** - Progesterona micronizada  
**E<sub>2</sub>T** - Estradiol transdérmico  
**CDs** - Ciclodextrinas  
**β-CD** - β-Ciclodextrina  
**Ep** - Edema de Pericárdio  
**Esv** - Edema de Saco Vitelínico  
**Dcl** - Deformação da Coluna  
**Dca** - Deformação da Cauda  
**Cg** - Coagulação  
**FC** - Frequência Cardíaca.  
**NL** - Nadar Lento  
**NR** - Nadar Rápido  
**FL** - Flutuar  
**DE** - Descansar  
**AS** - Saltar  
**NI** - Natação Inclinada  
**MC** - Movimento Circulatório  
**FO** - Forragear  
**CA** - Capturar  
**AG** - Afugentar  
**PE** - Perseguição  
**FU** - Fuga  
**AT** - Ataque  
**AF** - Afastar  
**RA** - Respiração Aérea.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BILIOGRÁFICA .....	13
2.1. Disruptores endócrinos.....	13
2.2. Hormônios como DEs.....	15
2.2.1. 17 $\beta$ -Estradiol (E <sub>2</sub> ).....	15
2.2.2. Progesterona (P <sub>4</sub> ) .....	17
2.3. Ciclodextrinas (CDs) .....	18
2.4. Medicamentos de liberação transdérmica .....	20
2.5. Peixe como modelo experimental .....	21
2.5.1. <i>Danio rerio</i> (zebrafish) .....	21
2.6. Efeitos dos disruptores endócrinos em peixes .....	22
3. Objetivos .....	23
3.1. Objetivo Geral .....	23
3.2. Objetivos Específicos .....	23
4. Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo I – Artigo.....	32
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos .....	33
3. Resultados.....	36
4. Discussão .....	40
5. Conclusão.....	44
6. Agradecimentos.....	44
7. Referências .....	44
Capítulo II – Patente.....	56
1. Relatório descritivo .....	56
2. Reivindicação .....	62
3. Resumo .....	63
4. Desenho .....	64
5. CONCLUSÃO.....	67
6. ANEXOS .....	68
1. Licença da Comissão de Ética .....	68
2. Trabalhos publicados.....	69
3. Artigo aceito.....	71

## 1. Introdução

A Progesterona ( $P_4$ ) e o  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) são hormônios esteroides industriais, utilizados em fármacos para terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos prescritos por médicos e veterinários. Estes hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol sendo classificados em estrógenos e progestágenos (Jocsak et al., 2016). Devido às características químicas dos hormônios esteroides, como hidrofobicidade, baixa estabilidade e tempo de meia vida curto, uma alternativa tem sido sugerida pela indústria farmacêutica, através de complexação de fármacos em ciclodextrinas (CDs) (Oishi et al., 2008), visando garantir a estabilidade e aumento de absorção pelo trato gastrointestinal ou por meio da pele. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos composto por 6, 7 ou 8 unidades de glicose com cavidade interior hidrofóbica e exterior hidrofílica (Loftsson, 2015). As CDs são conhecidas por formar complexos de inclusão com compostos, alterando as propriedades físico-químicas tais como a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade (Lakkakula et al., 2012). A capacidade de formar complexos de inclusão com substâncias hidrofóbicas representa uma das mais avançadas tecnologias de complexação molecular (Gharib et al., 2017), já disponíveis no mercado. Devido a excreção desses hormônios sexuais ou o descarte destes medicamentos no ambiente, isto pode se tornar um problema ambiental já que podem ser considerados disruptores endócrinos (DEs).

Durante a última década, DEs têm despertado grande atenção científica em todo o mundo por causa de sua distribuição generalizada e por seus efeitos serem potencialmente nocivos para humanos e animais, pois são capazes de alterar a sua saúde reprodutiva e o funcionamento do sistema endócrino (Wu et al., 2016). Diversos estudos envolvendo compostos de desregulação endócrina têm sido relatados causando alterações morfológicas e histológicas em organismos aquáticos (Zhang et al., 2016; Fong et al., 2016). As substâncias classificadas como DEs possuem diferentes configurações químicas e são produzidas naturalmente pelo organismo, como o caso dos estrogênios ou são produzidas sinteticamente (Baird, 2002). Sendo os ecossistemas aquáticos considerados receptáculos finais destas substâncias, seja pelo descarte direto, ou por processos hidrológicos ou atmosféricos, que são capazes de carrear substâncias tóxicas para o ambiente (Zagatto e Bertolotti, 2011).

Na literatura encontra-se diversos estudos envolvendo compostos com efeitos tóxicos ou de desregulação endócrina, como alterações comportamentais em peixes (Santos et al., 2016) e embriotoxicidade em larvas de *Danio rerio* sob efeito de medicamentos que podem estar presentes em efluentes e nanopartículas (Strong et al., 2015; Gupta et al., 2016; Zhang et al., 2016). Dentre os DEs, os hormônios sexuais podem ser encontrados nos efluentes em diminutas concentrações, em faixas de pg/L a ng/L (Wells et al., 2009), podendo causar efeitos tóxicos na biota aquática. No entanto, estudos relacionados a exposição de animais aquáticos a complexos de inclusão entre ciclodextrinas e hormônios esteroides permanecem escassos e merecem atenção, para que seja possível compreender sobre o comportamento destas substâncias alteradas farmacologicamente, e avaliar os possíveis efeitos sobre os organismos, principalmente peixes.

Os peixes são classificados como bons modelos experimentais, pois são utilizados como substitutos para estudos de problemas de saúde humana ou como indicadores da saúde ambiental (Law, 2003). No presente estudo, foi utilizado um modelo *in vivo zebrafish* devido às suas características favoráveis para estudos toxicológicos, pois apresenta ovos não-aderentes, transparentes e desenvolvimento embrionário rápido e de fácil descrição (Spirita e Ahila, 2015). Além disto o genoma desta espécie, indica que 70% de seus 26.000 genes são semelhantes aos genes humanos (Howe, et al., 2013). Diante disto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de hormônios esteroides livres como progesterona e estradiol e complexados a ciclodextrinas, bem como os medicamentos de uso comercial como a progesterona micronizada e estradiol transdérmico, como desreguladores endócrinos em animais adultos e no desenvolvimento embrionário, avaliando alterações comportamentais, fisiológicas, reprodutivas e embriotoxicidade em *D. rerio*.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Disruptores Endócrinos (DEs)**

A inexistência de políticas de controle baseadas em critérios toxicológicos e ambientais têm levado ao aparecimento dos chamados contaminantes emergentes, grande parte classificadas como DEs, que são geralmente definidos como produtos químicos que podem interferir com a função do sistema endócrino de animais e seres humanos, bloqueando ou mimetizando o efeito de hormônios, afetando a sua síntese ou metabolismo, e alterando os níveis de receptores hormonais (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2009; SHANLE, 2011), podendo afetar descendentes, ou

subpopulações (DAMSTRA et al., 2002). Estas substâncias não compreendem somente os produtos químicos sintéticos, mas também uma série de compostos orgânicos exógenos ou endógenos que nos últimos anos vêm sendo detectados no ambiente aquático (SODRÉ et. al., 2007; LOPES et. al., 2010; BLANCHFIELD et. al., 2015; ADEOGUN et al., 2016).

Ao longo das últimas décadas, tem havido um aumento da sensibilização da sociedade quanto a atividade de regulação, no que diz respeito à presença dos contaminantes no ambiente que podem ter o potencial para interagir com o sistema endócrino das espécies selvagens expostas (LUNA; COADY, 2016). Basicamente, são conhecidas três classes de hormônios que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino: os naturais que incluem o estrogênio, progesterona e testosterona, presentes no corpo humano e nos animais; os fitoestrógenos, que apresentam atividade semelhante aos esteroides hormonais quando ingeridas por um determinado organismo; e as substâncias sintéticas (GHISELLI; JARDIM, 2007). Estas substâncias podem atuar como agonista ou antagonista de receptores hormonais, e que também podem afetar as vias enzimáticas envolvidas na biossíntese de hormônios, a biodisponibilidade ou metabolismo (COSTER, 2012).

O lançamento de compostos químicos no ambiente aquático, seja proveniente de áreas industriais ou domésticas é preocupante, devido ao seu potencial para perturbar o sistema endócrino de espécies aquáticas sendo observadas alterações que abrangem vários níveis de organização biológica e molecular, incluindo efeitos prejudiciais no desenvolvimento sexual e reprodução, feminização de peixes machos e modificação comportamental de peixes (BLAZER et. al., 2012; SUMPTER, 2013; SANTOS et al., 2016). O descarte seguro de resíduos de medicamentos no âmbito domiciliar e industrial, ainda é um desafio a ser enfrentado, deve-se ressaltar ainda a problemática de medicamentos como quimioterápicos, antibióticos, hormônios, entre outros, que também causam impacto no meio ambiente (EICKHOFF, 2009; PONEZI, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC 306 (BRASIL, 2004), dispõe sobre o gerenciamento de resíduos de saúde, e a resolução 358 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2005), sobre o tratamento e disposição final dos resíduos de serviços de saúde, entre outros. De acordo com a legislação brasileira, os serviços de saúde são responsáveis pelo gerenciamento de todos os resíduos por eles gerados, devendo atender às normas e exigências legais, desde o momento de sua geração até a destinação final (BRASIL,

2006). Atualmente, não está em vigor o monitoramento e fiscalização para cumprimento destas legislações. Sabe-se que, por falta de orientação e alternativa, o usuário tem descartado de forma inadequada o medicamento no meio ambiente, aumentando a carga poluidora. O descarte ocorre geralmente através do vaso sanitário ou lixo doméstico, sendo passível de causar toxicidade. A toxicidade é uma resposta biológica negativa pela presença de uma ou mais substâncias químicas (COSTA, 2009).

## **2.2. Hormônios como DEs.**

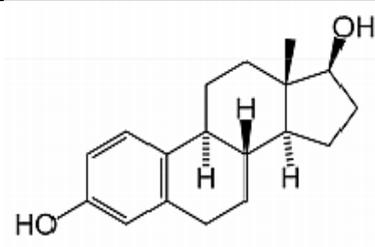
Os esteroides são um grupo importante de compostos que desempenham um papel em muitos processos biológicos, apresentando diversas aplicações terapêuticas. Uma vez que ambas as classes de hormônios sexuais são quimicamente estáveis e apresentam uma elevada atividade fisiológica em concentrações muito baixas, há muito tempo já são considerados como poluentes potencialmente perigosos do ambiente aquático (AHERNE, 1989). Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser detoxificados ou bioacumulados (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Desta forma, faz-se necessário o estudo do processo de degradação desses contaminantes. A contaminação encontrada para efluentes de ETE (Estações de Tratamento de Esgoto) levam à conclusão de que há necessidade do desenvolvimento de tecnologias para remoção destes contaminantes com eficiência para que os mesmos não atinjam as estações de tratamento de água (ETA) (FERREIRA, 2008). Entre as tecnologias que se mostram bastantes promissoras em relação à degradação de interferentes endócrinos, como os hormônios sexuais naturais e sintéticos, estão os Processos Oxidativos Avançados (POA).

### **2.2.1. 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>)**

O estradiol é um esteroide hormonal essencial para o desenvolvimento e manutenção de características sexuais femininas. Apresentam em sua estrutura um grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxila alifático. O anel fenólico é o principal componente estrutural responsável pela alta afinidade com receptores estrogênicos (LOOSE-MITCHELL; STANCEL, 2005). As propriedades físico-químicas do 17 $\beta$ -estradiol, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades Físico-Químicas do 17 $\beta$ -estradiol (Fonte PubChem, 2016).

Nomes químicos	Estradiol; $\beta$ -estradiol; 17 $\beta$ -estradiol
Fórmula estrutural	
Formula molecular	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	272,38196 g/mol
Ponto de Fusão	178,5 °C
Nomenclatura (IUPAC)	(8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahidro ciclopentano[a]fenantreno-3,17-diol
Solubilidade em água	3,6 mg/L (27 °C)
Solubilidade em solventes Orgânicos	Acetona etanol dioxano

Como são os principais responsáveis pelo crescimento e pela reprodução de espécies animais, incluindo os seres humanos, seus derivados sintéticos são bastante empregados como contraceptivos, no controle hormonal em período de menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de mama e próstata (GHISELLI; JARDIM, 2007). Além disso, estrógenos são conhecidos por serem antioxidantes, independentemente da sua ligação a receptores de estrogênio e funções (BADEAU et al, 2005).

Os estrógenos naturais são continuamente introduzidos no ambiente (Tabela 2), o que lhes concede um caráter de persistência. Aproximadamente 60% dos fármacos são excretados pela urina e 40% pelas fezes, por meio de conjugados e vários metabólitos polares (GILMAN et al., 2003). Desse percentual de liberação, cerca de até 40% das doses ministradas de estrógenos sintéticos podem ser disponibilizadas para o ambiente (JOHNSON et al., 2000).

Tabela 2. Quantidade média de estrógenos diariamente excretada na urina de humanos. Fonte: REIS FILHO (2006) adaptada de JOHNSON *et al.* (2000).

Estrógeno	Excreção diária ( $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ )				
	Homem	Menstruação	Menopausa	Gravidez	Mulher
Estrona	3,9	8	4	600	NR
17 $\beta$ -Estradiol	1,6	3,5	2,3	259	NR
Estriol	1,5	4,8	1	6000	NR
17 $\alpha$ -etinilestradiol	NR	NR	NR	NR	35

NR: valores não reportados na literatura

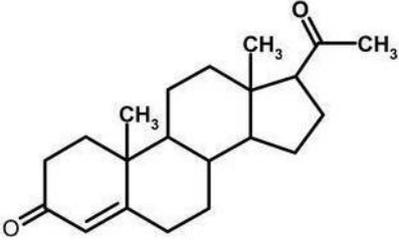
A entrada destas substâncias no ciclo da natureza deu-se há cerca de 50 anos, logo após a Segunda Guerra Mundial. Nos anos seguintes a sua produção cresceu exponencialmente, existindo mais de 300 destas substâncias com potencial estrogênico (WENZEL *et al.*, 2003). Sabe-se há muito tempo que diversos compostos xenobióticos quando ministrados em doses suficientes, podem interagir com uma série de sistemas endócrinos, inclusive com o eixo hipotalâmico-hipofisário, tireoide e órgãos sexuais (REIS, 2006). Os efeitos desencadeados pelos hormônios sexuais sobre a biota são: alterações nas taxas de fecundidade, fertilização e eclosão, modificações comportamentais (agressividade e movimentação), histopatológicas (fígado, gônadas e rins), imunodepressão, feminização ou *imposex* (desenvolvimento de características sexuais femininas em machos ou opostos), inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais e reversão sexual (MANAHAN, 2003).

### 2.2.2. Progesterona ( $P_4$ )

O hormônio progesterona é utilizado para tratamento de infertilidade, anticoncepção e problemas ovarianos. Na medicina veterinária, além dessas aplicações, a progesterona é utilizada para a sincronização do ciclo estral das fêmeas economicamente exploráveis, otimizando as técnicas de reprodução, como a inseminação artificial e a transferência de embriões. As propriedades físico-químicas da  $P_4$  são sumarizadas na Tabela 3.  $P_4$  interage com os receptores hormonais, mesmo em níveis baixos de concentração e exibem efeitos similares como em seres humanos (CHRISTEN *et al.*, 2010). Nos peixes, progestinas sintéticas têm uma atividade endócrina, semelhante ao EE2 (etinilestradiol) ou trembolona. Elas exibiram efeitos sobre a fertilidade e reprodução (ZEILINGER *et al.*, 2009; PAULOS *et al.*, 2010; RUNNALLS *et al.*, 2013), alteração dos níveis hormonais (RUNNALLS

et al., 2013), efeitos de transcrição induzidos em adultos (ZUCCHI et al., 2013, 2014) e embriões (ZUCCHI et al., 2012), alterações no desenvolvimento sexual (LIANG et al., 2015a, b), e induziu o desenvolvimento das características secundárias masculinas sexuais em peixes fêmeas (ZEILINGER et al., 2009; RUNNALLS et al., 2013). Devido a uma grande variação nas suas estruturas químicas, funções, metabolismo, farmacocinética e potência, há diferenças na atividade progesteronal do hormônio sintético em relação ao natural, observadas entre os tecidos humanos e animais (STANKZYK, 2003). Juntamente com esteroides estrogênicos, progesteronas estão entre o grupo mais importante de produtos farmacêuticos que causam preocupações ambientais. No entanto, em contraste com os estrogênios, progestinas tem recebido pouca atenção e os seus riscos ambientais não são suficientemente conhecidos. Por conseguinte, existe uma necessidade para analisar melhor as consequências ambientais destes esteroides em organismos aquáticos.

Tabela 3. Propriedades Físico-químicas da Progesterona (P<sub>4</sub>) (Fonte PubChem, 2016).

Nomes químicos	Progesterona (P <sub>4</sub> ), Agolutin; Crinone; Luteohormone; Pregn-4-ene-3,20-dione
Fórmula estrutural	
Formula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	314.4617 g/mol
Ponto de Fusão	126 °C
Nomenclatura (IUPAC)	(8S,9S,10R,13S,14S,17S)-17-acetil-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidrociclopentano[α]fenantreno-3-ona
Solubilidade em água	8,81 mg/L (a 25 °C)
Solubilidade em solventes orgânicos	Álcool / acetona / dioxano

### 2.3. Ciclodextrinas (CDs)

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por um número variável de unidades de glicose, unidas por ligações α-(1,4) (LOFTSSON, 2015), formadas durante a ação de enzimas denominadas como CD glicosiltransferases (CGTases)

sobre o amido (SZEJTLI, 1994), sendo este o processo utilizado na produção industrial das mesmas. São moléculas cristalinas, homogêneas, não higroscópicas que apresentam estrutura tronco-cônica e se caracterizam por possuírem cavidade de natureza apolar, devido à formação de um anel de grupos C-H, de um anel composto por átomos de oxigênio glicosídicos e, também, de um outro anel de grupos C-H do carbono, que contrasta com o exterior hidrofílico.

As CDs foram descobertas por Villiers (VILLIERS, 1891), a partir da digestão de 1000 g de amido por *Bacillus amylobacter*. Apesar do seu trabalho pioneiro, as CDs foram primeiramente detalhadas por Schardinger (SCHARDINGER, 1903), que descreveu o processo de preparação e isolamento das mesmas. As CDs formam complexos relativamente não específicos com uma grande variedade de moléculas hospedes e a principal condição é que o hospede possa se adaptar à cavidade, ainda que parcialmente (TAKAHASHI, 2013). Devido a esta habilidade, estas moléculas vêm sendo utilizadas como protótipos para investigação de interações não covalentes envolvendo diferentes compostos. Tornaram-se excipientes farmacêuticos importantes devido à sua capacidade para formar complexos de inclusão com moléculas hidrofílica, assim aumentar a solubilidade aquosa de vários fármacos pouco solúveis (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Quanto à estequiometria do complexo de inclusão, são considerados quatro tipos mais comuns de complexo CD: hospede com 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2, dependendo do tamanho e aspecto estrutural do mesmo em relação à cavidade da CD (TAKAHASHI, 2013). Para moléculas pequenas é mais fácil formar complexos com  $\alpha$ - e  $\beta$ -CD devido ao tamanho da cavidade da CD. As mais importantes CDs de ocorrência natural são as  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CDs.

A cavidade das ciclodextrinas pode acomodar moléculas, ou parte de moléculas, no seu interior, sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes entre as duas entidades. A este fenômeno denomina-se complexação e pode ocorrer em solução ou no estado sólido (DEL VALLE, 2004). Os complexos de inclusão são compostos moleculares com a estrutura característica de um canal ou cavidade cilíndrica, em que um composto (designado de hospedeiro) aporta no seu interior um outro (o hóspede). O interior de cavidades CD é relativamente hidrofóbico, porque todos os grupos hidroxila estão no exterior da molécula (TAKAHASHI, 2013).

Estes complexos são desenvolvidos visando melhorias nas características das substâncias envolvidas, alterando a hidrofobicidade, aumentando assim a biodisponibilidade das mesmas (LOFTSSON, 2015). Portanto, seus efeitos potenciais sobre organismos vivos, permanecem em grande parte desconhecidos. Os efeitos biológicos desta nanopartícula pode ser alterado devido ao tamanho e composição química, estrutura superficial, solubilidade, forma e estado de agregação com a partícula hospede (DEL VALLE, 2004). Hormônios esteroides encapsulados em CDs são amplamente utilizados em fármacos, resultando em formulações com efeitos farmacêuticos benéficos, incluindo aumento da solubilidade e estabilidade.

#### **2.4. Medicamentos de liberação transdérmica**

Os medicamentos de liberação transdérmicas são emulsões O/A em matriz fosfolipídica, que proporcionam maior compatibilidade celular e, portanto, aumentam a permeação cutânea de hormônios e fármacos. Este medicamento é ideal para prescrição médica individualizada, pois permite incorporação de fármacos variados em concentrações que atendam a necessidade do paciente. Todos os ingredientes da fórmula são reconhecidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) quando utilizado com a proposta sugerida (MARTINS e VEIGA, 2002). O desenvolvimento de sistemas terapêuticos transdérmicos de liberação de fármacos tem se intensificado nos últimos anos com o objetivo de superar problemas associados com as propriedades de barreira da pele, reduzindo a taxa de irritação e melhorando a liberação de fármacos de alto peso molecular (Prausnitz; Langer. 2008).

Tais sistemas de liberação controlada são utilizados principalmente para fármacos de meia vida curta ou que precisam de administração oral frequente (Prausnitz; Langer. 2008). Vantagens da administração transdérmica: Causa menor toxicidade sistêmica; evita o efeito de primeira passagem hepática reduzindo efeitos adversos de alguns fármacos; permite o controle de absorção de determinada quantidade de fármaco e aumenta a adesão do paciente ao tratamento (PAPARELLA; VALLEY, 2005). Os sistemas terapêuticos transdérmicos (STT) são sistemas adesivos que quando aplicados sobre a pele, liberam o fármaco que, após atravessar as diversas camadas da pele, alcançam a corrente sanguínea numa velocidade constante, durante um período de tempo mais ou menos longo (PAPARELLA; VALLEY, 2005). Visto a capacidade desses fármacos permearem membranas celulares, estudos toxicológicos que indiquem seus efeitos são

necessários, pois é possível que, devido ao aumento da biodisponibilidade seus efeitos adversos ao sistema endócrino e demais parâmetros sejam potencializados.

## **2.5. Peixe como modelo experimental**

### **2.5.1 *Danio rerio* (zebrafish)**

Há 30 anos o pesquisador George Streisinger escolhia o *zebrafish* (*Danio rerio*), um teleósteo da família Cyprinidae, como modelo para seu laboratório em estudos genéticos. Hoje este peixe, conhecido como paulistinha no Brasil, é utilizado por diversos pesquisadores em muitos locais. Os motivos são bastante evidentes hoje em dia: é um vertebrado diplóide com um bom equilíbrio entre a complexidade e a simplicidade (STREISINGER et al. 1981). Suas características tornam este peixe um modelo seguro na pesquisa em nossos tempos (SPIRITA e AHILA, 2015), pois fornecem o maior número de informações a nível de desenvolvimento, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (KALUEFF et al., 2013).

Medindo aproximadamente entre três e quatro centímetros, este teleósteo pode ser facilmente mantido e distribuído nos aquários, necessitando de pouco espaço. Além disso, possui baixo custo, alta taxa de fecundidade, com um casal podendo colocar 200-300 ovos em uma manhã, e se mantidos em estado favorável, repetir este ciclo a cada 5-7 dias, seus embriões são transparentes e possuem uma rápida maturação sexual, entre três e seis meses (HILL et al., 2005). O crescimento no número de artigos publicados usando o *zebrafish* está diretamente ligado ao crescente conhecimento sobre esta espécie. O sequenciamento do genoma, iniciado pelo Instituto Senger em 2001, possibilitou o uso em diversos estudos genéticos (STERN; ZON, 2003). Pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo uma vez que o seu genoma apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (BARBAZUK et al., 2000; LIESCHKE; CURRIE, 2000), onde segundo Howe, et al., 2013, quando comparados a humanos o *zebrafish* possui 70 % de similaridade genética.

Este teleósteo possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no Sistema Nervoso Central, como demonstrado em estudos com o cobre (GROSSEL; WOOD, 2002). Testes de toxicidade com esta espécie e efeitos farmacológicos já foram descritos (BLUHM et al., 2016).

## 2.6. Efeitos dos disruptores endócrinos em peixes

Muitos estudos comprovam os efeitos adversos dos DEs, como realizado por Santos et al. (2016), que observou alterações nos parâmetros comportamentais dos machos de *Betta splendens* onde ocorreu uma diminuição dos comportamentos ativos e agressivos em todos os grupos expostos aos resíduos hormonais do 17 $\beta$ -estradiol e contraceptivos orais combinados. Substâncias estrogênicas exercem influência na neurogênese de peixes adultos e o impacto que causam no desenvolvimento do cérebro requer atenção. O estágio de desenvolvimento é um fator importante, pois peixes são precocemente expostos, as alterações estruturais e funcionais induzidas por IEs, podem levar a mudanças significativas e fracassos de desenvolvimento (COUMAILLEAU et al., 2015). Estudos realizados com o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE<sub>2</sub>), mostrou que em doses baixas, perturba o desenvolvimento da rede neuronal GnRH em embriões e larvas de *Danio rerio* (paulistinha) (VORGES et. al.,2012). O bisfenol A (BPA), é classificado como interferente endócrino pois é capaz de mimetizar hormônios naturais. Em estudo de toxicidade com BPA, foram utilizados tratamentos em concentrações de 1 a 15  $\mu$ M, e os embriões de *D. rerio* apresentaram modificações negativas no comportamento motor (WANG et. al., 2013). Foi demonstrada uma relação entre a exposição aos interferentes e mudanças no metabolismo, desenvolvimento, crescimento e na reprodução de organismos (JACKSON e SUTTON, 2008). Progestágenos, tais como drospirenona, levonorgestrel, noretindrona e acetato de ciproterona interferem com a biossíntese de andrógenos em gônadas de carpa através da inibição do CYP17 e CYP11B, além de atividades enzimáticas (FERNANDES et. al., 2014).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Geral

Avaliar os efeitos de hormônios esteroides livres e complexados a ciclodextrinas, bem como os medicamentos de uso comercial contendo estes hormônios, como desreguladores endócrinos nos parâmetros biológicos de embriões e adultos de *Danio rerio*.

#### 3.2. Específicos

- Desenvolver dispositivo de coleta de ovos para embriões de *Danio rerio* com aplicação em estudos de toxicidade.
- Realizar ensaios de toxicidade aguda nos embriões sob exposição a hormônios esteroides livres e complexados a ciclodextrinas, como também aos medicamentos de uso comercial;
- Avaliar os efeitos tóxicos dos hormônios esteroides livres e complexados a ciclodextrinas, como também aos medicamentos de uso comercial no desenvolvimento embrionário e frequência cardíaca de *Danio rerio*;
- Realizar ensaios de toxicidade crônica nos adultos sob exposição a hormônios esteroides livres e complexados a ciclodextrinas, como também aos medicamentos de uso comercial;
- Avaliar o efeito tóxico dos hormônios citados acima sobre a capacidade reprodutiva e alterações comportamentais de animais adultos de *Danio rerio*.

#### 4. Referências Bibliográficas

ADEOGUN, A. O. et al. Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonado-histopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (*Awba Dam*) in Ibadan, Nigeria. *Aquatic Toxicology*, v. 174, p. 10–21, 2016.

AHERNE, G. W. and Briggs, R., The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 41, p. 735–736, 1989.

BADEAU M, ADLERCREUTZ H, KAIHOVAARA P, TIKKANEN MJ. J. *Steroid Biochem.*, v. 96, p. 271–278, 2005.

BAIRD C. Química ambiental. Porto Alegre: Bookman; 2002.

BARBAZUK, W.B., KORF, I., KADAVI, C., HEYEN, J., TATE, S., WUN, E., BEDELL, J.A., MCPHERSON, J.D., JOHNSON, S.L., The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* v. 10, p.1351-1358, 2000.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 7, p. 645–666, 2007.

BLANCHFIELD, P.J., KIDD, K.A., DOCKER, M.F., PALACE, V.P., PARK, B.J., POSTMA, L.D. Recovery of a wild fish population from whole-lake additions of a synthetic estrogen. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3136–3144, 2015.

BLAZER, V. S.; IWANOWICZ, L. R.; HENDERSON, H.; MAZIK, P. M.; JENKINS, J. A.; ALVAREZ, D. A.; YOUNG, J. A. Reproductive endocrine disruption in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) in the Potomac River basin: Spatial and temporal comparisons of biological effects. *Environ. Monit. Assess.* v. 184 (7), p. 4309–4334, 2012.

BLUHM, K. et al. Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. *Science of the Total Environment*, v. 566–567, p. 786–795, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC N° 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução N° 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde. Brasília, 2006.

COUMAILLEAU, P., PELLEGRINI, E., ADRIO, F., DIOTEL, N., CANO-NICOLAU, J., Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Nuclear receptors in animal development, v. 1849 (2), p.152-162, 2015.

COSTA, R. C. Contaminação da água como causa de interferentes endócrinos. Tese (Conclusão do Curso de Pós Graduação de Química Ambiental) - Escola Superior de Química. Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, 2009.

COSTER, S. D., VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action, *J. Environ. Public Health*, v. 71, p. 36-96, 2012

CHRISTEN, V., HICKMANN, S., RECHENBERG, B., FENT, K., Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. *Aquat. Toxicol.* v. 96, p. 167–181, 2010.

DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R. & VAN DER KRAAK, G., Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *International Programme on Chemical Safety*, WHO, Geneva, 180p, 2002.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J.-P., GIUDICE, L.C., HAUSER, R., PRINS, G.S., SOTO, A.M., ZOELLER, R.T., GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement, *Endocr. Rev.* v. 30, p. 293–342, 2009.

EICKHOFF, P., HEINECK, I., SEIXAS, L. M., Gerenciamento e Destinação Final de Medicamentos: uma discussão sobre o problema. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 90, n. 1, p. 64 – 68, 2009.

FERREIRA, M.G. Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tese (Doutorado em

Ciências em Engenharia Química) – Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FONG, H. C. H. et al. Developmental toxicity of the common UV filter, benophenone-2, in zebrafish embryos. *Chemosphere*, v. 164, p. 413–420, 2016.

GHARIB, R. et al. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole. *Food Chemistry*, v. 218, p. 365–371, 2017.

GHISELLI, G., JARDIM, W. F. Interferentes Endócrinos no Ambiente. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GILMAN, A., G.; HARDMAN, J. E.; LIMBIRD, L. E As bases farmacológicas da terapêutica. 10 a ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, p. 8153, 2003.

GUPTA, G. S. et al., Montmorillonite clay alters toxicity of silver nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo, *Chemosphere*, v. 163, p. 242e251, 2016.

HILL, A., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R., Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, v. 86, p. 6-19, 2005.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

JACKSON, J., SUTTON, R. Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. v. 405, 1–3, p. 153-160, 2008.

JOHNSON, A. C., BELFROID, A., DI CORCIA, A. “Estimating Steroid O estrogen Inputs into Activated Sludge Treatment Works and Observations on their Removal from the Effluent”, *The Science of the Total Environment*, v. 256, pp. 163-173, 2000.

JONAS, A. et al. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and zebrafish embryos assays. *Chemosphere*, v. 120, p. 321–327, fev. 2015.

JOCSAK, G. et al. Comparison of Individual and Combined Effects of Four Endocrine Disruptors on Estrogen Receptor Beta Transcription in Cerebellar Cell Culture: The

Modulatory Role of Estradiol and Triiodo-Thyronine. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 6, p. 619, 22 jun. 2016.

KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of *zebrafish* behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

LAKKAKULA, J. et al. Detailed investigation of a  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complex with l-thyroxine for improved pharmaceutical formulations. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 74, n. 1–4, p. 397–405, 2012.

LAW, R.J., FILEMAN, T.W. Attempts to assess the environmental hazard posed by complex mixtures of organic chemicals in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*; v. 26(2): 90-95, 2003.

LIANG, Y.-Q., HUANG, G.-Y., YING, G.-G., LIU, S.-S., JIANG, Y.-X., LIU, S., PENG, F.-J., A time-course transcriptional kinetics of the hypothalamic–pituitary–gonadal and hypothalamic–pituitary–adrenal axes in zebrafish eleutheroembryos after exposure to norgestrel. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 34, p. 112–119, 2015a.

LIANG, Y.Q., HUANG, G.Y., LIU, S.S., ZHAO, J.L., YANG, Y.Y., CHEN, X.W., TIAN, F., JIANG, Y.X., YING, G.G., Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* v. 160, p. 172–179, 2015b.

LIESCHKE, G.J., CURRIE, P.D., Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*; v. 8(5), p. 353-67, 2007.

LOFTSSON, T., Formulation of Drug-Cyclodextrin Complexes, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Iceland, Hofsvallagata 53, Reykjavik IS-107, Iceland, 2015.

LOPES, L. G., MARCHI, M. R. R., SOUZA, J. B. G., MOURA, J. A., LORENZON, S. C., CRUZ, C., AMARAL, L. A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - São Paulo. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 3, 639-643, 2010.

LOOSE-MITCHELL, D. S.; STANCEL, G. M. Estrogênios e progestogênios. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman e Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica. Tradução da 10. ed. Original, Carla de Mello Vorsatz et al. 10. ed. McGrawHill, cap. 58, p. 1201-1229, 2005.

LUNA, G. L., COADY, K. PAULOS, P., RUNNALLS, T.J., NALLANI, G., LA POINT, T., SCOTT, A.P., SUMPTER, J.P., HUGGETT, D.B., Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, norethindrone. *Aquat. Toxicol.* v. 99, n. 2, p. 256–262, 2010.

MANAHAN, S.E.; Toxicological Chemistry and Biochemistry, 3 ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.

MARTINS MRFM, VEIGA F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Rev Bras Farm.*; v. 38(1), p. 33-54, 2002.

OISHI, K., TOYAO, K., KAWANO, Y., Suppression of estrogenic activity of 17 $\beta$ -estradiol by  $\beta$ -cyclodextrin. *Chemosphere*, v. 73, p. 1788–1792, 2008.

PAULOS, P., RUNNALLS, T.J., NALLANI, G., LA POINT, T., SCOTT, A.P., SUMPTER, J.P., HUGGETT, D.B. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, norethindrone. *Aquat. Toxicol.* v. 99 (2), p. 256–262, 2010.

PAPARELLA, S.; VALLEY, H. Transdermal patches: an unseen risk for harm. *Journal of Emergency Nursing*, v.31, n.3, p.278-281, 2005.

PONEZI, A. N., DUARTE, M. C. T., CLAUDINO, M. C. Fármacos em matrizes ambientais – revisão [periódico online]. Disponível em: Acesso em: 24 de julho de 2008.

PRAUSNITZ, M. R., LANGER, R. Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 11, p. 1261 - 1268, 2008.

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

RUNNALLS, T.J., BERESFORD, N., LOSTY, E., SCOTT, A.P., SUMPTER, J.P., Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* v. 47 (4), p. 2077–2084, 2013.

SANTOS, B. D. et al. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 2, p. 387–396, abr. 2016.

SCHARDINGER, F., Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nahrungsmitteln, darunter kristallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* v. 6, p. 865–880, 1903.

SHANLE, E.K., XU, W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action, *Chem. Res. Toxicol.* v. 24, p. 6–19, 2011.

STERN, H.M. & ZON, L.I., Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev. Cancer.* v. 3, p. 1-7, 2003.

STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F., Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*brachydanio rerio*). *Nature.* v. 291, p. 293–296, 1981.

SZEJTLI, J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* v. 98, p. 1743–1753, 1998.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *J. Bras. Soc. Ecotoxicol.* v. 2, p. 187, 2007.

SPIRITA, S. V.; AHILA, A. J. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Danio rerio*. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, v. 3, n. 6, p. 6–11, 2015.

STANKZYK, F. Z. All progestins are not created equal. *Steroids*, v. 68, p. 879–890, 2003.

STRONG, P., XIE, S., CLARKE, W.P., Methane as a resource: can the methanotrophs add value? *Environmental Science & Technology*, v. 49, pp. 4001–4018, 2015.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. The occurrence, causes and consequences of estrogens in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 32 (2), p. 249–251, 2013.

TAKAHASHI, K.; Organic Reactions Mediated by Cyclodextrins. *Chemical Reviews*. v. 98, 2013.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *O Biológico*, v.64, n.2, p.135-142, 2002.

TRUONG, L., HARPER, S.L., TANGUAY, R.L., Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model, in: J.C. Gautier (Ed.), *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*, Humana Press Inc., 999 Riverview Dr, Ste 208, Totowa, Nj 07512-1165 USA, pp. 271–279, 2011.

VILLIERS, A., Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* v. 112, p. 536–538, 1891.

WELLS, M.J. M. et al., Emerging pollutants. *Water Environment Research*, v. 79, n. 10, p. 2192-2209, 2007.

WENZEL A, MÜLLER J, TERNES T. Study on endocrine disrupters in drinking water. Schmallenberg and Wiesbaden, February; 2003.

WU, H., LI, G., LIU, S., HU, N., GENG, D., CHEN, G., SUN, Z., ZHAO, X., XIA, L., YOU, J., 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 metho. *Food Chemistry*. v. 192, p. 98–106, 2016.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2. ed. São Carlos, RIMA, 2011.

ZEILINGER, J., STEGER-HARTMANN, T., MASER, E., GOLLER, S., VONK, R., LÄNGE, R., Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ Toxicology Chemistry*. v. 28, p. 2663–2670, 2009.

0POIOIYG

ZHANG, Q. et al. The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (*Danio rerio*) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels. *Environmental Pollution*, v. 218, p. 8–15, 2016.

ZUCCHI, S., CASTIGLIONI, S., FENT, K., Proggestins and antiprogestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ. Sci. Technol.* v. 46, p. 5183–5192, 2012.

ZUCCHI, S., CASTIGLIONI, S., FENT, K., Progesterone alters global transcription profiles at environmental concentrations in brain and ovary of female zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* v. 47, p. 12548–12556, 2013.

ZUCCHI, S., MIRBAHAI, L., CASTIGLIONI, S., FENT, K., Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ. Sci. Technol.* v. 48, p. 3523–3531, 2014.

## Capítulo 1

### Artigo que será submetido a *Aquatic Toxicology* (IP 3.557, Qualis A1)

#### **A complexação de hormônios esteroides com ciclodextrinas reduziu o efeito tóxico destes hormônios nos parâmetros biológicos de zebrafish (*Danio rerio*)**

##### **1. Introdução**

A Progesterona ( $P_4$ ) e o  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) são hormônios esteroides produzidos industrialmente, utilizados no desenvolvimento de fármacos para terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos seja para uso humano ou veterinário. Estes hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol sendo classificados em estrógenos e progestágenos (Jocsak et al., 2016). Devido as características químicas dos hormônios esteroides, como hidrofobicidade, baixa estabilidade e tempo de meia vida curto, uma alternativa tem sido sugerida pela indústria farmacêutica, através de complexação de fármacos em ciclodextrinas (CDs) (Oishi et al., 2008), visando garantir a estabilidade e aumento de absorção pelo trato gastrointestinal ou por meio da pele. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos composto por 6, 7 ou 8 unidades de glicose com cavidade interior hidrofóbica e exterior hidrofílica (Loftsson, 2015). As CDs são conhecidas por formar complexos de inclusão com compostos, alterando as propriedades físico-químicas tais como a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade (Lakkakula et al., 2012). A capacidade de formar complexos de inclusão com substâncias hidrofóbicas representa uma das mais avançadas tecnologias de complexação molecular (Gharib et al., 2017) disponível no mercado. Devido a excreção desses hormônios sexuais ou o descarte destes medicamentos no ambiente, isto pode se tornar um problema ambiental já que podem ser considerados disruptores endócrinos (DEs).

Durante a última década, DEs têm despertado grande atenção científica em todo o mundo por causa de sua distribuição generalizada e por seus efeitos serem potencialmente nocivos para humanos e animais, pois são capazes de alterar a sua saúde reprodutiva e o funcionamento do sistema endócrino (Wu et al., 2016). Estudos envolvendo compostos de desregulação endócrina têm sido relatados causando alterações morfológicas e histológicas em organismos aquáticos (Zhang et al., 2016; Fong et al., 2016). As substâncias classificadas como DEs possuem diferentes configurações químicas e são produzidas naturalmente pelo

33 organismo, como o caso dos estrogênios e progestágenos ou são produzidas sinteticamente  
34 (Baird, 2002). Sendo os ecossistemas aquáticos considerados receptáculos finais destas  
35 substâncias, seja pelo descarte direto, ou por processos hidrológicos ou atmosféricos que  
36 carregam essas substâncias tóxicas ao ambiente (Zagatto e Bertolotti, 2011).

37 Na literatura encontra-se diversos estudos envolvendo compostos com efeitos tóxicos  
38 ou de desregulação endócrina, como alterações comportamentais em peixes (Santos et al.,  
39 2016) e embriotoxicidade em larvas de *Danio rerio* sob efeito de medicamentos que podem  
40 estar presentes em efluentes e nanopartículas (Strong et al., 2015; Gupta et al., 2016; Zhang et  
41 al., 2016). Dentre os DEs, os hormônios sexuais podem ser encontrados nos efluentes em  
42 diminutas concentrações, em faixas de pg/L a ng/L (Wells et al., 2009), podendo causar  
43 efeitos tóxicos na biota aquática. No entanto, estudos relacionados a exposição de animais  
44 aquáticos a complexos de inclusão entre ciclodextrinas e hormônios esteroides permanecem  
45 escassos e merecem atenção, para que seja possível compreender sobre o comportamento  
46 destes fármacos alterados, e avaliar os possíveis efeitos sobre os organismos, principalmente  
47 peixes.

48 Os peixes são classificados como bons modelos experimentais, pois são utilizados  
49 como substitutos para estudos de problemas de saúde humana ou como indicadores da saúde  
50 ambiental (Law, 2003). No presente estudo, foi utilizado um modelo *in vivo zebrafish* devido  
51 às suas características favoráveis para estudos toxicológicos, pois apresenta ovos não-  
52 aderentes, transparentes e desenvolvimento embrionário rápido e de fácil descrição (Spirita e  
53 Ahila, 2015). Além disto o genoma desta espécie, indica que 70% de seus 26.000 genes são  
54 semelhantes aos genes humanos (Howe, et al., 2013). Diante disto, o objetivo do estudo foi  
55 avaliar os efeitos de hormônios esteroides livres como progesterona e estradiol e complexados  
56 a ciclodextrinas, bem como os medicamentos de uso comercial como a progesterona  
57 micronizada e estradiol transdérmico, como desreguladores endócrinos em animais adultos e  
58 embriões, avaliando alterações comportamentais, fisiológicas, reprodutivas e  
59 embriotoxicidade em *D. rerio*.

## 60 **2. Material e métodos**

### 61 *2.1. Manutenção*

62 Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento  
63 Animal – LECA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Os protocolos  
64 realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais –  
65 CEUA/UFRPE licença 013/2016. Os peixes *zebrafish* (*Danio rerio*) foram provenientes de  
66 criadouro comercial. Os animais foram aclimatados por 15 dias em aquários aerados de 80

67 litros (11 mg/L de oxigênio dissolvido) com canister JEBO 835, a temperatura ambiente (26  
68 °C) e pH  $7,5 \pm 0,5$ . Os animais foram alimentados com ração comercial extrusada (45% de  
69 proteína bruta) uma vez ao dia (*ad libitum*). Houve manutenção periódica da água dos  
70 aquários e o resíduo gerado durante todos os experimentos foram tratados por processo  
71 oxidativo avançado (POA) em reator utilizando foto-oxidação UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 72 2.2. Materiais

73 O 17β-Estradiol (Lote SLBG0383V), a Progesterona (Lote SLBK4894V) e a β-  
74 ciclodextrina (Lote 1228922 44606048) foram obtidos da SIGMA (St Luiz, MO, EUA), a  
75 Progesterona micronizada (progesterona natural micronizada e excipientes: óleo de  
76 amendoim, lecitina de soja.) foi obtida em farmácia comercial e o medicamento de liberação  
77 transdérmica (promotores de permeação cutânea - ex: ciclodextrinas, 17β-estradiol e  
78 excipientes) foi obtido em farmácia de manipulação. Todos os outros reagentes utilizados  
79 foram de grau analítico.

## 80 2.3. Formação do complexo de inclusão entre hormônios e ciclodextrinas.

81 A técnica de co-precipitação (Del Valle, 2004; Oishi et al., 2008) foi utilizada para  
82 formação dos complexos de inclusão entre β-CD e os hormônios E<sub>2</sub> ou P<sub>4</sub> em meio aquoso. A  
83 β-CD foi primeiramente solubilizada em água e os hormônios E<sub>2</sub> ou P<sub>4</sub> dissolvidos em etanol  
84 (10%) com posterior evaporação do álcool. A solução com hormônio foi adicionada sob suave  
85 agitação à solução de β-CD (25 °C) para permitir a complexação dos mesmos. Os complexos  
86 de inclusão formados foram armazenados sob refrigeração (4 °C) para posterior uso.

## 87 2.4. Produção de embriões de *D. rerio* para os ensaios toxicológicos

88 Peixes adultos do sexo masculino/feminino com proporção 2:1 (Westerfield, 2000),  
89 foram isolados em aquários de desova desenvolvidos no laboratório (patente BR 20 2016  
90 017042 2), com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro) e alimentados com ração extrusada duas  
91 vezes ao dia. A divisória que separa os machos da fêmea foi retirada no início da manhã para  
92 permitir a cópula e posterior obtenção dos ovos.

## 93 2.5. Ensaios toxicológicos agudos com embriões de *D. rerio* segundo OCDE 236. (2013)

94 Após a desova (item 2.4.), os ovos foram recolhidos, lavados com água destilada em  
95 placas de petri. Os ovos fertilizados (desenvolvimento normal da blástula) foram utilizados  
96 para formação dos grupos e os ovos não fertilizados que não sofreram clivagem ou  
97 apresentaram irregularidades e lesões do córion foram removidos. Os animais foram alocados  
98 em câmaras de ensaio estéreis de poliestireno, com capacidade de 80 mL e mantidos em  
99 temperatura controlada de  $26 \pm 1$  °C e pH de  $7,5 \pm 0,5$ , sendo todos os grupos expostos aos  
100 compostos e concentrações em 1 h pós-fertilização (hpf). Os animais foram divididos em 8

101 grupos (10 peixes x 3 repetições) sendo um grupo dos progestágenos, que compõe o controle  
102 e expostos a progesterona livre (P<sub>4</sub>L); progesterona complexada à β-ciclodextrina (β-CD-P<sub>4</sub>) e  
103 progesterona comercial micronizada (P<sub>4</sub>M) (Excipientes: óleo de amendoim e lecitina de soja.  
104 Os componentes da cápsula não foram utilizados.); e o grupo dos estrógenos: controle; 17β-  
105 estradiol livre (E<sub>2</sub>L); estradiol complexado à β-ciclodextrina (β-CD-E<sub>2</sub>) e medicamento  
106 transdérmico a base de estradiol (E<sub>2</sub>T) (β-CD-E<sub>2</sub> + excipientes nas concentrações de 10, 20 e  
107 30 ng/L. Ocorreu renovação diária da água utilizada com reposição das concentrações dos  
108 hormônios.

#### 109 2.4.1. *Análise do desenvolvimento embrionário de D. rerio*

110 Para a avaliação do desenvolvimento dos embriões de *D. rerio* foi utilizado a  
111 metodologia de Spirita e Ahila (2015). Através da utilização de microscópio BIO2B SSI com  
112 lâmpada de LED e registros fotográficos dos embriões, afim de identificar possíveis  
113 modificações estruturais no decorrer do desenvolvimento. Durante o ensaio foi avaliada a  
114 mortalidade; frequência cardíaca (FC); efeitos teratogênicos, entre eles: edema de pericárdio  
115 (Ep), edema de saco vitelínico (Esv), deformação da coluna (Dcl), deformação da cauda (Dca)  
116 e coagulação (Cg). Possíveis efeitos teratogênicos dos embriões foram verificados nas 24, 48,  
117 72 e 96 hpf. A frequência cardíaca dos embriões foi mesurada por contagem manual dos  
118 batimentos cardíacos em microscópio óptico (40x, 100x).

#### 119 2.5. *Ensaio toxicológicos crônicos com animais adultos (D. rerio)*

120 Animais adultos de *D. rerio* (peso  $1,18 \pm 0,2$  g e comprimento  $4,54 \pm 0,7$  cm) foram  
121 expostos a concentrações hormonais presentes na água em teste de toxicidade crônica em  
122 sistema semi-estático por 90 dias. Os animais foram divididos em 7 grupos de 10 indivíduos  
123 cada (5 machos e 5 fêmeas por grupo), alocados em aquários com capacidade para 8 Litros,  
124 sendo apenas um grupo controle e os grupos dos progestágenos e estrógenos utilizando os  
125 mesmos tratamentos descritos no item 2.4. Todos com concentração final de 10 ng/L quando  
126 adicionados à água com renovação da água do aquário 3 vezes por semana e reposição das  
127 concentrações dos hormônios.

128 Nestes experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros sub-letais:  
129 comportamento animal (item 2.5.1), sobrevivência diária e reprodução (item 2.5.2).

#### 130 2.5.1. *Comportamento animal*

131 Inicialmente foram observados todos os padrões comportamentais exibidos pelo *D.*  
132 *rerio* (adultos) para construção de um etograma pelo método *ad libitum* (Altmann, 1974)  
133 utilizando como base os comportamentos descritos por Kalueff et al. (2013). Para a coleta dos

134 dados comportamentais, foi utilizado o método *scan sampling* (Altmann, 1974) por 30  
135 minutos com 1 minuto de observação e 1 minuto de intervalo.

### 136 2.5.2. Reprodução

137 Durante o ensaio de toxicidade crônica por 60 dias, os animais machos foram  
138 separados das fêmeas no mesmo aquário por uma divisória por 1 semana e após isso, ocorreu  
139 a remoção da divisória para a reprodução por *overnight*. No dia seguinte, foram coletados os  
140 ovos sendo avaliada a quantidade total e a viabilidade dos mesmos.

### 141 2.6. Análises Estatísticas

142 Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  SD. Os resultados foram analisados  
143 utilizando *one-Way* ANOVA. Quando a diferença foi significativa, as médias foram  
144 comparadas através do teste de Tukey com o software Origin Pro Academic 2015 (Origem  
145 Lab. Northampton, MA, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p <$   
146 0,05.

## 147 3. Resultados

### 148 3.1. Efeitos dos progestágenos no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio*.

149 Em relação aos efeitos teratogênicos dos animais expostos aos progestágenos, nas  
150 primeiras 24 hpf de exposição, foram observados efeitos tóxicos no grupo P<sub>4</sub>L e P<sub>4</sub>M em  
151 relação ao grupo controle. Os animais expostos ao P<sub>4</sub>L na concentração de 30 ng/L  
152 apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para edema de pericárdio (Ep). Já para o edema  
153 de saco vitelínico (Esv), foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas concentrações  
154 de 20 e 30 ng/L para os animais expostos ao P<sub>4</sub> livre e 10 ng/L para os animais expostos a  
155 P<sub>4</sub>M em relação ao grupo controle (Tab. 1). Os animais expostos a P<sub>4</sub>L, durante as 48 hpf de  
156 exposição apresentaram em todas as concentrações um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para  
157 edema de pericárdio (Ep) e edema de saco vitelínico (Esv). Nas mesmas 48 hpf, os grupos  
158 expostos a  $\beta$ -CD-P<sub>4</sub> e a P<sub>4</sub>M, não diferiram do controle significativamente ( $p > 0,05$ ).

159 Os animais expostos a P<sub>4</sub>L apresentaram maior variedade de efeitos teratogênicos ( $p <$   
160 0,05) quando comparado ao controle nas 72 hpf de exposição, sendo observados edema de  
161 pericárdio (Ep) e edema de saco vitelínico (Esv) nas concentrações de 20 ng/L e 30 ng/L,  
162 enquanto que deformação da coluna (Dcl) e deformação da cauda (Dca), foram apenas  
163 observados na concentração de 20 ng/L (Tab. 1). Os animais expostos a P<sub>4</sub>M apresentaram  
164 efeitos teratogênicos ( $p < 0,05$ ) na concentração de 30 ng/L em relação ao grupo controle nas  
165 72 hpf de exposição (Tab. 1), onde foi observado edema de pericárdio (Ep), edema de saco  
166 vitelínico (Esv), deformação da coluna (Dcl) e coagulação (Cg). Os animais expostos a P<sub>4</sub>L,  
167 apresentaram efeitos teratogênicos ( $p < 0,05$ ) como Edema de pericárdio (Ep), Deformação da

168 coluna (Dcl) e Deformação da cauda (Dca) apenas na concentração de 20 ng/L nas 96 hpf de  
169 exposição. Os animais expostos ao complexo  $\beta$ -CD-P<sub>4</sub> não apresentaram efeitos teratogênicos  
170 ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

171 Não houve mortalidade observada nos embriões nas 24 e 48 hpf em todos os grupos  
172 experimentais, porém após 72 hpf foi observado 10% de mortalidade no grupo exposto a  $\beta$ -  
173 CD-P<sub>4</sub> na concentração de 30 ng/L. Em 96 hpf de exposição foi observado 3% (Tab.1) de  
174 mortalidade nos animais expostos a P<sub>4</sub>M. Diante disto, observa-se que a P<sub>4</sub>L apresentou a  
175 maior frequência de exibição de efeitos teratogênicos (Tab. 1) em relação aos demais  
176 tratamentos.

177 Em relação aos efeitos teratogênicos comparando os animais expostos a P<sub>4</sub>L e  $\beta$ -CD-  
178 P<sub>4</sub>, se observa na Tab. 1 que os efeitos teratogênicos edema de pericárdio (Ep) e edema de  
179 saco vitelino (Esv) foram apenas observados nos animais expostos a P<sub>4</sub>L, o que indica que a  
180 forma do hormônio complexada a  $\beta$ -ciclodextrina não apresentou efeitos teratogênicos  
181 significativos ( $p > 0,05$ ) reduzindo a toxicidade em relação a P<sub>4</sub>L.

182 Em relação aos batimentos cardíacos (Tab. 1), foi observado uma redução significativa  
183 ( $p < 0,05$ ) em 24 hpf nos animais expostos ao P<sub>4</sub>L quando comparados ao grupo controle em  
184 todas as concentrações estudadas. Houve aumento dos batimentos cardíacos nas concentrações  
185 de 20 e 30 ng/L nos animais expostos ao  $\beta$ -CD-P<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ ). Os animais expostos a P<sub>4</sub>M  
186 apresentaram um aumento dos batimentos cardíacos em todas as concentrações avaliadas. Na  
187 avaliação das 48 hpf, novamente houve redução dos batimentos cardíacos no grupo exposto  
188 ao P<sub>4</sub>L em todas as concentrações ( $p < 0,05$ ) e nos outros grupos experimentais, houve  
189 aumento dos batimentos, exceto na concentração de 30 ng/L dos animais expostos a P<sub>4</sub>M. Na  
190 avaliação das 72 hpf foi observado uma redução significativa da dos batimentos cardíacos nos  
191 grupos P<sub>4</sub>L (20 ng/L) e P<sub>4</sub>M (10 ng/L). Na avaliação de 96 hpf, foi observado um aumento  
192 significativo ( $p < 0,05$ ) dos batimentos cardíacos nos animais expostos a 10 ng/L P<sub>4</sub>L e P<sub>4</sub>M.  
193 Diante dos resultados obtidos o P<sub>4</sub>L se mostrou mais tóxico na avaliação dos batimentos  
194 cardíacos em relação aos outros grupos estudados.

### 195 3.2. Efeitos dos estrógenos no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio*.

196 Os efeitos teratogênicos dos animais expostos aos estrógenos são apresentados na  
197 Tabela 2. Foram observados efeitos tóxicos significativos ( $p < 0,05$ ) nas primeiras 24 hpf nos  
198 embriões expostos ao E<sub>2</sub>L em relação ao grupo controle como edema de pericárdio (Ep) nas  
199 concentrações de 10 e 30 ng/L. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos grupos  
200 experimentais em 48 hpf de exposição comparados ao grupo controle. Durante a avaliação das  
201 72 hpf, foi observado apenas edema de pericárdio (Ep) nos animais expostos ao E<sub>2</sub>T nas

202 concentrações de 20 ng/L e 30 ng/L. Durante a avaliação das 96 hpf, os animais expostos ao  
203 E<sub>2</sub> livre apresentaram deformação da coluna (Ecl) em 10 ng/L e deformação da cauda (Dca) e  
204 edema de pericárdio (Ep) em 30 ng/L. Neste ensaio de toxicidade aguda com os embriões, não  
205 foi observada mortalidade nos grupos estudados (Tab. 2). Diante disto, observa-se que o E<sub>2</sub>  
206 livre apresentou a maior frequência de exibição de efeitos teratogênicos (Tab. 2) comparado  
207 aos demais grupos.

208 Em relação aos batimentos cardíacos dos animais expostos aos estrógenos (Tab. 2). Os  
209 animais expostos ao E<sub>2</sub>L e β-CD-E<sub>2</sub> apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos  
210 batimentos cardíacos quando comparado ao grupo controle (Tab. 2) em 24 hpf. Já os animais  
211 expostos ao E<sub>2</sub>T apresentaram uma redução deste parâmetro ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de  
212 20 e 30 ng/L. Na avaliação das 48 hpf, houve aumento ( $p < 0,05$ ) dos batimentos cardíacos  
213 dos animais expostos ao E<sub>2</sub>L em todas as concentrações estudadas e dos animais expostos ao  
214 E<sub>2</sub>T nas concentrações de 20 e 30 ng/L. Na avaliação das 72 hpf, também houve aumento ( $p <$   
215  $0,05$ ) dos batimentos cardíacos dos animais expostos ao E<sub>2</sub>L em todas as concentrações  
216 estudadas. Na avaliação das 96 hpf, houve aumento dos batimentos cardíacos dos animais  
217 expostos ao E<sub>2</sub>L nas concentrações de 10 ng/L e 30 ng/L e redução da frequência cardíaca dos  
218 animais expostos ao β-CD-E<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>T. Durante as 96 hpf foram observadas diferenças  
219 significativas ( $p < 0,05$ ) onde houve aumento da frequência na concentração de 10 ng/L e 30  
220 ng/L de E<sub>2</sub>L e redução nos animais expostos ao β-CD-E<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>T na concentração de 30 ng/L  
221 em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Diante dos resultados obtidos o E<sub>2</sub>L se mostrou mais  
222 tóxico na avaliação dos batimentos cardíacos em relação aos outros grupos estudados.

#### 223 3.4. *Elaboração de etograma para avaliação comportamental dos adultos (D. rerio)*

224 Dentre os dados obtidos a partir de observações prévias pelo método *ad libitum* para  
225 construção do etograma, foram identificados 15 comportamentos agrupados nas Categorias:  
226 *Locomoção, Alimentação, Social Agonístico e Resposta ao Estresse*, que podem ser  
227 observados na Tabela 3. O etograma apresentado pode ser utilizado em testes toxicológicos  
228 para avaliação de poluentes sobre o comportamento animal de *D. rerio*.

#### 229 3.5. *Análise comportamental dos adultos expostos aos progestágenos*

230 Os comportamentos exibidos pelos animais adultos expostos aos progestágenos podem  
231 ser observados na Figura 1A em 30 dias de exposição. Foi observado na categoria Locomoção  
232 uma redução na frequência de exibição do comportamento *Flutuar* nos animais expostos ao  
233 P<sub>4</sub>L, β-CD-P<sub>4</sub> e P<sub>4</sub>M ( $p < 0,05$ ). Já para a categoria Alimentação, foi observado uma redução  
234 na frequência de exibição do comportamento *Forragear* apenas no grupo P<sub>4</sub>M ( $p < 0,05$ ). Na  
235 categoria Social agonístico, a exposição a P<sub>4</sub>M aumentou a frequência de exibição ( $p < 0,05$ )

236 dos comportamentos *Perseguição*, *Fuga* e *Ataque*. Na análise da categoria Resposta ao  
237 estresse, os animais expostos ao P<sub>4</sub>L e P<sub>4</sub>M apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na  
238 frequência de exibição do comportamento *Respiração Aérea*.

239 Os comportamentos exibidos pelos animais durante o período de exposição de 60 dias  
240 podem ser observados na figura 1B. Foi observado na categoria Locomoção uma redução na  
241 frequência de exibição do comportamento *Nadar Lento* nos animais expostos ao P<sub>4</sub>L. Ainda  
242 nos animais expostos ao P<sub>4</sub>L e P<sub>4</sub>M foi observado uma redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de  
243 exibição do comportamento *Nadar Rápido*. Isto indica que a exposição prolonga (60 dias) aos  
244 hormônios reduziu atividade locomotora dos animais. Na avaliação da categoria Alimentação  
245 foi observado apenas nos animais expostos a P<sub>4</sub>M, redução da frequência de exibição do  
246 comportamento *Forragear*, assim como vista nos primeiros 30 dias de exposição. Na  
247 categoria Social agonístico foi possível observar que apenas os animais expostos ao P<sub>4</sub>L e a  $\beta$ -  
248 CD-P<sub>4</sub> exibiram o comportamento *Afugentar*. Nos animais expostos a P<sub>4</sub>M foi observado um  
249 aumento da frequência ( $p < 0,05$ ) dos comportamentos agressivos como *Perseguição*, *Fuga*, e  
250 *Afastar*, assim como observado em 30 dias de exposição. Ainda na categoria Social observou-  
251 se ( $p < 0,05$ ) a exibição do comportamento *Ataque*, nos grupos de animais expostos a  $\beta$ -CD-  
252 P<sub>4</sub> e P<sub>4</sub>M. Já na análise da categoria Resposta ao estresse os animais expostos a P<sub>4</sub>L e P<sub>4</sub>M,  
253 aumentaram a frequência de exibição do comportamento *Respiração Aérea*, assim como em  
254 30 dias de exposição. Diante dos resultados obtidos o P<sub>4</sub>M se mostrou mais tóxico na  
255 avaliação comportamental em relação aos outros grupos estudados.

### 256 3.6. Análise comportamental dos adultos expostos aos estrógenos

257 Os comportamentos exibidos pelos animais expostos aos estrógenos podem ser  
258 observados na Figura 1C em 30 dias de exposição. Foi observado na categoria Locomoção  
259 uma redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de exibição do comportamento *Nadar Lento* nos  
260 animais expostos ao E<sub>2</sub>T. Também houve redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de exibição do  
261 comportamento *Flutuar* nos animais expostos a  $\beta$ -CD-E<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>T, estes mesmos grupos de  
262 animais também exibiram aumento na exibição do comportamento *Descansar*. Isto indica  
263 uma redução de comportamentos ativos e aumento de comportamentos inativos o que poderia  
264 indicar possível efeito tóxico dos hormônios em relação a atividade locomotora dos animais.  
265 Na avaliação da categoria Alimentação, todos os grupos expostos aos estrógenos  
266 apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) na frequência de exibição evento *Forragear*. Já  
267 na categoria Social, nos animais expostos ao E<sub>2</sub>L foi observado aumento na frequência de  
268 exibição do comportamento *Afugentar*. Nas observações das frequências de exibição ( $p <$   
269 0,05) dos comportamentos *Perseguição*, *Fuga* e *Afastar* foi observado apenas nos animais

270 expostos ao E<sub>2</sub>T. Em todos os animais expostos aos estrógenos foram observadas frequências  
271 de exibições (p < 0,05) do comportamento *Ataque* indicando maior agressividade. Na  
272 categoria Resposta ao estresse, foi visto que apenas os animais expostos ao E<sub>2</sub>T exibiram  
273 aumento na frequência de exibição do comportamento *Respiração Aérea*.

274 Os comportamentos exibidos pelos animais expostos aos estrógenos em 60 dias de  
275 exposição encontram-se na Figura 1D. Na avaliação da categoria Locomoção foi observado  
276 novamente uma redução na frequência (p < 0,05) de exibição do comportamento *Nadar Lento*  
277 em todos os grupos expostos, bem como diminuição da frequência de exibição do  
278 comportamento *Nadar Rápido*, apenas nos animais expostos ao E<sub>2</sub>L. O comportamento de  
279 *Movimento circulatório* foi observado (p < 0,05) apenas nos animais expostos a β-CD-E<sub>2</sub>. Na  
280 categoria Social, todos os grupos expostos aos estrógenos apresentaram aumento na  
281 frequência de exibição (p < 0,05) nos comportamentos *Afugentar* e *Ataque* indicando maior  
282 agressividade. Nos animais expostos ao E<sub>2</sub>L e ao E<sub>2</sub>T houve aumento da frequência de  
283 exibição dos comportamentos de *Perseguição* e *Fuga*. Apenas nos animais expostos ao E<sub>2</sub>L  
284 apresentaram aumento (p < 0,05) de frequência para o evento *Afastar*. Diante dos resultados  
285 obtidos, o E<sub>2</sub>L e o E<sub>2</sub>T se mostraram mais tóxicos na avaliação comportamental em relação  
286 aos outros grupos estudados.

### 287 3.7. Avaliação da capacidade reprodutiva de peixes sob exposição hormonal

288 A análise da capacidade reprodutiva dos grupos expostos aos progestágenos e  
289 estrógenos encontra-se descrita na tabela 4. Nos grupos expostos aos progestágenos não  
290 houve diferenças significativas quanto ao número de ovos viáveis e inviáveis. Já a análise dos  
291 dados dos grupos expostos aos estrógenos, houve diferença significativa (p < 0,05) nos  
292 animais expostos ao E<sub>2</sub>T com aumento no número de ovos viáveis e redução no número dos  
293 ovos inviáveis em relação ao grupo controle.

## 294 4. Discussão

295 As baixas concentrações de hormônio utilizadas neste estudo podem ser consideradas  
296 como ambientalmente relevantes, devido aos hormônios E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> e outros hormônios sintéticos  
297 geralmente serem encontrados em concentrações de 0,5 até 350 ng/L nos efluentes (Kolpin et  
298 al., 2002; Wells et al., 2009; Murack, 2011). Entretanto, as concentrações utilizadas em nosso  
299 estudo, apesar de serem consideradas baixas, causaram efeitos tóxicos nos animais expostos.

300 Durante o teste de toxicidade aguda com os embriões de *Danio rerio*, foi observado  
301 em todos os animais expostos a P<sub>4</sub>L (10-30 ng/L), edema de pericárdio (Ep) indicando que na  
302 sua forma livre, mesmo em concentrações baixas, P<sub>4</sub> foi cardiotoxic. O que poderia justificar  
303 este efeito seria a presença de P<sub>4</sub> exógena (P<sub>4</sub>L) proveniente da exposição química, já que

304 Huang et al. (2012) observaram a presença de receptores de progesterona no sistema  
305 cardiovascular de *zebrafish* envolvidos com o desenvolvimento do coração. Adicionalmente,  
306 foi observado em outros estudos (Barbagallo et al., 2001; Santos et al. 2014) que a  
307 progesterona tem efeito modulador sobre a contratilidade vascular independente de estrógeno  
308 em mamíferos, causando vasodilatação ou vasoconstrição, o que poderia justificar o edema de  
309 pericárdio encontrado nos animais expostos durante o teste de toxicidade aguda. A frequência  
310 cardíaca nos embriões expostos a P<sub>4</sub>L foi reduzida durante quase todas as horas analisadas,  
311 exceto o grupo exposto a concentração de 10 ng/L de P<sub>4</sub>L nas últimas 96 hpf.

312 Já nos embriões expostos a  $\beta$ -CD-P<sub>4</sub>, não foram observados efeitos teratogênicos em  
313 relação ao controle e P<sub>4</sub>L. É possível que o complexo tenha alterado as propriedades físico-  
314 químicas da progesterona, diminuindo sua toxicidade. Isto também foi observado por  
315 Ol'khovich et al. (2014), que avaliaram os efeitos de compostos citotóxicos livres e  
316 complexados a hidroxipropil- $\beta$ -CD, onde os resultados mostraram que o complexo aumentou  
317 a solubilidade aquosa dos compostos e reduziram a dosagem e a toxicidade. Os batimentos  
318 cardíacos avaliados nos animais expostos a  $\beta$ -CD-P<sub>4</sub> foram semelhantes ao grupo controle.

319 O aparecimento do efeito de coagulação (Cg) foi visto apenas nos indivíduos expostos  
320 a P<sub>4</sub>M a partir das 72 e 96 hpf sendo estes efeitos tóxicos menores se comparado ao grupo  
321 exposto a P<sub>4</sub>L (Tabela 1). O fato de ser modificada industrialmente através do processo de  
322 micronização (P<sub>4</sub>M) com redução do tamanho das partículas, e por se tratar de um sistema de  
323 liberação controlada (SLC), o que libera o fármaco de forma prolongada (Bruxel et al., 2012),  
324 pode ter reduzido sua toxicidade. Yuan et al. (2016) observaram que a progesterona inibiu a  
325 reparação de vasos sanguíneos em células endoteliais arteriais de ratos suprimindo a  
326 proliferação quando a célula se encontra sob estresse oxidativo, causando então problemas  
327 vasculares o que poderia estar relacionado ao aparecimento do efeito de Cg. O hormônio P<sub>4</sub>  
328 em sua forma livre, diante das diferentes formulações testadas, apresentou maior potencial de  
329 toxicidade durante o estudo dos efeitos teratogênicos e frequência cardíaca.

330 Durante o teste de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio* expostos aos  
331 estrógenos, foram observados nas primeiras 24 hpf e nas 72 hpf edema de pericárdio (Ep) nos  
332 animais expostos ao E<sub>2</sub>L (10-20 ng/L). Os embriões somam alterações anatômicas e  
333 fisiológicas e, como os mecanismos de desintoxicação são desenvolvidos com o avanço da  
334 fase embrionária é possível que a intoxicação tenha sido temporária (Parichy, et al., 2009;  
335 Gómez-Requeni, et al. 2010). No nosso estudo, os embriões expostos ao E<sub>2</sub>L apresentaram  
336 uma reversão dos efeitos ao longo do experimento, o que pode estar relacionado ao aumento  
337 da capacidade de metabolização hormonal nas células do fígado, onde são encontrados

338 receptores estrogênicos  $Re\alpha$  e  $Re\beta$  (Cosnefroy et al., 2012). Também foi observado que o  $E_2L$   
339 na maior concentração (30 ng/L) nas 96 hpf, apresentou efeitos cardiotoxicos (Tabela 2) nos  
340 animais expostos, mesmo sabendo que o estrogênio exerce seus efeitos cardioprotetores  
341 (Pedrosa, et al., 2009). A dose e o tempo de exposição podem modificar a capacidade de  
342 metabolização hormonal, alterando a toxicidade. Houve aumento da frequência cardíaca nos  
343 embriões expostos ao  $E_2L$  nos tempos avaliados. Saili et al. (2012) relataram que o bisfenol A  
344 (DE com efeito estrogênico) levou a hiperatividade de larvas de peixes de *zebrafish*, o que  
345 poderia justificar o aumento da frequência cardíaca observado no nosso trabalho.

346 Não foram observados efeitos teratogênicos significativos nos animais expostos ao  $\beta$ -  
347 CD- $E_2$ , durante todo o experimento indicando que a complexação com a  $\beta$ -CD reduziu os  
348 efeitos tóxicos. O complexo  $\beta$ -CD- $E_2$  aumentou a frequência cardíaca nas primeiras horas  
349 avaliadas, sendo estas frequências normalizadas posteriormente.

350 Nos animais expostos ao  $E_2T$  (30 ng/L), durante as 24 hpf e nas 72 hpf foi identificado  
351 edema de pericárdio (Ep) sendo este efeito não mais observado nas horas subsequentes de  
352 avaliação, assim como observado nos indivíduos expostos ao  $E_2L$ . Entretanto, a exposição ao  
353  $E_2T$  reduziu a frequência cardíaca dos animais nas maiores concentrações.

354 Nos testes de toxicidade crônica com os animais adultos, os resultados indicaram que  
355 o comportamento animal foi alterado nos indivíduos expostos aos progestágenos  
356 independentemente do tempo de exposição. Os progestágenos diminuíram a atividade  
357 locomotora dos animais expostos através da diminuição dos comportamentos da categoria  
358 Locomoção *Flutuar* e *Nadar Rápido*. A  $P_4M$  apresentou maior potencial de toxicidade,  
359 atuando no aumento dos comportamentos relacionados a agressividade da categoria Social  
360 Agonístico como *Perseguição*, *Fuga* e *Ataque*. Estes dados são semelhantes aos visualizados  
361 por (Santos et al., 2016), que observou aumento dos comportamentos inativos, assim como  
362 aumento dos comportamentos agressivos em *Betta splendens* expostos a diferentes tipos de  
363 contraceptivos orais combinados derivados de progestinas. Na categoria Resposta ao Estresse  
364 houve aumento do comportamento *Respiração Aérea*, exibido pelos animais expostos ao  $P_4$  e  
365  $P_4T$ . Os animais apresentaram maior necessidade de obtenção de oxigênio através da exibição  
366 do comportamento *Respiração Aérea* presente na categoria Resposta ao Estresse. O PR-M é  
367 um receptor esteroide encontrado em células mitocondriais, estes são dependentes da ação  
368 direta da progesterona (Dai et al. 2013). Os mesmos autores demonstraram que a progesterona  
369 provocou alterações no potencial da membrana mitocondrial com aumento no consumo de  
370 oxigênio e aumento na respiração celular. Diante disto, o aumento da respiração celular pode  
371 vir a desempenhar papel importante na modulação fisiológica do processo respiratório (Dai et

372 al., 2013) o que poderia justificar o aumento da frequência do comportamento *Respiração*  
373 *Aérea* observado em nosso trabalho. O complexo  $\beta$ -CD-P<sub>4</sub> não apresentou diferenças no  
374 potencial de toxicidade quando comparado ao P<sub>4</sub>L.

375 Segundo Clotfelter e Rodriguez (2006), tanto a exposição aguda quanto a crônica a  
376 estrógenos podem afetar o comportamento e a fisiologia de peixes que tenham contato com  
377 compostos estrogênicos. Durante a análise comportamental dos animais expostos por 30 dias  
378 aos estrógenos, houve uma diminuição dos comportamentos *Nadar Lento*, *Flutuar* e  
379 *Descansar* em todos os grupos expostos, havendo redução da atividade locomotora. Este  
380 mesmo efeito também foi observado em 60 dias de exposição, porém, através da diminuição  
381 dos comportamentos *Nadar Lento* e *Nadar Rápido*. Também houve diminuição da frequência  
382 do comportamento *Forragear*, que está ligado a busca por alimento em todos os grupos  
383 estudados. Montello e Todd (2010) observaram em fêmeas de *Betta splendens*, uma redução  
384 nos comportamentos relacionados a natação, ainda, alguns animais ficaram mais letárgicos.  
385 Os mesmos autores atribuem este efeito a uma modificação no equilíbrio interno dos animais  
386 quando expostos ao E<sub>2</sub>. Este efeito também pode ter ocorrido em nosso estudo, o que  
387 justificaria a redução observada nos comportamentos de natação. Santos et al. (2016) também  
388 observou redução da atividade locomotora em peixes sob exposição ao E<sub>2</sub>.

389 Houve um aumento na frequência de exibição dos comportamentos agressivos nos  
390 grupos expostos ao E<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>T. No nosso trabalho, os grupos experimentais foram formados por  
391 quantidades iguais de machos e fêmeas, no entanto, as respostas sociais no *zebrafish* ao  
392 estresse são similares independente do sexo (Dahlbom et al., 2012). A exposição ao E<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>T  
393 poderia induzir alterações ou efeito reorganizacional no cérebro do *zebrafish* levando as  
394 mudanças comportamentais observadas (Pradhan et al., 2015), isto não foi observado nos  
395 animais expostos ao complexo  $\beta$ -CD-E<sub>2</sub> devido a uma possível redução na sua toxicidade  
396 como mencionado anteriormente. Foi observado aumento na frequência do comportamento  
397 *Respiração Aérea* nos grupos estudados. Este evento aparece muitas vezes na sequência de  
398 padrões de submissão após derrotas em confrontos agonísticos. Isto também foi evidenciado  
399 por Oliveira e Almada (1998), estando diretamente relacionado ao gasto energético e aumento  
400 taxa metabólica em situações de estresse.

401 Em nosso estudo não houve alterações quanto a capacidade reprodutiva nos animais  
402 adultos expostos aos progestágenos na concentração de 10 ng/L. DeQuattro et al. (2012)  
403 observaram em estudo realizado com *Pimephales promelas* que não houve diferença  
404 significativa no efeito da P<sub>4</sub> sob a capacidade reprodutiva na concentração de 10 ng/L, porém  
405 nas concentrações de 100 ng/L e 1.000 ng/L de P<sub>4</sub> foram observados efeitos tóxicos, pois

406 reduziram significativamente a produção de ovos. Como no nosso estudo, foram usadas  
407 concentrações 10 vezes menores, também não visualizamos efeitos tóxicos na capacidade  
408 reprodutiva dos animais. Em relação a avaliação da capacidade reprodutiva dos animais  
409 expostos aos estrógenos, não houve alterações na quantidade e viabilidade dos ovos nos  
410 grupos expostos ao E<sub>2</sub>L e β-CD-E<sub>2</sub>. Entretanto, houve aumento no número de ovos viáveis e  
411 diminuição no número de ovos inviáveis no grupo exposto ao E<sub>2</sub>T. Isto pode ser parcialmente  
412 atribuído à aleatoriedade na deposição de ovos e número de ovos colocados por cada fêmea  
413 (Shappell et al., 2010) e não necessariamente ao efeito tóxico provocado por E<sub>2</sub>T.

#### 414 **4. Conclusão**

415 Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que os hormônios esteroides em sua  
416 forma livre e comercial se apresentaram como disruptores endócrinos. Foram observados  
417 efeitos teratogênicos e alterações na frequência cardíaca de embriões e redução na capacidade  
418 locomotora, respiratória e agressividade de animais adultos. Não foram observados efeitos  
419 tóxicos nos animais quando expostos aos hormônios complexados a ciclodextrinas. Por fim,  
420 devido ao fato de que a ciclodextrina pode alterar a toxicidade de hormônios, recomendamos  
421 que os complexos não sejam tratados como melhoramentos das moléculas livres e sim como  
422 novos produtos que devem ser avaliados individualmente em relação a sua toxicidade.

#### 423 **5. Agradecimentos**

424 Os autores agradecem a Universidade Federal Rural de Pernambuco à Coordenação de  
425 Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e ao Conselho  
426 Nacional de Pesquisas (CNPq - 477215/2013-0) e a Fundação de Amparo à Ciência e  
427 Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE-APQ-0933-2.08/15) pelo o apoio financeiro.

#### 428 **6. Referências**

- 429 Altmann, J., 1974. Observational study of behaviour: sampling methods. *Behaviour*, 49, 267 -  
430 277.
- 431 Baird, C. *Química Ambiental*; Récio, M.A.L.; Carrera, L.C.M. 2.ed. Porto Alegre. Bookman  
432 2002.
- 433 Clotfelter, E.D.; Rodriguez, A.C., 2006. Behavioral changes in fish exposed to  
434 phytoestrogens. *Environ. Pollut.*, 144, 833- 839.
- 435 Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J. M., Pakdel, F., Balaguer, P., Aït-  
436 Aïssa, S., 2012. Selective Activation of Zebrafish Estrogen Receptor Subtypes by Chemicals  
437 by Using Stable Reporter Gene Assay Developed in a Zebrafish Liver Cell Line.  
438 *Toxicological Sciences*, 125, 439–449.

- 439 Dahlbom S. J., Backstrom T., Lundstedt-Enkel K., Winberg S., 2012. Aggression and  
440 monoamines: effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). Behav Brain Res, 228,  
441 333–338.
- 442 Dai, Q., Shah, A. A., Garde, R.V., Yonish, B. A., Zhang, L., Medvitz, N. A., Miller, S. E.,  
443 Hansen, E. L., Dunn, C. N., Price, T. M., 2013. A Truncated Progesterone Receptor (PR-M)  
444 Localizes to the Mitochondrion and Controls Cellular Respiration. Mol Endocrinol, 27, 741–  
445 753.
- 446 Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: A review. Process Biochemistry , 39,  
447 1033–1046.
- 448 Dequattro, Z. A., Peissig, E. J., Antkiewicz, D. S., Lundgren, E. J., Hedman, C. J. Hemming,  
449 J. D.C., Barry, T. P., 2012. Effects of progesterone on reproduction and embryonic  
450 development in the fathead minnow (*pimephales promelas*). Environmental Toxicology and  
451 Chemistry, 31, 851 – 856.
- 452 Fong, H. C. H., Ho, J. C. H., Cheung, A. H. Y. Lai, K.P., Tse, W. K.F., 2016. Developmental  
453 toxicity of the common UV filter, benophenone-2, in zebrafish embryos. Chemosphere, 164,  
454 413–420.
- 455 Gharib, R., Auezova, L., Charcosset, C., Greige-Gerges, H., 2017. Drug-in-cyclodextrin-in-  
456 liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole.  
457 Food Chemistry. 218, 365–371.
- 458 Gómez-Requeni, P., Conceição, L.E.C., Jordal, O.A.E., Ronnestad, I., 2010. A reference  
459 growth curve for nutritional experiments in zebrafish (*Danio rerio*) and changes in whole  
460 body proteome during development, Fish Physiology and Biochemistry, 36, 1199–1215.
- 461 Gupta, G. S. et al., 2016. Montmorillonite clay alters toxicity of silver nanoparticles in  
462 zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo, Chemosphere, 163, 242 e 251.
- 463 Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., et. al., 2013. The zebrafish reference  
464 genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 496, 498–503.

- 465 Jocsak, G., Kiss, D., Toth, I., Goszleth, G., Bartha, T., Frenyo, L., Horvath, T., Zsarnovszky,  
466 A., 2016. Comparison of Individual and Combined Effects of Four Endocrine Disruptors on  
467 Estrogen Receptor Beta Transcription in Cerebellar Cell Culture: The Modulatory Role of  
468 Estradiol and Triiodo-Thyronine. *International Journal of Environmental Research and Public  
469 Health*, 13, 619.
- 470 Kalueff, A. V, Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S.,  
471 Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E.,  
472 Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P.,  
473 Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S.C.F., Weng,  
474 W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish  
475 behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10, 70–86.
- 476 Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B.,  
477 Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants  
478 in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*,  
479 36, 1202–1211.
- 480 Lakkakula, J., Krause, R.W.M., Ndinteh, D.T., Vijaylakshmi, S.P., Raichur, A.M., 2012.  
481 Detailed investigation of a  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complex with l-thyroxine for improved  
482 pharmaceutical formulations. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 74, 397–405.
- 483 Loftsson, T., 2015. Formulation of Drug-Cyclodextrin Complexes, Faculty of Pharmaceutical  
484 Sciences, University of Iceland, Hofsvallagata 53, Reykjavik IS-107, Iceland.
- 485 Montello, M.; Todd, N. E., 2010. The Potential for Disruption of Aggressive Behavior in  
486 Female *Betta splendens* by Environmental Estrogens. *Journal of Behavioral and Neuroscience  
487 Research*, 8, 2, 26-34.
- 488 Murack, P. J.; Parrish, J.; Barry, T. P., 2011. Effects of progesterone on sperm motility in  
489 fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 104, 1–2, 121–125.
- 490 Oishi, K., Toyao, K., Kawano, Y., 2008. Suppression of estrogenic activity of 17 $\beta$ -estradiol  
491 by  $\beta$ -cyclodextrin. *Chemosphere* 73, 1788–1792.

- 492 Oliveira, R. F., Almada, V. C., 1998. Androgenization of dominant males in a cichlid fish:  
493 Androgens mediate the social modulation of sexually dimorphic traits. *Ethology*, 104, 841-  
494 858.
- 495 Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N., Engeszer, R.E., 2009. Normal  
496 Table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the  
497 living fish. *Developmental Dynamics*, 238, 2975–3015.
- 498 Pedrosa, D. F., Resende, L. C. D., Silva, I. V., Rangel, L. B. A., Gonçalves, W. L. S., Graceli,  
499 J. B., 2009. Efeitos benéficos do estrogênio no sistema cardiovascular. *Perspec Online*, 3, 12.
- 500 Saili, K. S., Corvi, M. M., Weber, D. N., Patel, A. U., Das, S. R., Przybylaa, J., Andersona, K.  
501 A., Tanguay, R. L., 2012. Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early  
502 life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicol*, 291, 83-92.
- 503 Santos, B.D., Silva, M.C.G., Santos, T.P., Silva, S.C.B.L., Cadena, M.R.S., Cadena, P.G.,  
504 2016. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os  
505 parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). *Arq. Bras. Med. Veterinária e*  
506 *Zootec.* 68, 387–396.
- 507 Shappell, N.W., Hyndmanb, K.M.; Bartell, S.E.; Schoenfuss, H.L., 2010. Comparative  
508 biological effects and potency of 17 $\alpha$ - and 17 $\beta$ -estradiol in fathead minnows. *Aquat Toxicol*,  
509 100, 1-8.
- 510 Spirita, S.V., Ahila, A.J., 2015. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Danio*  
511 *rerio*. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3, 6–11.
- 512 Strong, P., Xie, S., Clarke, W.P., 2015. Methane as a resource: can the methanotrophs add  
513 value? *Environmental Science & Technology*, 49, 4001–4018.
- 514 Wells, M. J., Fono, L. J., Pellegrin, M. L., & Morse, A., 2007. Emerging pollutants. *Water*  
515 *Environment Research*, 79,10, 2192-2209.
- 516 Wu, H., Li, G., Liu, S., Hu, N., Geng, D., Chen, G., Sun, Z., Zhao, X., Xia, L., You, J., 2016.  
517 Monitoring the contents of six steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in  
518 chicken, fish and aquaculture pond water samples using pre-column derivatization and  
519 dispersive liquid–liquid microextraction with the aid of experimental design metho. *Food*  
520 *Chem.* 192, 98–106.
- 521 Yuan, X., Fan, Y., Yang, C., Gao, X., Zhang, L., Hu, Y., Wang, Y., Jun, H., 2016.  
522 Progesterone amplifies oxidative stress signal and promotes NO production via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in

- 523 mouse kidney arterial endothelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular*  
524 *Biology*, 155, 104–111.
- 525 Zagatto, P. A.; Bertoletti, E., 2011. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2. ed.  
526 São Carlos, RIMA.
- 527 Zhang, Y., Dong, S., Wang, H., Tao, S., Kiyama, R., 2016. Biological impact of  
528 environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environ.*  
529 *Pollut.* 213, 809–824.

1 Tabela 1. Efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) expostos aos progestágenos. O sombreado  
 2 enfatiza efeitos significativos. Legenda: Ep - edema de pericárdio; Esv - edema de saco vitelínico; Dcl - deformação da coluna; Dca -  
 3 deformação da cauda; Cg - coagulação; FC - frequência cardíaca.

Tempo	Composto	Controle 0 ng/L	P <sub>4</sub>			β-CD-P <sub>4</sub>			P <sub>4</sub> M		
			10 ng/L	20 ng/L	30 ng/L	10 ng/L	20 ng/L	30 ng/L	10 ng/L	20 ng/L	30 ng/L
<b>24hpf</b>	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	7,0 ± 0,6	13,0 ± 0,6 <sup>*#</sup>	0	0	0 <sup>#</sup>	7,0 ± 1,2	3,0 ± 0,6	0
	Esv (%)	0	3,0 ± 0,6	37,0 ± 1,2 <sup>*#</sup>	13,0 ± 1,2 <sup>*</sup>	0	0 <sup>#</sup>	0	13,0 ± 0,6 <sup>*</sup>	3,0 ± 0,6	3,0 ± 0,6
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	85 ± 15,4	67,0 ± 14,4 <sup>*#</sup>	64,0 ± 16,4 <sup>*#</sup>	62,0 ± 16,7 <sup>*#</sup>	89,0 ± 9,1 <sup>#</sup>	92,0 ± 6,9 <sup>*#</sup>	97,0 ± 5,5 <sup>*#</sup>	97,0 ± 8,7 <sup>*</sup>	97,0 ± 10,8 <sup>*</sup>	98,0 ± 8,9 <sup>*</sup>
<b>48hpf</b>	Mortalidade (%)	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	47,0 ± 2,1 <sup>*#</sup>	50,0 ± 2,6 <sup>*</sup>	47,0 ± 1,5 <sup>*</sup>	3,0 ± 0,6 <sup>#</sup>	13,0 ± 0,6	10,0 ± 1	20,0 ± 1,7	10,0 ± 0	23,0 ± 2,5
	Esv (%)	0	33,0 ± 0,6 <sup>*#</sup>	60,0 ± 1 <sup>*#</sup>	17,0 ± 0,6 <sup>*#</sup>	0 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	10,0 ± 1	3,0 ± 0,6	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	138 ± 19,9	120,0 ± 11,8 <sup>*#</sup>	99,0 ± 23,5 <sup>*#</sup>	127,0 ± 12,4 <sup>*#</sup>	164,0 ± 8,8 <sup>*#</sup>	165,0 ± 10,3 <sup>*#</sup>	164,0 ± 10,1 <sup>*#</sup>	153,0 ± 10,2 <sup>*</sup>	155,0 ± 8,6 <sup>*</sup>	147,0 ± 26,3
<b>72hpf</b>	Mortalidade (%)	-	0	0	0	0	0	10	0	0	0
	Ep (%)	0	27,0 ± 2,1	50,0 ± 1,7 <sup>*</sup>	50,0 ± 12,6 <sup>*#</sup>	0	13,0 ± 0,6	10,0 ± 1 <sup>#</sup>	13,0 ± 0,6	13,0 ± 0,6	40,0 ± 1,4 <sup>*</sup>
	Esv (%)	0	3,0 ± 0,6	23,0 ± 0,6 <sup>*#</sup>	0	0	0 <sup>#</sup>	0	0	0	20,0 ± 1 <sup>*</sup>
	Dcl (%)	0	0	10,0 ± 1 <sup>*</sup>	3,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	10,0 ± 1 <sup>*</sup>
	Dca (%)	0	0	7,0 ± 0,6 <sup>*#</sup>	0	0	0 <sup>#</sup>	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30,0 ± 1,7 <sup>*</sup>
	FC (bpm/min)	160 ± 13,9	165,0 ± 13,5	138,0 ± 23,1 <sup>*#</sup>	159,0 ± 23	158,0 ± 7,6	159,0 ± 9,4 <sup>#</sup>	160,0 ± 10,2	149,0 ± 7,7 <sup>*</sup>	155,0 ± 8	164,0 ± 12,6
<b>96hpf</b>	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	10	0	0	3

Ep (%)	0	0	33,0 ± 1,2 <sup>*#</sup>	0	0	0 <sup>#</sup>	0	3,0 ± 0,6	0	20,0 ± 1,7 <sup>*</sup>
Esv (%)	0	0	3,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	0	13,0 ± 1,2 <sup>*</sup>
Dcl (%)	0	0	17,0 ± 0,6 <sup>*#</sup>	7,0 ± 1,2	3,0 ± 0,6	0 <sup>#</sup>	3,0 ± 0,6	0	0	13,0 ± 1,2 <sup>*</sup>
Dca (%)	0	3,0 ± 0,6	23,0 ± 2,5 <sup>*#</sup>	0	0	0 <sup>#</sup>	0	0	0	0
Cg (%)	0	0	3,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	0	23,0 ± 2,5 <sup>*</sup>
FC (bpm/min)	161 ± 12,8	172,0 ± 6,2 <sup>*</sup>	165,0 ± 21,4	167,0 ± 6,6	166,0 ± 7,7	163,0 ± 9,3	167,0 ± 8,4	168,0 ± 6,8 <sup>*</sup>	159,0 ± 6,6	155,0 ± 10,9

4 \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

5 #Diferença significativa entre os grupos expostos a P<sub>4</sub> e β-CD-P<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ ).



Ep (%)	0	0	3,0 ± 0,6	80,0 ± 2,0*#	0	0	0 <sup>#</sup>	0	3,0 ± 0,6	0
Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dcl (%)	0	10,0 ± 1,0*#	3,0 ± 0,6	3,0 ± 1,7	0 <sup>#</sup>	0	0	0	7,0 ± 0,6	0
Dca (%)	0	3,0 ± 0,6	0	17,0 ± 0,6*#	0	0	0 <sup>#</sup>	0	0	0
Cg (%)	0	0	0	3,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	0
FC (bpm/min)	169 ± 10	177,0 ± 10,5*#	180,0 ± 7,9	179,0 ± 6,4*#	168,0 ± 7,2 <sup>#</sup>	164,0 ± 5,7	159,0 ± 5,9*#	168,0 ± 7,2	164,0 ± 5,7	159,0 ± 5,9*

9 \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

10 #Diferença significativa entre os grupos expostos a E<sub>2</sub> e β-CD-E<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ).

11 Tabela 3. Etograma descritivo de *zebrafish* (*Danio rerio*)

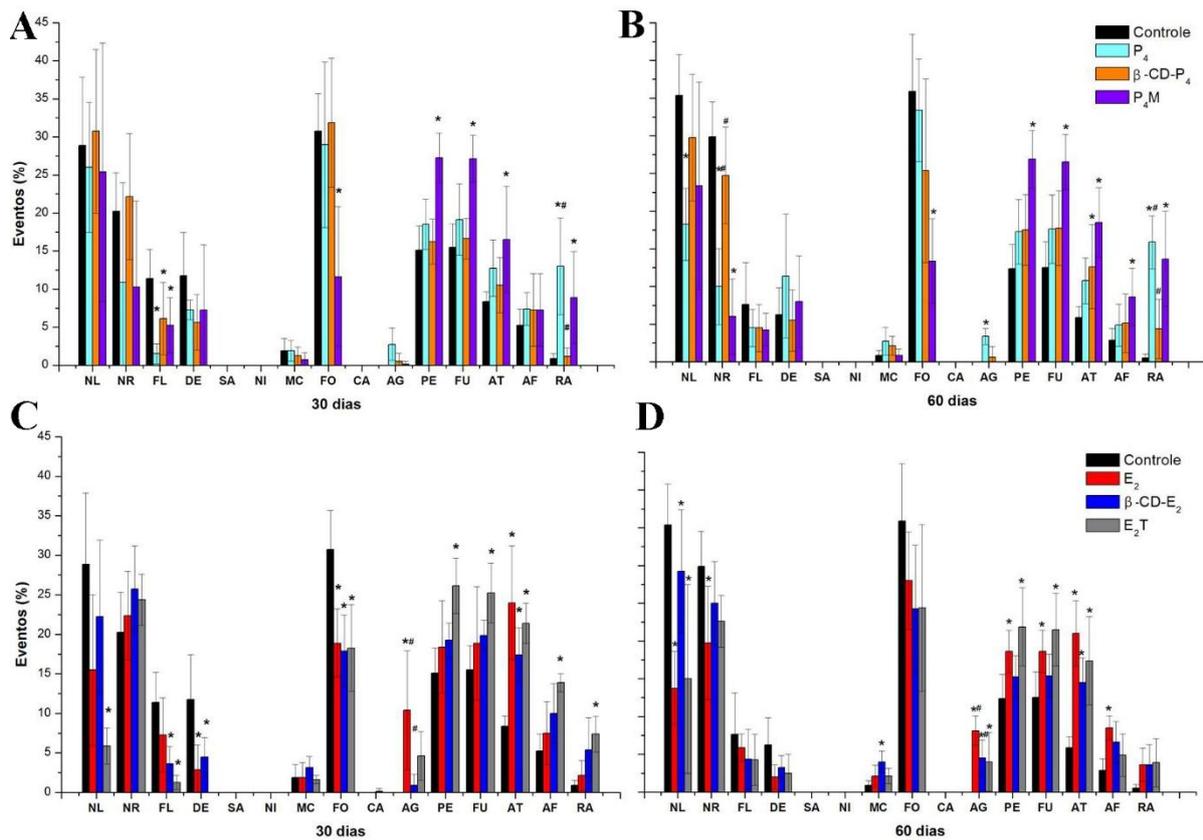
Etograma dos adultos de <i>zebrafish</i>			
Categoria	Evento	Sigla	Descrição
Locomoção	Nadar lento	NL	Movimentar a nadadeira caudal lentamente de modo que seu deslocamento ocorra de forma lenta.
	Nadar rápido	NR	Movimentar sua nadadeira caudal rapidamente fazendo com que ele desloque mais rápido no corpo d'água. Esse comportamento pode ser seguido por qualquer ataque.
	Flutuar	FL	Sem movimento, próximo a lâmina d'água
	Descansar	DE	Sem movimento, próximo ao substrato
	Saltar	SA	Pular para fora do aquário
	Natação inclinada	NI	Natação com um ângulo de no mínimo 45° em relação à superfície da água.
	Movimento Circulatório	MC	Natação em direção circular.
Alimentação	Forragear	FO	Nadar próximo ao substrato
	Capturar	CA	Nadar até o alimento e faz um movimento rápido com a boca em direção ao alimento.
Social / Agonístico	Afugentar	AG	O animal nada em direção ao oponente rapidamente podendo ou não haver contato provocando um afastamento do outro.
	Perseguir	PE	Natação rápida em direção ao oponente
	Fuga	FU	Afastar-se do componente que o persegue ou ataca
	Ataque	AT	Ataque com a boca no corpo do oponente
	Afastar	AF	O animal se afasta com um movimento curto do oponente após sofrer um ataque.
Resposta ao Estresse	Respiração Aérea	RA	O peixe utiliza da respiração aérea mesmo sob condições de aeração.

13 Tabela 4. Avaliação reprodutiva dos adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*). Legendas: P<sub>4</sub> –  
 14 Progesterona Livre; β-CD-P<sub>4</sub> – Progesterona complexada a β-ciclodextrina; P<sub>4</sub>M –  
 15 Progesterona micronizada; E<sub>2</sub> – Estradiol livre; β-CD-E<sub>2</sub> – Estradiol complexado a β-  
 16 ciclodextrina; E<sub>2</sub>T – Estradiol transdérnico.

Grupos	Ovos viáveis	Ovos Inviáveis
Controle	568 ± 37,9	180 ± 248
P <sub>4</sub>	224 ± 196,2	63 ± 90,2
β-CD-P <sub>4</sub>	610 ± 318,7	121 ± 134
P <sub>4</sub> M	574 ± 622,7	106 ± 150,9
E <sub>2</sub>	461 ± 522	131 ± 105,4
β-CD-E <sub>2</sub>	881 ± 366,1	239 ± 201,8
E <sub>2</sub> T	1028 ± 146*	126 ± 51,9*

17 \*Diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).

18 Figura 1. Eventos comportamentais de *D. rerio* expostos em teste de toxicidade crônica aos  
 19 progestágenos e estrógenos e por 30 (A e C) e 60 (B e D) dias. Para os eventos exibidos: NL  
 20 – Nadar Lento; NR –Nadar Rápido; FL -Flutuar; DE - Descansar; SA- Saltar; NI- Natação  
 21 Inclinada; MC- Movimento Circulatório; FO- Forragear; CA - Capturar; AG- Afugentar; PE -  
 22 Perseguição; FU- Fuga; AT - Ataque; AF- Afastar; RA – Respiração Aérea. Para os grupos:  
 23 P<sub>4</sub> – Progesterona livre; β-CD-P<sub>4</sub> – Progesterona complexada a β-ciclodextrina; P<sub>4</sub>M –  
 24 Progesterona micronizada; E<sub>2</sub> – Estradiol livre; β-CD-E<sub>2</sub> – Estradiol complexado a β-  
 25 ciclodextrina; E<sub>2</sub>T – Estradiol transdérnico. \*Diferença significativa em relação ao controle  
 26 (p < 0,05). #Diferença significativa entre os grupos expostos aos hormônios livres e  
 27 complexados a β-ciclodextrina.  
 28



## Capítulo 2

22/07/2016 870160038342  
14:03

### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 20 2016 017042 2

“SISTEMA PARA REPRODUÇÃO DE PEIXES COM COLETOR DE OVOS”

### RELATÓRIO DESCRITIVO

#### Campo da Invenção

[001] O presente pedido de patente de modelo de utilidade trata-se de um sistema de reprodução com coletor de ovos de peixes compreendendo um reservatório com subdivisão vertical para separação por sexo antes da cópula e tela de separação aderida as paredes do mesmo, formando um espaço de armazenamento dos ovos em formato afunilado, onde estes podem ser facilmente coletados através do acionamento do dispositivo de retirada de ovos. Desta forma, evitando a predação dos ovos pelos peixes adultos e seu manuseio, reduzindo o tempo de coleta e o estresse dos animais no manuseio.

#### Antecedentes da Invenção

[002] Em toxicologia e farmacologia, a avaliação *in vivo* e *in vitro* do efeito de compostos químicos tem grande importância, pois pode possibilitar a estimativa ou previsão dos efeitos adversos induzidos em seres humanos (OLSON, et al., *Reg Tox Regl.* 32: 56-67, 2000). A busca na utilização de peixes como modelos experimentais em pesquisas tem aumentado devido a manutenção dos mesmos ser de baixo custo, quando comparados com os custos para animais experimentais mais tradicionais, como roedores. Diversos trabalhos na área de toxicologia têm utilizado a espécie *Danio rerio* como organismo teste como Bluhm et al. (*Sci Tot Environ.* 566–567: 786–795, 2016) e Acosta et al. (*Comp Bioch Phys.*

185–186:122–130, 2016), devido as suas similaridades genéticas com os humanos. A predação dos ovos é um problema para a manutenção dos animais ovíparos em laboratório, os dispositivos existentes tentam suprir esta necessidade nos biotérios de peixes, porém ainda apresentam um sistema de coleta onde é necessário manusear os animais e alterar a disposição dos sistemas de reprodução para realizar a coleta dos ovos, o que pode induzir estresse e prejudicar os experimentos científicos realizados. Diante do exposto, a presente patente de modelo de utilidade propõe um produto que apresenta um registro ao final do reservatório de reprodução que permite a coleta dos ovos de forma rápida e eficaz, redirecionando os ovos para outro reservatório, excluindo a necessidade de modificação do sistema e manuseio dos animais, garantindo um melhor bem-estar dos peixes.

[003] O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe tropical teleósteo (3 – 4 cm), ovíparo ornamental, apresenta listras dispostas horizontalmente em seu corpo sendo muito apreciado por aquarofilistas e também é um importante organismo cujo sequenciamento do genoma completo está disponível (HOWE et al., *Nature*. 496(7446): 498-503, 2013) e é considerado um organismo modelo para pesquisa (BERGHMANS et al., *Biotech*. 39(2): 227-37, 2005). São comuns em análises voltadas para a biologia do desenvolvimento, principalmente por apresentarem ovos não aderentes e transparentes (característica importante para a utilização da espécie como modelo) o que permite um detalhamento anatômico apurado (SPIRITA e AHILA, *Eur JBBB*. 3(6): 06-11, 2015).

[004] O *zebrafish*, em condições de biotério, costuma atingir a maturidade sexual entre 3 e 6 meses após a fertilização, podendo variar de acordo com as condições ambientais, incluindo densidade populacional, temperatura e disponibilidade de alimentos. Devido a tais variações, um tamanho de aproximadamente 23 mm corresponde à maturidade reprodutiva da espécie. A sua facilidade de manutenção e reprodução e os métodos laboratoriais para sua criação, já estão bem estabelecidos (SCHNEIDER, et al., *Rev HCPA*. 29:2, 2009).

[005] Sua desova é feita por dispersão dos ovos, seguida pela dispersão do esperma do macho, dando origem aos ovos fecundados, porém os adultos em condições normais apresentam o hábito de alimentar-se dos ovos, levando a uma baixa taxa de sobrevivência dos peixes, pois não acontece cuidado com os embriões por parte dos animais adultos. Ainda, animais utilizados em testes toxicológicos precisam ser expostos o quanto antes as

substâncias químicas, porém, uma série de processos que já estão estabelecidos para *Danio rerio*, devem ser realizados antes da exposição dos mesmos, como a lavagem e seleção dos ovos para formação de grupos experimentais, todo este processo demanda um tempo que pode ser crucial para os resultados. Atualmente não existem sistemas que possibilitem a retirada dos ovos sem que ocorra o manuseio dos animais ou desmonte ou faça um desacoplamento do sistema. O fato de ocorrer interação do pesquisador com os animais adultos, pode induzir níveis de estresse nos animais interferindo nos resultados da pesquisa ou na quantidade de ovos gerados, principalmente em testes toxicológicos.

[006] Em biotério, o processo de reprodução ocorre em aquários, onde no fundo é acondicionado esferas de vidro para que os ovos e as larvas tenham proteção e não sejam preadas pelos animais adultos. A desvantagem desse sistema é que as esferas por serem pesadas podem lesionar os animais, além do manuseio dos animais adultos e ovos, o que pode aumentar a mortalidade. Outra alternativa utilizada em biotérios, é a utilização de uma rede no fundo do aquário. Pelo fato do constante manuseio dos animais para a retirada dos ovos, é comum que os adultos passem para o fundo da rede comendo os ovos, ou fiquem presos na mesma e que pode aumentar a mortalidade do grupo e gerar estresse entre os animais.

[007] Na literatura são citados documentos de patente contendo sistemas coletores de ovos como descrito abaixo.

[008] A patente CN 203105342 U (2013) apresenta a descrição de uma escotilha para desova de *zebrafish*, contendo um aquário com subdivisão vertical (placa que separa machos de fêmeas) e divisão horizontal (triagem dos ovos), além de cobertura acoplada que fecha uma parte superior do aquário, mantendo a parte central aberta. Esta invenção não utiliza dispositivo para retirada dos ovos, sendo necessária a retirada dos componentes do dispositivo para coleta e conseqüentemente manuseio dos animais induzindo estresse nos mesmos.

[009] A patente CN 202019632 U (2011) descreve um sistema de caixas de coletas de ovos de *zebrafish*, apresentando um aquário exterior e um aquário interior com fundo modificado com material de malha (furos triangulares), sendo estes de encaixe perfeito nas bordas e o espaço entre o fundo do aquário exterior até a rede ou malha é o local de armazenamento dos ovos. Este documento de patente, difere da presente invenção por que não existe dispositivo para retirada dos ovos da área de armazenamento e é necessário a

retirada do aquário interno (manuseio dos animais) além de conter uma desvantagem já descrita pelo autor, onde alguns ovos ficaram presos nas bordas do aquário interno onde estava disposta a rede de separação.

[010] A literatura também apresenta documentos de patente para peixes vivíparos como PI 8203297-1 A2 (1982), que descreve um sistema coletor de alevinos para peixes. Este documento difere da presente invenção, pois o mesmo apresenta um sistema onde os alevinos podem se refugiar, não se tratando de um sistema coletor de ovos. Estes alevinos são capazes de se locomover em defesa a predação exercida por adultos, procurando refúgios.

[011] Diante do exposto, não foram encontrados no estado da técnica, elementos que compõem o presente pedido de patente de modelo de utilidade, portanto, a mesma se apresenta como nova frente ao estado da técnica.

#### Descrição da Invenção

[012] A presente patente de modelo de utilidade propõe um produto inovador formado por um reservatório com subdivisão vertical para separação por sexo antes da cópula e separador onde os ovos fecundados são retirados do sistema de reprodução rapidamente através do acionamento de um registro acoplado ao espaço de deposição de ovos (Figura 01). Onde os mesmos podem ser redirecionados para qualquer outro reservatório a escolha do usuário, reduzindo o tempo de coleta e excluindo a necessidade de manuseio dos animais.

[013] Diante da problemática exibida acima, com o intuito de solucioná-la foi desenvolvida na presente patente de modelo de utilidade um sistema de reprodução com coletor de ovos como descrito nas figuras abaixo:

[014] Figura 01 representa uma vista completa de todo o sistema de reprodução com coletor de ovos onde está presente o reservatório (1), a área de deposição de ovos (2), a área de cópula (3), a rede com hastes de apoio (4), os encaixes (5), a placa divisória (6), a tampa (7), o encaixe para suporte (8), o suporte (9) e o registro (10).

[015] Figura 02 representa de forma detalhada o sistema de rede com hastes de apoio (4) onde está presente a rede (11) as hastes (12) e as alças de apoio das hastes (13).

[016] Figura 03 representa a tampa (14) do reservatório (1) com abertura central revestida por uma rede (15).

[017] A Figura 1 apresenta a descrição do dispositivo onde, o reservatório (1) que pode ser construído com material plástico, preferencialmente acrílico, ou vidro, sem arestas, com fundo afunilado, que permite que os ovos não fiquem depositados em local inapropriado, após a passagem pela rede disposta em seu interior (4), constituída por material plástico ou aço, estando rente as paredes do reservatório (1). O reservatório subdivide-se em duas áreas que compreende a área de deposição de ovos (2) disposta na parte inferior afunilada do reservatório (1) e a área de cópula (3), na parte superior do reservatório (1). Onde esta última, apresenta uma placa divisória composta por material plástico acrílico ou vidro (6) que fica inserida em um encaixe (5) paralelamente, o que permite o acoplamento e desacoplamento desta placa divisória (6) quando necessário separando os animais machos das fêmeas. Esta separação é importante para aumentar a taxa de sucesso de ovoposição (WESTERFIELD, *UO Press Eu.* 4:1-200, 2000).

[018] No fundo afunilado do reservatório (1) está o dispositivo (Figura 1) que permite a coleta dos ovos que compreende um registro (10), para a saída dos ovos em qualquer recipiente escolhido pelo usuário. Os embriões são organismos sesseis e não apresentam resistência ao fluxo, sendo assim os ovos irão se depositar próximos a saída do dispositivo devido ao seu formato anatômico e da própria ação gravitacional, sendo coletados rapidamente juntamente com um pouco de água do próprio reservatório através da vazão exercida pelo acionamento do registro (10).

[019] Há um suporte (9) que oferece apoio a toda estrutura, mantendo o registro (10) afastado da base do suporte, para que o sistema seja disposto em qualquer superfície plana, facilitando a colocação de recipientes abaixo do registro (10).

[020] A Figura 2 apresenta a descrição da rede com hastes de apoio (4) sendo este o dispositivo que separa os peixes adultos dos ovos, com ganchos (13) nas extremidades das hastes (12) que trazem estabilidade na disposição da rede (11) dentro do reservatório (1).

[021] Ainda, o reservatório (1) também apresenta uma tampa (7) com uma abertura central (Figura 3) coberta por tela (15) para facilitar a respiração dos animais, ou a inserção de mangueira de aeração ou, ainda, a inserção de um termostato para controle da

temperatura. A tampa (7) também possui encaixe para suporte (8) aderidas em cada face externa do reservatório (1) permitindo o apoio do sistema no suporte (9).

#### Exemplo 1

[022] Neste exemplo, o presente modelo de utilidade foi utilizado para a reprodução da espécie *Danio rerio* em biotério para a coleta de ovos. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo CEUA/UFRPE nº 013/2016. Peixes adultos do sexo masculino/feminino com proporção 2:1 (WESTERFIELD, *UO Press Eu.* 4:1-200, 2000) foram alocados nos reservatórios de reprodução com coletor de ovos e mantidos em temperatura controlada de  $27,5 \pm 0,5$  °C e pH de  $7,5 \pm 0,5$ , com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro). Foram alimentados com ração extrusada comercial duas vezes ao dia. O sistema de reprodução com coletor de ovos em biotério apresentou-se de forma eficiente para esta espécie preferencialmente em temperaturas próximas aos 27 °C e níveis de pH 7,0. Foram utilizados 5 grupos a cada ciclo reprodutivo (7 dias), sendo a média da taxa de fecundidade dos animais ao longo das 4 semanas de testes de 221 ovos/semana por grupo, visto que nem todos os grupos reproduziram, sendo assim foi possível alcançar valores de aproximadamente 2.000 ovos/mês em escala de bancada.

## REIVINDICAÇÕES

1. “SISTEMA PARA REPRODUÇÃO DE PEIXES COM COLETOR DE OVOS” caracterizado por apresentar um reservatório com fundo afunilado (1) com registro acoplado (10), dividido por uma rede com hastes de apoio (4) separando os animais adultos dos ovos e também por placa divisória removível (5) separando machos de fêmeas contendo uma tampa (7) e suporte (9) como apoio estrutural.
2. “SISTEMA PARA REPRODUÇÃO DE PEIXES COM COLETOR DE OVOS” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela rede com hastes de apoio (4) (Figura 2) sendo a rede disposta na base da estrutura (11) e hastes (12) posicionadas nos cantos internos do reservatório (1), apresentando ganchos nas extremidades das hastes (13) facilitando a remoção ou acomodação da rede dentro do reservatório (1).
3. “SISTEMA PARA REPRODUÇÃO DE PEIXES COM COLETOR DE OVOS” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo registro (10) estar localizado ao final da base afunilada do reservatório (Figura 01) permitindo a passagem de ovos.
4. “SISTEMA PARA REPRODUÇÃO DE PEIXES COM COLETOR DE OVOS” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela tampa (14) apresentar uma abertura central revestida por rede (15).

## RESUMO

“SISTEMA PARA REPRODUÇÃO DE PEIXES COM COLETOR DE OVOS”. O presente modelo de utilidade trata de um reservatório (1) específico para cópula de peixes ovíparos acoplado a um dispositivo de coleta de ovos (10) com aplicação na área de biologia reprodutiva e toxicologia visando reduzir o tempo de coleta dos embriões de *Danio rerio* ou outras espécies de peixes, excluindo a necessidade de manejo nos animais. É apresentada uma configuração de reservatório sem arestas com fundo afunilado (1), apresentando em seu interior uma divisória de rede com hastes de apoio (4) que fica inserida no interior do reservatório (1) e suas hastes (13) dispostas nas bordas. Uma placa divisória (6) que fica inserida no encaixe da placa (5) aderidas a parede interna do reservatório (1) de ambos os lados (Figura 01), a placa divisória (6) separa provisoriamente a área de cópula (3). Uma tampa (7) com abertura central coberta por uma rede (15). Na parede externa do reservatório (1), estão os encaixes para o suporte (8) que servem de apoio para o sistema que se encontra disposto sob o suporte (9). Ao final do afunilamento do aquário, na área de deposição dos ovos (2) está disposto o registro (10) que permite a saída de água e dos ovos.

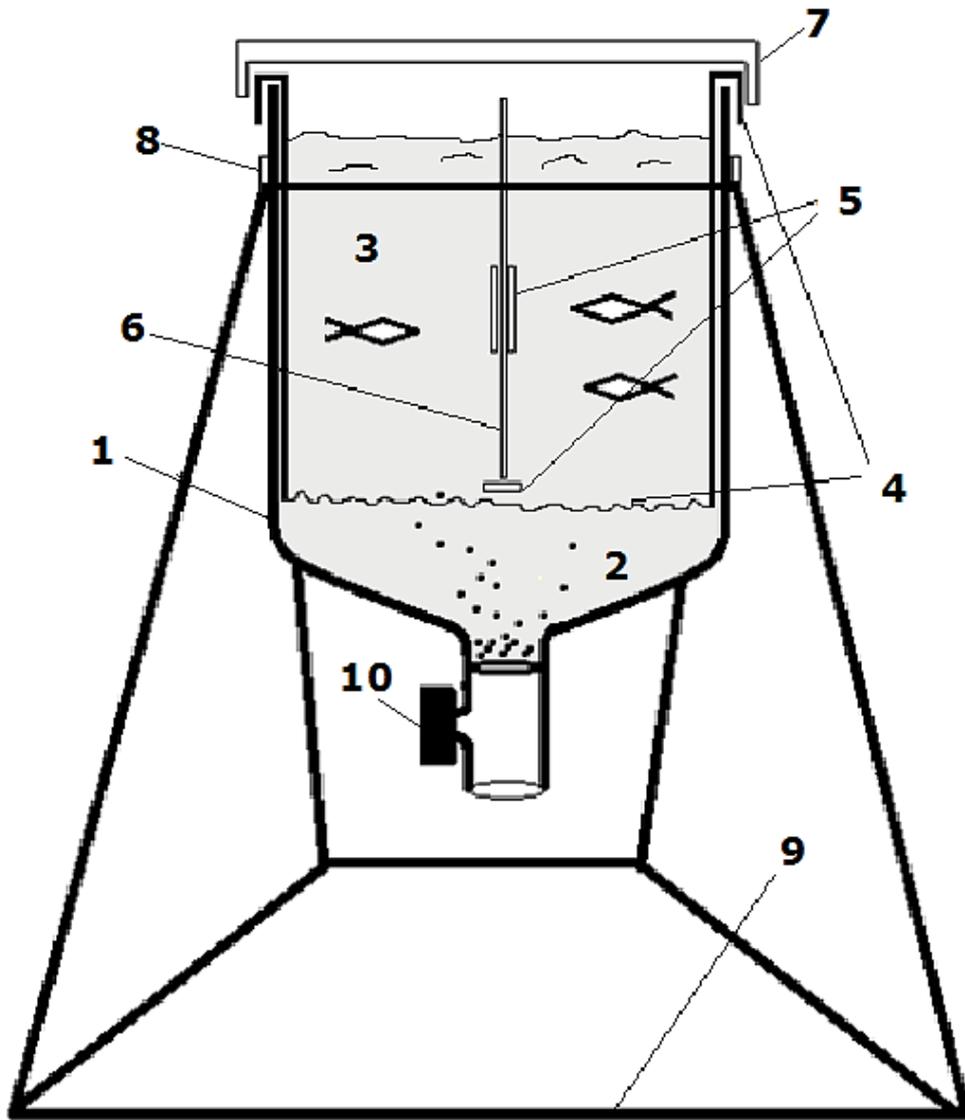


Figura 1

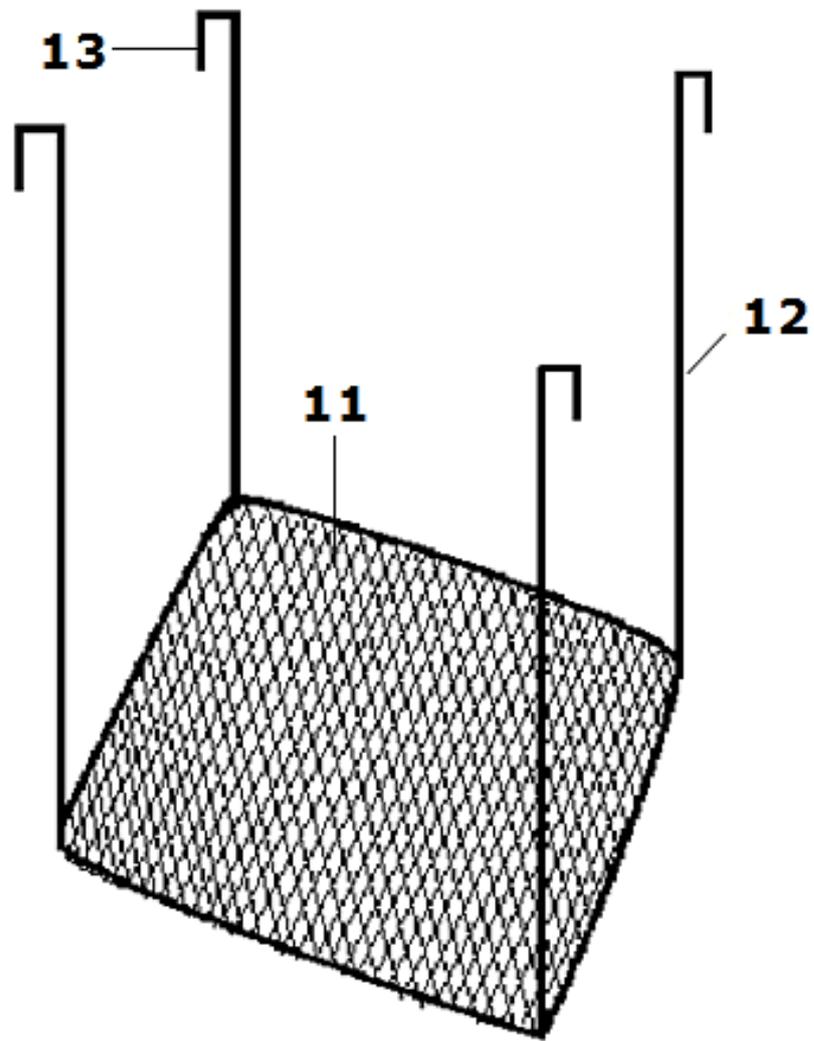


Figura 2

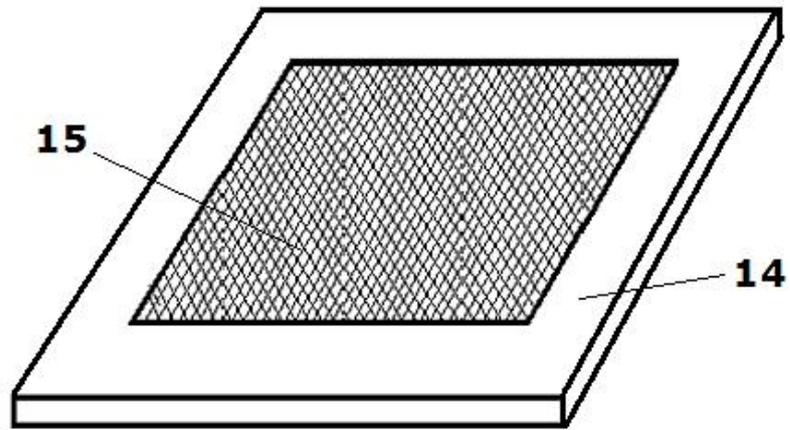


Figura 3

## 5. Conclusão

O presente estudo mostrou que os hormônios sexuais modificaram significativamente os parâmetros biológicos avaliados, como os efeitos teratogênicos e frequência cardíaca do *Danio rerio*, onde foi possível observar:

- Maior potencial de toxicidade dos hormônios livres ( $P_4$  e  $E_2$ ) quando comparados aos hormônios complexados a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD- $P_4$  e  $\beta$ -CD- $E_2$ ).
- Quanto a avaliação comportamental, os compostos  $P_4M$ ,  $E_2$  e  $E_2T$  obtiveram maior potencial de toxicidade por alterar a frequência de exibição dos comportamentos exibidos pelos animais expostos aos mesmos.
- Houve aumento da capacidade reprodutiva pela exposição dos animais ao medicamento comercial  $E_2T$ .
- Foi possível desenvolver um produto patenteado para uso em biotério na reprodução de *Danio rerio* evitando a predação dos ovos pelos peixes adultos e seu manuseio, reduzindo o tempo de coleta e o estresse dos animais.
- Devido ao fato de que a ciclodextrina pode alterar a toxicidade de hormônios, recomendamos que os complexos não sejam tratados como melhoramentos das moléculas livres e sim como novos produtos que devem ser avaliados individualmente em relação a sua toxicidade.

## 6. Anexos

### Anexo 1 – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais para a realização dos experimentos desta dissertação.



**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
*Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,*  
*Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE*

**Comissão de ética no uso de animais - CEUA**

#### **Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	013/2016
Número do processo	23082.000273//2016
aData de emissão da licença	15 de Fevereiro de 2016
Título do Projeto	Efeitos de hormônios sexuais complexados a ciclodextrinas como interferentes endócrinos na fisiologia, imunomodulação, histologia e comportamento de peixes.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena
Colaboradores	Marília Cordeiro Galvão da Silva; Valdemiro Amaro da Silva Júnior; Stephannie Caroline Barros Lucas da Silva; Thamiris Pinheiros Santos; Jadson Freitas da Silva; Danilo Martim Fonseca de Oliveira .
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe : Danio rerio 140; colossoma macropomum 70 (machos e fêmeas ) total 210 animais

## Anexo 2 – Trabalhos publicados

SILVA, M. C. G. ; SILVA, S. C. B. L. ; SANTOS, T. P. ; SOARES, P. R. L.; ANDRADE, A.L.C. ; CADENA, M. R. S. ; GONÇALVES CADENA, PABYTON . Impact evaluation caused by disponibility of free 17 $\beta$ -estradiol and complexed into cyclodextrin in the aquatic environment in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Article in press*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online), 2017.

ANDRADE, A.L.C. ; SOARES, P. R. L. ; SILVA, S. C. B. L. ; SILVA, M. C. G. ; SANTOS, T. P. ; CADENA, M. R. S. ; SOARES, P. C. ; CADENA, P. G. . Evaluation of the toxic effect of endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) in the acute and chronic toxicity tests with *Pomacea lineata* gastropod. *Comparative Biochemistry and Physiology. c. Toxicology & Pharmacology*, v. 197, p. 1-7, 2017.

SANTOS, B.D.; SILVA, M.C.G.; SANTOS, T.P.; SILVA, S.C.B.L.; CADENA, M.R.S.; CADENA, P. G. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online), v. 68, p. 387-396, 2016.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; SANTOS, T. P.; SILVA JUNIOR, V. A.; CADENA, P. G. Sistema para reprodução de peixes com coletor de ovos, 2016. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Modelo de Utilidade. Número do registro: BR20201601704. Data de depósito: 22/07/2016. Depositante/Titular: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, D. M. F.; SANTOS, T. P.; GOMES, S. S.; CADENA, P. G. Efeitos tóxicos do 17 $\beta$ estradiol no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* (zebrafish). In: XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX 2016). Curitiba. ECOTOX 2016.

SANTOS, T. P.; SILVA, M. C. G.; SILVA, S. C. B. L.; CADENA, P. G. Dispositivo portátil tipo túnel de natação para determinação da capacidade natatória em animais aquáticos, 2016. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201601703. Data de depósito: 22/07/2016. Depositante/Titular: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, A. R.; CADENA, P. G. Determinação da capacidade natatória de *Danio rerio* em equipamento portátil. In:

XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Foz do Iguaçu. FeSBE 2016.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; SANTOS, T. P.; CADENA, P. G. Progesterona como desregulador endócrino e seu efeito tóxico no desenvolvimento de *Danio rerio*. In: XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Foz do Iguaçu. FeSBE 2016.

SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SOARES, P. R. L.; SILVA, M. C. G.; ANDRADE, A. L. C.; CADENA, P. G. Tiroxina como disruptor endócrino e seus efeitos no comportamento e taxa metabólica de *Colossoma macropomum*. In: XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX 2016). Curitiba. ECOTOX 2016.

SANTOS, A. R.; SOUZA, E. Q.; SILVA, J. F.; SILVA, M. C. G.; FERREIRA, R. C. B.; CADENA, P. G. Desenvolvimento de etograma comportamental de *Danio rerio*. In: XVI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife-PE. JEPEX 2016.

SOUZA, E. Q.; FERREIRA, R. C. B.; OLIVEIRA, E. G. S.; SILVA, J. F.; SILVA, S. C. B. L.; SILVA, M. C. G.; CADENA, P. G. Indução de hiperglicemia em peixe zebra (*Danio rerio*) e seu efeito sobre o comportamento animal. In: XVI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife-PE. JEPEX 2016.

SILVA, S. C. B. L.; ANDRADE, A. L. C.; SOARES, P. R. L.; SANTOS, T. P.; SILVA, M. C. G.; CADENA, P. G. Avaliação do efeito de interferentes endócrinos sob a fisiologia de *Pomacea bridgesi* e sua utilização como organismo teste em ecotoxicologia. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife-PE. JEPEX 2015.

ANDRADE, A. L. C.; SILVA, S. C. B. L.; SOARES, P. R. L.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, T. P.; CADENA, P. G. Effect of salinity on heart rate of *Pomacea lineata* neonates as a noninvasive method for animal physiology study In: L Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFis 2015.

SANTOS, T. P.; OLIVEIRA, E. G. S.; SOARES, P. R. L.; SILVA, S. C. B. L.; ANDRADE, A. L. C.; SILVA, M. C. G.; CADENA, M. R. S.; CADENA, P. G. Thyroxine effect as endocrine disruptor in behavior of tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: L Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFis 2015.

## Anexo 3

Artigo aceito para publicação no periódico Arquivos Brasileiros de Medicina  
Veterinária e Zootecnia (IP 0.1239, Qualis A2)

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

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

**Resumo**

Foram avaliados os efeitos tóxicos do hormônio  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) livre e complexado a  $\beta$ -ciclodextrina (CD) sobre o comportamento e 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  $E_2$  (10 ng/L) livre e complexado a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD: $E_2$ ) por 90 dias. Foram avaliados o comportamento pelo método de varredura instantânea, o consumo de ração, o ganho de peso e mortalidade em diferentes intervalos. Os alevinos e 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  $\beta$ -CD: $E_2$  apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na exibição dos comportamentos agressivos como Afastar, Ataque Caudal, Confronto Prolongado, Perseguição, Fuga e menor mortalidade comparado ao grupo exposto ao  $E_2$  livre e controle. Pode-se concluir que a complexação do  $E_2$  com a  $\beta$ -CD alterou a toxicidade do  $E_2$ , pois promoveu um aumento na frequência de exibição dos comportamentos agressivos, e interferiu na mortalidade dos animais.

*Palavras-Chaves:* Comportamento animal, Etograma, Complexo de inclusão, Sobrevivência.

**Abstract**

32 Toxic effects of free and complexed 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) hormone into  $\beta$ -cyclodextrin  
33 (CD) on the behavior and physiology of tilapia (*Oreochromis niloticus*) were evaluated.  
34 The fish were observed for 30 days in two stages of development (fingerling and  
35 juvenile) by the *ad libitum* method to make an ethogram. After this, juveniles were  
36 divided into three groups: control and exposed to free E<sub>2</sub> (10 ng/L) and complexed into  
37  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD:E<sub>2</sub>) for 90 days. It was evaluated the behavior by scan sampling  
38 method, feed intake, body mass and mortality at different intervals. The fingerlings and  
39 juveniles showed behavioral patterns with different display frequencies ( $p < 0.05$ ) for  
40 events: Move Away ( $4.7 \pm 1.3$  and  $3.6 \pm 0.6\%$ ) and Waving Repulsion ( $2.3 \pm 0.9$  and  
41  $1.3 \pm 1.0\%$ ). The juveniles exposed to  $\beta$ -CD:E<sub>2</sub> complex showed a significant increase  
42 ( $p < 0.05$ ) in the frequency of display of aggressive behaviors as Move Away, Caudal  
43 Attack, Clash Extended, Chase, Escape and decrease of mortality when compared to  
44 group exposed to free E<sub>2</sub> and control. It can be concluded that complexation of E<sub>2</sub> into  
45  $\beta$ -CD modified E<sub>2</sub> toxicity, because promoted an increase in the frequency of display of  
46 aggressive behaviors and it affected the mortality of animals.

47 *Keywords:* Animal behavior, Ethogram, Inclusion complex, Mortality.

## 48 **1. Introdução**

49 Devido às características químicas dos hormônios esteroides como a  
50 hidrofobicidade, a indústria farmacêutica vem utilizando substâncias químicas para  
51 superar esta limitação, sendo possível complexar estes hormônios à ciclodextrinas  
52 (CDs) (Oishi *et al.*, 2008). CDs são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por um  
53 número variável de unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4), são  
54 estruturas tronco-cônica e se caracterizam por possuírem cavidade de natureza apolar,  
55 que contrasta com o exterior hidrofílico (Del Valle, 2004; Brewster e Loftsson, 2007).  
56 Devido a isto, podem formar complexos de inclusão hospedando moléculas  
57 hidrofóbicas em seu interior. São utilizadas com o objetivo de melhorar as  
58 características farmacocinéticas de substâncias, aumentando a biodisponibilidade,  
59 estabilidade e diminuindo a volatilidade (Brewster e Loftsson, 2007). Seus efeitos  
60 tóxicos são conhecidos em humanos devido a sua ampla utilização na farmacêutica, na  
61 indústria alimentícia e cosméticos onde apresenta nefrotoxicidade por via parenteral,  
62 mas não foram relatados efeitos tóxicos por via oral (Del Valle, 2004; Brewster e  
63 Loftsson, 2007). Porém os efeitos destes complexos de inclusão como poluente

64 ambiental e seus efeitos em animais são pouco descritos na literatura. Adicionalmente,  
65 hormônios esteroides quando complexados a CDs podem se apresentar como  
66 disruptores endócrinos (DEs). Os DEs são persistentes e passíveis de sofrerem  
67 biomagnificação, principalmente em animais dulciaquícolas (Wu *et al.*, 2016), que são  
68 sensíveis a baixas concentrações em níveis subletais. Nestes casos foram observadas  
69 principalmente alterações comportamentais e reprodutivas podendo levar a  
70 desequilíbrios populacionais em ambientes aquáticos (Santos *et al.*, 2016; Denslow e  
71 Sepúlveda, 2007). Isto destaca a necessidade de maiores estudos dos efeitos de  
72 toxicidade decorrente da disposição desses complexos de inclusão entre CDs e fármacos  
73 na biota aquática.

74 Contaminantes naturais e sintéticos presentes em concentrações na faixa de pg/L  
75 a ng/L apresentam um risco à saúde dos ecossistemas, pois existe uma carência na  
76 avaliação dos seus efeitos fisiológicos, conhecimento de suas fontes, comportamento no  
77 ambiente e níveis tóxicos de concentração (Fernandes *et al.*, 2011). Dentre estes  
78 contaminantes, os DEs têm despertado atenção científica por causa de sua distribuição  
79 generalizada e seus efeitos potencialmente nocivos para a saúde (Wu *et al.*, 2016). Estes  
80 são capazes de mimetizar os efeitos moleculares de hormônios endógenos ou causar  
81 desequilíbrio hormonal, por interferir com a sua síntese, secreção, transporte,  
82 metabolismo e excreção, conseqüentemente, a reprodução, desenvolvimento e  
83 comportamento de espécies animais (Denslow e Sepúlveda, 2007). Estrógenos como o  
84 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e suas  
85 funções reprodutivas, pois dele depende a formação dos ovários nas fêmeas (Guiguen et  
86 al., 2010). Este hormônio possui conformações reconhecidas pelos receptores e,  
87 portanto, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores,  
88 quando dispostos nos efluentes, como redução do tamanho das gônadas, feminização de  
89 peixes machos e problemas no desenvolvimento do sistema imune (Tilton et al. 2005,  
90 McLachlan et al., 2006, Seemann et al., 2015).

91 Anteriormente, nosso grupo (Santos *et al.*, 2016) estudou os efeitos de DEs  
92 presentes em contraceptivos orais combinados sobre o comportamento agressivo de  
93 *Betta splendens*. Agora, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do 17 $\beta$ -  
94 Estradiol livre e complexado a ciclodextrina sobre o comportamento e fisiologia de  
95 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Um peixe de ampla aceitação pelo mercado

96 consumidor com produção mundial em 2014 de quase 4 milhões de toneladas (FAO,  
97 2016), apresenta agressividade natural, sendo assim um bom modelo animal para avaliar  
98 alterações comportamentais provenientes da exposição ao 17 $\beta$ -estradiol livre e  
99 complexado a CDs.

## 100 **2. Material e métodos**

101 O estudo foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento  
102 Animal – LECA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. O 17 $\beta$ -  
103 Estradiol e a  $\beta$ -ciclodextrina (SIGMA, EUA) e os outros reagentes utilizados foram de  
104 grau analítico. As tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram obtidas da Estação de  
105 Aquicultura Continental Professor Johei Koike – Departamento de Pesca da UFRPE. Os  
106 protocolos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de  
107 Animais – CEUA/UFRPE licença 001/2014. No laboratório, os animais foram  
108 aclimatados por 15 dias, sendo acondicionados em aquários aerados, a temperatura  
109 ambiente (27 °C) sempre com densidade de 1 animal para aproximadamente 12 litros de  
110 água e ciclo de luz natural. *O. niloticus* foram alimentados *ad libitum* com ração  
111 comercial extrusada (45% de proteína bruta) uma vez ao dia com quantidade crescente  
112 de acordo com o crescimento do animal. Em relação aos parâmetros abióticos, o pH e o  
113 oxigênio dissolvido (OD) foram aferidos semanalmente com potenciômetro e medidor  
114 de OD portátil durante todos os experimentos. Foram utilizados kits comerciais da  
115 marca Alcon Labtest, para nitrito, amônia tóxica e amônia total.

116 Para a construção do etograma e análise comportamental comparativa, 14  
117 animais, sendo 7 alevinos (9,7  $\pm$  1,1 g, 3,8  $\pm$  0,2 cm) e 7 juvenis (38,0  $\pm$  1,3 g, 14,3  $\pm$   
118 0,6 cm) foram separados e alocados em aquários de 85 L cada. O etograma foi  
119 construído pelo método *ad libitum* (Altmann, 1974) por 30 dias, a uma distância pré-  
120 estabelecida (2,5 metros) de modo a não influenciar na exibição comportamental. Foram  
121 utilizados indivíduos em estágios de desenvolvimentos distintos (alevinos e juvenis)  
122 para que houvesse a possibilidade de comparação do padrão comportamental em  
123 diferentes estágios de desenvolvimento. A coleta dos dados comportamentais com o  
124 etograma foi realizada pelo método de *scan sampling* (Altmann, 1974) por 30 minutos  
125 com 1 minuto de observação e 1 minuto de intervalo.

126 Para os testes de exposição química, os animais foram submetidos a  
127 concentrações dos hormônios em teste de toxicidade crônica em sistema semi-estático

128 por 90 dias e divididos em 3 grupos de peixes juvenis alocados em aquários de 85 L  
129 com 7 animais cada, sendo 4 machos e 3 fêmeas por grupo, identificados através da  
130 sexagem manual, por meio do exame da papila urogenital (Ávila e Romagosa, 2005).  
131 Os grupos foram: controle (Grupo C) sem adição do hormônio, 17 $\beta$ -Estradiol (Grupo E)  
132 na concentração de 10 ng/L e a adição de solução aquosa do complexo de inclusão  $\beta$ -  
133 ciclodextrina – 17 $\beta$ -Estradiol ( $\beta$ -CD:E2) na proporção de 1:1 em mol/L mantendo a  
134 concentração de E2 em 10 ng/L (Grupo BE). A técnica de co-precipitação (Del Valle,  
135 2004; Oishi *et al.*, 2008) foi utilizada para formação dos complexos de inclusão entre  $\beta$ -  
136 CD e o hormônio E<sub>2</sub> em meio aquoso. A  $\beta$ -CD foi primeiramente solubilizada em água  
137 e o E<sub>2</sub> dissolvido em etanol (10%) com posterior evaporação do álcool. A solução de E<sub>2</sub>  
138 foi adicionada sob agitação à solução de CD para permitir a complexação dos mesmos.  
139 Os complexos de inclusão formados foram armazenados sob refrigeração (4 °C) para  
140 posterior uso. Houve renovação completa da água dos aquários semanalmente e  
141 reposição das concentrações hormonais utilizadas.

142 Durante os testes de exposição química com os animais, foram mensurados o  
143 comportamento animal conforme descrito anteriormente. Os dados comportamentais  
144 foram agrupados a cada 30 dias, somando 3 períodos de exposições distintos (0 a 30, 30  
145 a 60 e 60 a 90 dias). O consumo médio de ração foi avaliado diariamente conforme  
146 descrito por Zuanon *et al.*, (2009), após a determinação do tempo para a saciedade, os  
147 restos de ração foram removidos dos aquários para evitar contaminação. Para a  
148 avaliação do ganho de peso, foi mesurada a diferença entre o peso inicial e final dos  
149 animais. A mortalidade foi verificada diariamente. Os resultados foram expressos na  
150 forma de média e desvio padrão e comparados por análise de variância simples (*One*  
151 *Way ANOVA*), quando o resultado foi significativo, as médias foram comparadas pelo  
152 teste de Tukey, utilizando o *software* Origin Pro Academic 2015 (*Origin Lab.*  
153 Northampton, MA USA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p <$   
154 0,05.

### 155 **3. Resultados**

156 Para os parâmetros físico-químicos, a temperatura da água nos aquários não  
157 apresentou variação maior que 0,5 °C durante o experimento, o pH apresentou faixa  
158 entre 6,7 e 7,3. Para o OD, os valores sempre foram superiores a 9 mg/L. Para o nitrito,

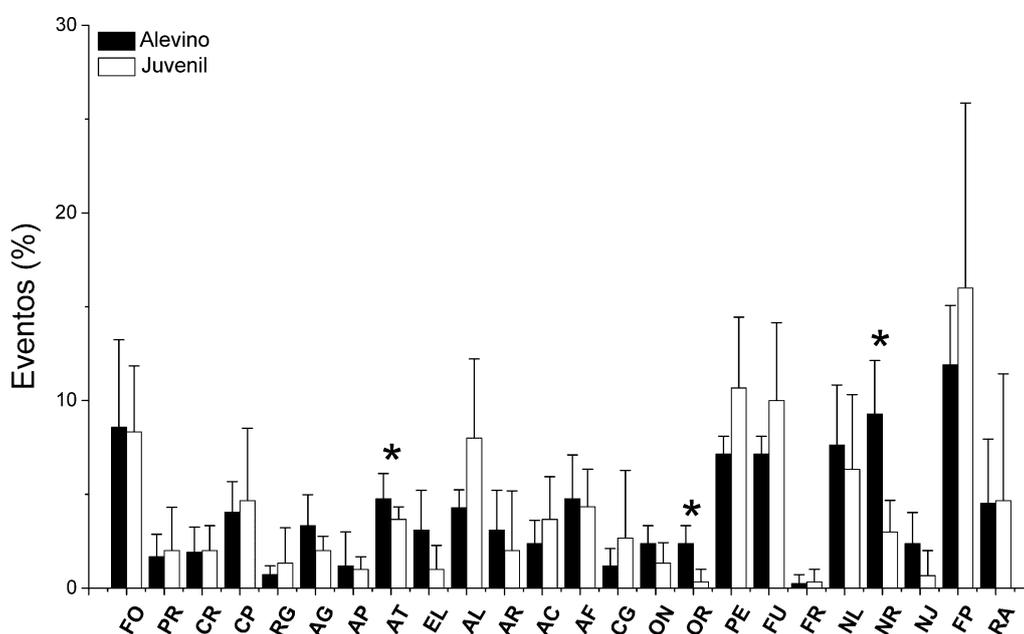
159 foram encontrados valores de 0,25 mg/L e não foram observados valores de nitrato.  
 160 Para amônia tóxica, foram encontrados valores inferiores a 1 mg/L.

161 Dentre os dados obtidos a partir do método *ad libitum* (Altmann, 1974) para a  
 162 elaboração do etograma, foram identificados 24 comportamentos, agrupados nas  
 163 Categorias: *Alimentação*, *Locomoção*, *Social* e *Resposta ao Estresse*, que podem ser  
 164 observados na Tab. 1.

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

<i>Evento</i>	<i>Sigla</i>	<i>Descrição</i>
<i>Categoria Alimentação</i>		
Forragear	<i>FO</i>	O animal posiciona-se quase de maneira vertical próximo ao substrato procurando alimento.
Procurar	<i>PR</i>	O animal se mantém próximo à lâmina d'água e nada obliquamente procurando alimento
Capturar Rápido	<i>CR</i>	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	<i>CP</i>	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	<i>RG</i>	O animal depois de saciado, ingere o alimento, mastiga e lança as partículas novamente na água pela boca.
<i>Categoria Social</i>		
Afugentar	<i>AG</i>	O animal nada em direção ao oponente rapidamente podendo ou não haver contato provocando o afastamento do outro.
Afugentar prolongado	<i>AP</i>	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	<i>AT</i>	O animal (1) se afasta com um movimento curto do oponente (2) após sofrer um ataque.
Exibição lateral	<i>EL</i>	O peixe se aproxima lateralmente do outro, abre a boca, mas não ocorre contato físico com o oponente. Este comportamento pode culminar em um ataque.
Ataque lateral	<i>AL</i>	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	<i>AR</i>	O peixe nada próximo à lâmina d'água e desce rapidamente fazendo um ataque ao oponente.
Ataque caudal	<i>AC</i>	O animal nada próximo ao oponente, fechando a sua boca quando esta entra em contato com a nadadeira caudal do adversário.
Ataque frontal	<i>AF</i>	Dois peixes sobrepõem suas mandíbulas e um deles empurra o outro, ou ambos se empurram mutuamente em movimentos rápidos.
Confronto prolongado	<i>CG</i>	Dois animais realizam ataques mútuos com movimento rotatório.
Ondulação	<i>ON</i>	O peixe ondula o corpo no sentido anteroposterior quando está próximo ao oponente.
Ondulação de repulsão	<i>OR</i>	O peixe agredido exhibe ondulações rápidas e intensas com o corpo que levam à repulsão do peixe agressor.
Perseguição	<i>PE</i>	O peixe segue o oponente enquanto este foge. Podendo culminar em ataque do peixe agressor.
Fuga	<i>FU</i>	O peixe se afasta do oponente que o persegue ou ataca.
Fuga prolongada	<i>FR</i>	O animal se afasta do oponente ficando restrito a um pequeno espaço por longo período de tempo.
<i>Categoria Locomoção</i>		
Nadar lento	<i>NL</i>	O animal movimenta a nadadeira caudal lentamente de modo que seu deslocamento ocorra lentamente.
Nadar rápido	<i>NR</i>	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	<i>NJ</i>	Três ou mais peixes nadam na mesma direção apresentando comportamento de cardume, podendo permanecer assim por vários minutos.
Ficar parado	<i>FP</i>	O peixe permanece parado.
<i>Categoria Resposta ao Estresse</i>		
Respiração aérea	<i>RA</i>	O peixe utiliza da respiração aérea mesmo sob condições de aeração.

166 Na Fig. 1 é possível observar os eventos comportamentais dos alevinos (A) e  
 167 juvenis (J) de *O. niloticus* onde, na categoria Social, os mesmos comportamentos foram  
 168 apresentados pelos dois grupos, mas com frequências de exibição diferentes ( $p < 0,05$ )  
 169 para os eventos: *Afastar* (A  $4,7 \pm 1,3$  e J  $3,6 \pm 0,6\%$ ) e *Ondulação de Repulsão* (A  $2,3 \pm$   
 170  $0,9$  e J  $1,3 \pm 1,0\%$ ). Os alevinos apresentaram maior frequência de exibição nestes  
 171 comportamentos. Na categoria Locomoção, o comportamento *Nadar Rápido* (A  $9,2 \pm$   
 172  $2,8$  e J  $3,0 \pm 1,6\%$ ) foi mais observado nos alevinos em comparação aos juvenis. Em  
 173 relação às outras categorias de *Alimentação* e *Resposta ao Estresse* não houve diferença  
 174 significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos estudados.



175

176 Figura 1. Eventos comportamentais exibidos por *O. niloticus* alevinos e juvenis. Siglas:  
 177 FO - Forragear; PR - Procurar; CR - Capturar Rápido; CP - Capturar Prolongado; RG -  
 178 Regurgitar; AG - Afugentar; AP - Afugentar Prolongado; AT - Afastar; EL - Exibição  
 179 Lateral; AL - Ataque Lateral; AR - Ataque Rápido; AC - Ataque Caudal; AF - Ataque  
 180 Frontal; CG - Confronto Prolongado; ON - Ondulação; OR - Ondulação de Repulsão;  
 181 PE - Perseguição; FU - Fuga; FR - Fuga Prolongada; NL - Nadar Lento; NR - Nadar  
 182 Rápido; NJ - Nadar Juntos; FP - Ficar Parado; RA - Respiração Aérea. \*Médias com  
 183 diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

184

185 Na Tab. 2a são observados os resultados das frequências de exibição dos  
 186 comportamentos de juvenis de *O. niloticus* sob exposição ao  $E_2$  e ao  $\beta$ -CD: $E_2$  e grupo  
 controle no intervalo 0 a 30 dias. Na categoria *Alimentação* foi observado um aumento

187 (Tab. 2a) significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de exibição do comportamento *Procurar*  
188 no grupo BE em relação ao grupo E. Na categoria Social, houve um aumento  
189 significativo ( $p < 0,05$ ) na exibição do comportamento *Afugentar Prolongado* no grupo  
190 E em relação aos grupos BE e C. Ainda, houve um aumento (Tab. 2a) significativo ( $p <$   
191  $0,05$ ) na frequência de exibição dos comportamentos agressivos *Afastar*, *Ondulação*,  
192 *Perseguição*, *Fuga*, *Fuga Prolongada* no grupo BE, este último comportamento, apenas  
193 observado neste grupo. Para a categoria Locomoção, também foi observado um  
194 aumento (Tab. 2a) significativo ( $p > 0,05$ ) da exibição do comportamento *Nadar Rápido*  
195 no grupo BE. Na Tab. 2b é possível observar os comportamentos exibidos pelos peixes  
196 sob exposição ao  $E_2$ ,  $\beta$ -CD: $E_2$  e grupo controle no intervalo 30 a 60 dias. Na categoria  
197 *Alimentação* foi observado um aumento (Tab. 2b) significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência  
198 de exibição do comportamento *Procurar* no grupo BE em relação aos grupos E e C.  
199 Para a categoria Social, foram exibidos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para o  
200 grupo BE nos comportamentos: *Afastar*, *Exibição Lateral*, *Ataque Caudal*, *Ataque*  
201 *Frontal*, *Confronto Prolongado*, *Ondulação*, *Ondulação de repulsão*, *Perseguição*,  
202 *Fuga* e *Fuga Prolongada*. Na categoria *Locomoção*, o grupo BE apresentou um  
203 aumento ( $p < 0,05$ ) na exibição dos comportamentos *Nadar Lento* e *Nadar Rápido* (Tab.  
204 2b).

205 Na Tab. 2c são observados os resultados da exibição comportamental dos  
206 juvenis no intervalo de 60 dias a 90 dias de experimento. Não houveram eventos  
207 significativos ( $p > 0,05$ ) nas categorias Alimentação e Resposta ao Estresse. Foram  
208 observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em alguns comportamentos das  
209 categorias *Social* e *Locomoção* com aumento de frequência (Tab. 2c) para o grupo BE  
210 em *Ataque Frontal*, *Nadar Lento* e *Nadar Rápido*. Ainda, os animais do grupo BE não  
211 apresentaram a exibição do comportamento *Afastar* ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente foi  
212 observado o escurecimento corporal dos animais submissos durante os experimentos. O  
213 consumo médio de ração entre os grupos não apresentou diferença significativa ( $p >$   
214  $0,05$ ), pois todo alimento foi consumido. Para avaliação do ganho de peso, também não  
215 foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre a comparação do Grupo C  
216 ( $28,9 \pm 9,3$  g e  $42,5 \pm 10,5$  g), Grupo E ( $25,0 \pm 6,4$  g e  $34,6 \pm 12,0$  g) e Grupo BE ( $31,0$   
217  $\pm 9,0$  g e  $39,4 \pm 8,2$  g) no intervalo 0 e 90 dias. Esta diferença não significativa ( $p >$   
218  $0,05$ ) entre a morfometria nos Grupos C ( $12,1 \pm 1,8$  e  $13,4 \pm 1,4$ ), E ( $10,9 \pm 0,8$  e  $12,2 \pm$

- 219 1,7) e BE ( $12,5 \pm 1,7$  e  $13,1 \pm 1,8$ ) também foi observada no mesmo intervalo de tempo.
- 220 Em relação à taxa de mortalidade foram encontrados os valores de C 42,9%, E 28,6% e
- 221 BE 14,3%, respectivamente após 90 dias.

222 Tabela 2. Eventos comportamentais de *O. niloticus* expostos a hormônios livres e complexados a ciclodextrina em 30 (A), 60 (B) e 90 (C)  
 223 dias de exposição. Para os eventos exibidos: FO - Forragear; PR - Procurar; CR - Capturar Rápido; CP - Capturar Prolongado; RG -  
 224 Regurgitar; AG - Afugentar; AP - Afugentar Prolongado; AT - Afastar; EL - Exibição Lateral; AL - Ataque Lateral; AR - Ataque Rápido;  
 225 AC - Ataque Caudal; AF - Ataque Frontal; CG - Confronto Prolongado; ON - Ondulação; OR - Ondulação de Repulsão; PE - Perseguição;  
 226 FU - Fuga; FR - Fuga Prolongada; NL - Nadar Lento; NR - Nadar Rápido; NJ - Nadar Juntos; FP - Ficar Parado; RA - Respiração Aérea.  
 227

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 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,9 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,5	2,2 ± 1,9	2,4 ± 0,5
PR	0,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,9 <sup>ac</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
CR	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	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 <sup>a</sup>	6,2 ± 3,9 <sup>b</sup>	2,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	3,8 ± 3,1 <sup>a</sup>	7,0 ± 2,6 <sup>b</sup>	4,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,8	4,4 ± 3,1	5,8 ± 0,4
AT	1,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	2,2 ± 1,7 <sup>ab</sup>	3,2 ± 2,4 <sup>b</sup>	0,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	0,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	3,1 ± 2,6 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
EL	0,8 ± 0,9	0,6 ± 0,6	1,2 ± 1,2	0,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,0 ± 1,9 <sup>b</sup>	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 <sup>a</sup>	3,3 ± 2,5 <sup>ab</sup>	5,0 ± 2,3 <sup>b</sup>	1,4 ± 2,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	4,0 ± 1,8 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,4	2,6 ± 2,8	2,6 ± 1,1
AF	3,4 ± 4,7 <sup>a</sup>	2,2 ± 1,6 <sup>ab</sup>	7,9 ± 3,2 <sup>b</sup>	2,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	7,3 ± 2,9 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	1,4 ± 1,5 <sup>a</sup>	5,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
CG	0,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,4 ± 2,4 <sup>ab</sup>	3,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,0 ± 1,8 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,8	0,8 ± 1,0	2,0 ± 1,0
ON	1,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,3 ± 1,3 <sup>ab</sup>	2,7 ± 1,8 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,5 ± 1,0 <sup>ab</sup>	2,2 ± 1,2 <sup>ac</sup>	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 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,8
PE	9,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 3,2 <sup>ab</sup>	11,5 ± 3,6 <sup>ac</sup>	5,7 ± 2,4 <sup>a</sup>	5,3 ± 2,2 <sup>a</sup>	9,5 ± 3,8 <sup>b</sup>	4,6 ± 1,1	6,8 ± 2,1	5,0 ± 1,4
FU	8,9 ± 2,1 <sup>a</sup>	7,3 ± 2,9 <sup>ab</sup>	11,6 ± 3,5 <sup>ac</sup>	5,7 ± 2,4 <sup>a</sup>	5,3 ± 2,2 <sup>a</sup>	9,5 ± 3,8 <sup>b</sup>	4,6 ± 1,1	6,8 ± 2,1	5,2 ± 1,6
FR	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	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 <sup>a</sup>	3,6 ± 1,5 <sup>a</sup>	8,0 ± 1,8 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	7,0 ± 3,0 <sup>b</sup>
NR	2,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	5,3 ± 3,0 <sup>b</sup>	1,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 2,5 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,5 <sup>ab</sup>	3,6 ± 2,8 <sup>ac</sup>
NJ	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
FP	8,1 ± 4,4 <sup>a</sup>	23,6 ± 7,4 <sup>b</sup>	12,3 ± 7,3 <sup>a</sup>	15,3 ± 8,1	25,4 ± 14,1	17,3 ± 7,4	20,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,4 ± 3,0 <sup>b</sup>	25,4 ± 2,8 <sup>c</sup>
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

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

#### 229 4. Discussão

230 Os comportamentos observados em *O. niloticus* são característicos do gênero,  
231 devido à semelhança aos observados em outros ciclídeos como, *Geophagus*  
232 *surinamensis* (Acará-corró), *Astronotus ocellatos* (Apaiari) e *Pterophyllum scalare*  
233 (Acará-Bandeira) (Carvalho, 2009). Por ser uma espécie territorialista, *O. niloticus*  
234 apresentou uma hierarquia de dominância e submissão estabelecida por confrontos entre  
235 os indivíduos. Tais comportamentos agonísticos foram decorrentes de agrupamentos  
236 sociais, onde foi observado uma hierarquia de dominância e submissão em que os  
237 animais maiores geralmente são dominantes e os menores submissos (Merighe *et al.*,  
238 2004). Em relação a comparação dos comportamentos exibidos entre alevinos e juvenis,  
239 com base no etograma desenvolvido, foi observada uma maior frequência de  
240 comportamentos ativos nos alevinos, o que pode estar relacionado a maior atividade  
241 locomotora destes. Larvas e alevinos de peixes diurnos (como a tilápia) apresentam  
242 maior atividade metabólica nessas fases de desenvolvimento (Vera *et al.*, 2009) o que  
243 poderia justificar esta diferença observada no nosso estudo.

244 Em relação aos estudos de exposição química, os parâmetros abióticos foram  
245 mensurados para comprovar que as modificações nos parâmetros biológicos analisados  
246 foram decorrentes da exposição ao estradiol livre ( $E_2$ ) e complexado a ciclodextrina ( $\beta$ -  
247 CD: $E_2$ ) e não decorrente de variações nos parâmetros físico-químicos da água. Estes  
248 resultados obtidos, de acordo com Kubitzka (2000), estão na faixa ideal de conforto para  
249 a espécie. Diante disto, as alterações comportamentais exibidas pelos animais estão  
250 relacionadas a exposição química aos hormônios. Os resultados produzidos no nosso  
251 estudo demonstraram que o  $E_2$  livre assim como  $\beta$ -CD: $E_2$ , interferiram no  
252 comportamento animal, alterando a exibição dos comportamentos ao longo do tempo  
253 nos animais juvenis de *O. niloticus*. Em relação ao efeito do  $E_2$  complexado a  $\beta$ -CD, foi  
254 observado um aumento na exibição de comportamentos agressivos (Tab. 2) no grupo  
255 BE comparado aos grupos E e C, isto pode provocar maior estresse entre os indivíduos.  
256 Estas respostas biológicas ao estresse, provocada por poluentes, podem ser utilizadas  
257 para identificar sinais iniciais de danos aos peixes (Lupi *et al.*, 2007). De acordo com  
258 Brewster e Loftsson (2007), as CDs apresentam baixa toxicidade, mas devido ao fato de  
259 alterarem as propriedades físico-químicas das moléculas complexadas, as CDs podem  
260 alterar também a sua toxicidade. Isto foi observado no nosso trabalho, pois houveram

261 diferenças significativas na exibição dos comportamentos ( $p < 0,05$ ) entre os grupos BE  
262 e E. Em peixes, existem poucos estudos sobre os efeitos tóxicos de moléculas  
263 complexadas a CDs, estudo utilizando a hidropropil- $\beta$ -ciclodextrina não complexada foi  
264 realizado em *Danio rerio* onde o desenvolvimento de larvas foi afetado com  
265 concentrações acima de 1% (p/v), testes de toxicidade com peixes adultos não foram  
266 relatados (Maes *et al.*, 2012). É possível que a complexação do 17 $\beta$ -estradiol com a  
267 ciclodextrina tenha causado a maior absorção do hormônio pelos animais, devido a sua  
268 capacidade de manter moléculas hidrofóbicas mais biodisponíveis, como visto no  
269 trabalho de De Paula *et al.* (2007), onde em estudos de solubilidade, a complexação de  
270  $\beta$ -CD ao 17 $\beta$ -estradiol aumentou a solubilidade aquosa deste, assim como a retenção do  
271 fármaco na pele. O autor atribuiu este efeito ao aumento da biodisponibilidade do  
272 hormônio quando complexado. Foi observado ao longo do experimento (90 dias),  
273 devido ao aumento de exibição dos comportamentos agressivos, um aumento de lesões  
274 em alguns indivíduos do grupo BE. No último intervalo de tempo analisado (60-90 dias)  
275 também foi observado que os peixes não respondiam mais aos comportamentos  
276 agressivos, como visto pela redução significativa ( $p > 0,05$ ) no ato *Afastar* (Tab. 2C)  
277 dos animais submissos. O comportamento de *Nadar Rápido* para os indivíduos  
278 dominantes do grupo BE apresentaram maior frequência (Tab. 2), o que pode estar  
279 relacionado aos outros animais não reagirem ou não serem considerados como ameaça.

280 Já no grupo exposto ao 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) livre houve diminuição da  
281 agressividade (0 – 60 dias) como visto em alguns comportamentos como: *Perseguição*,  
282 *Fuga* e *Ataque Frontal* (Tab. 2), com frequências de exibição inferiores ao grupo  
283 controle. Os peixes do grupo E, apresentaram o ato de *Ficar Parado* superior se  
284 comparado aos demais grupos. Este mesmo efeito já foi observado em estudo anterior  
285 do nosso grupo (Santos *et al.*, 2016), onde ocorreu diminuição dos comportamentos  
286 agressivos, assim como aumento da inatividade em peixes machos de *Betta splendens*  
287 expostos ao  $E_2$ . Estes resultados corroboram com Shappell *et al.*, (2010) que também  
288 observaram que o  $E_2$ , diminuiu a agressividade de *Pimephales promelas*.  
289 Adicionalmente, durante as observações, notou-se o escurecimento corporal dos peixes  
290 submissos em todos os grupos experimentais, o que pode estar relacionado a situações  
291 de estresse (Volpato *et al.*, 1989). Os mesmos autores relataram ainda outros fatores,  
292 como a posse prévia do território e condição hierárquica anterior como possível

293 explicação para o escurecimento corporal. Estes dois fenômenos também foram  
294 observados no nosso estudo.

295 Quanto aos parâmetros zootécnicos, a exposição hormonal não alterou o ganho  
296 de peso e comprimento dos animais. Foi observado que, durante todo o experimento, os  
297 animais se alimentaram normalmente, não havendo diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre  
298 os grupos experimentais. Em relação a sobrevivência dos animais, foi observado uma  
299 maior taxa de mortalidade no grupo controle. Raju *et al.* (2008) sugeriram que o  $E_2$   
300 pode apresentar propriedades imunoprotetoras, o que poderia justificar o observado em  
301 nosso trabalho. Ainda a menor taxa de mortalidade foi observada no grupo  $\beta$ -CD: $E_2$ . A  
302 complexação com a ciclodextrina aumenta a estabilidade (Del Valle, 2004; Brewster e  
303 Loftsson, 2007) da molécula hospedeira o que poderia ter potencializado o efeito  
304 imunoprotetor do estradiol.

## 305 **5. Conclusão**

306 Foi possível a construção de um etograma para o estudo comportamental de *O.*  
307 *niloticus* e, sendo o comportamento animal um parâmetro afetado pela presença de  
308 substâncias tóxicas, a complexação do  $E_2$  com a  $\beta$ -CD alterou a toxicidade do  $E_2$ , pois  
309 aumentou a frequência de exibição principalmente dos comportamentos agressivos e  
310 também aumentou a sobrevivência dos animais. Não foram observadas alterações em  
311 relação ao ganho de peso, morfometria e consumo de alimento entre os grupos  
312 estudados. Isto gera a necessidade do desenvolvimento de medidas de controle do  
313 descarte dos hormônios complexados à ciclodextrinas no ambiente, pois podem  
314 apresentar toxicidade diferente de suas formas não complexadas.

## 315 **6. Agradecimentos**

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

## 319 **7. Referências Bibliográficas**

320 ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, v.48,  
321 p.227-267, 1974.

322

- 323 ÁVILA, M.C.; ROMAGOSA, E. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia  
324 nilótica (*Oreochromis niloticus*): Tempo de pós-fertilização e duração do processo na  
325 sobrevivência das larvas. *Bol. Inst. Pesca*, v.31, p.55-64, 2005.
- 326 BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv.*  
327 *Drug Deliver. Rev.*, v.59, p.645-666, 2007.
- 328
- 329 CARVALHO, T.B. *A interferência da luminosidade na agressividade e hierarquia*  
330 *social de ciclídeos*. 2009. 106f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de  
331 Aquicultura, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.
- 332
- 333 DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Proc. Biochem.*, v.39,  
334 p.1033-1046, 2004.
- 335
- 336 DE PAULA D.; OLIVEIRA, D.C.R.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Efeito  
337 promotor de beta-ciclodextrinas modificadas na permeação *in vitro* do estradiol. *Rev.*  
338 *Bras. Cienc. Farm.*, v. 43, n.1, 2007.
- 339
- 340 DENSLOW, N., SEPULVEDA, M. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting  
341 compounds on fish reproduction. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish*  
342 *Oocyte - From Basic Studies to Biotechnological Applications*, Springer, Dordrecht, the  
343 Netherlands, 2008, pp. 255–322.
- 344
- 345 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Species Fact Sheets of  
346 *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), 2016. Disponível em:  
347 <<http://www.fao.org/fishery/species/3217/en>>. Acessado em: 12 set. 2016.
- 348
- 349 FERNANDES, A.N.; GIOVANELA, N.; ALMEIDA, C.A.P. et al. Remoção dos  
350 hormônios 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa  
351 decomposta como material adsorvente. *Quím. Nova*, v.34, p. 1526-1533, 2011.
- 352

- 353 GUIGUEN Y, FOSTIER A, PIFERRER F, CHANG CF. Ovarian aromatase and  
354 estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen.*  
355 *Comp. Endocrinol.*, v.165, p.352-366, 2010.
- 356
- 357 KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. 1. ed. Jundiaí:  
358 F. Kubitza., 2000, 285 p.
- 359
- 360 LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; SÁ, O.R. Avaliação da poluição  
361 ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus*  
362 (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. *Rev.*  
363 *Fafibe On.*, n. 3, p.1-6, 2007.
- 364
- 365 MAES, J.; VERLOOY, L.; BUENAFE, O. E.; WITTE, M. A. P. et al. Evaluation of 14  
366 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae.  
367 *Plos. One.*, v.7, p.1-9, 2012.
- 368
- 369 MCLACHLAN, J.A.; SIMPSON, E.; MARTIN, M. Endocrine Disruptors and female  
370 reproductive health. *Best Pract. Res. Cl. En. Met.*, v.20, p. 63-75, 2006.
- 371
- 372 MERIGHE, G.K.F.; PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; NEGRÃO, J.A.; RIBEIRO, S. Efeito  
373 da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).  
374 *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, p. 828-837, 2004.
- 375
- 376 OISHI, K.; TOYAO, K.; KAWANO, Y. Suppression of estrogenic activity of 17-beta-  
377 estradiol by beta-cyclodextrin. *Chemosphere*, v.73, p.1788–1792, 2008.
- 378
- 379 RAJU, R.; BLAND, K.I.; CHAUDRY, I.H. Estrogen: a novel therapeutic adjunct for  
380 the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. *Mol. Med.*,  
381 v.14, p.213-21, 2008.
- 382
- 383 SANTOS, B. D.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L. et al. Efeitos  
384 de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros

- 385 comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68,  
386 p. 387-396, 2016.
- 387
- 388 SEEMANN, F., KNIGGEB, T., DUFLOTB, A., MARIEB, S., et al. Sensitive periods  
389 for 17 $\beta$ -estradiol exposure during immune system development in seabass head kidney.  
390 *J. Appl. Toxicol.* v. 36, p. 815–826, 2016.
- 391
- 392 SHAPPELL, N.W.; HYNDMANB, K.M.; BARTELL, S.E.; SCHOENFUSS, H.L.  
393 Comparative biological effects and potency of 17 $\alpha$ - and 17 $\beta$ -estradiol in fathead  
394 minnows. *Aquatic Toxicol.*, v.100, p.1-8, 2010.
- 395
- 396 TILTON, S.C., FORAN, C.M., BENSON, W.H. Relationship between ethinylestradiol-  
397 mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese  
398 medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* v. 24, p. 352-359, 2005.
- 399
- 400
- 401 VERA, L.M.; CAIRNS, L.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MIGAUD, H. Circadian  
402 rhythms of locomotor activity in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chronobiol.*  
403 *Int.*, v.26, n. 4, p.666-681, 2009.
- 404
- 405 VOLPATO, G.L.; FRIOLI, P.M.A.; CARRIERI, M.P. Heterogeneous growth in fishes:  
406 some new data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the  
407 causal mechanisms. *Bol. Fisiol. Anim.*, v.13, p.7-22, 1989.
- 408
- 409 WU, H.; LI, G.; LIU, S.; HU, N. et al. Monitoring the contents of six steroidal and  
410 phenolic endocrine disrupting chemicals in chicken, fish and aquaculture pond water  
411 samples using pre-column derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction  
412 with the aid of experimental design methodology. *Food Chem.*, v.192, p.98–106, 2016.
- 413
- 414 ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; VERAS, G. C.; TAVARES, M. M. et al. Tolerância  
415 aguda e crônica de adultos de beta, *Betta splendens*, à salinidade da água. *R. Bras.*  
416 *Zootec.*, v.38, p. 2106-2110, 2009.