

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PAULO AUGUSTO ARAGÃO ZUNINO

**AVALIAÇÃO DA DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES
EXPOSTOS A EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE**

FLORIANÓPOLIS

2006

PAULO AUGUSTO ARAGÃO ZUNINO

**AVALIAÇÃO DA DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES EXPOSTOS
A EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Ambiental, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Carlos Henrique Lemos Soares

FLORIANÓPOLIS

2006

TERMO DE APROVAÇÃO

PAULO AUGUSTO ARAGÃO ZUNINO

AVALIAÇÃO DA DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES EXPOSTOS A EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

Dissertação aprovada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Ambiental, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, pela seguinte banca examinadora.

Orientador: Prof^o. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares
Departamento de Bioquímica, UFSC

Prof^o. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Departamento de Ecologia e Zoologia, UFSC

Prof^o. Dr. Marcel Frajblat
Departamento de Biotecnologia, UNIVALI

Prof^a. Dra. Viviane Mara Whoel
Departamento de Ciências Morfológicas, UFSC

Prof^o. Dr. Evoy Zaniboni Filho
Departamento de Aqüicultura, UFSC

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2006

Dedico este trabalho à Medicina Veterinária, que despertou em mim a consciência de possibilidade de cura, mesmo em situações visualmente desesperançosas.

Hoje sigo junto com aqueles que nunca desistem, sem ao menos ter tentado.

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório Médico Santa Luzia, João Nilson, Cássia, Nina, Carlos, Marilei, e todos os demais que colaboraram.

Aos amigos Zanelli, Rose, Carol, Zanelinho, Allan e Natalia, do Pet Shop Big Dog Brasil, minha gratidão pela torcida, incentivo e colaboração.

Muito obrigado também ao Julio, Bernardino e Valmir, do grupo Superimperatriz pelo grande apoio e compreensão. Obrigado à Joice da secretaria da PPG em Biotecnologia.

Destaco um obrigado aos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia, Anabelle, Vitor, Liz, Lúcia, Sabrina e Ivana.

Entre os professores, agradeço a atenção do Prof^o. Carlos Pinto, Prof^o. Danilo Wilhelm Filho, Prof^a. Viviane Whoel e do Prof^o. Marcel Frajblat.

Em especial, agradeço ao meu orientador Prof^o. Carlos Henrique Lemos Soares por acreditar em mim, por sua paciência, compreensão, e por ensinar a pensar como um pesquisador.

À minha mãe Círia, meu irmão Neto, Suzi e Paty, pela torcida e apoio. E a toda família que, mesmo sem saber, ajudou muito.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A INDÚSTRIA PAPELEIRA.....	4
2.1.1. Componentes da Madeira.....	6
2.1.1.1. Celulose.....	6
2.1.1.2. Hemicelulose.....	6
2.1.1.3. Lignina	7
2.1.1.4. Extrativos	7
2.1.2. Tipos de Madeira e Composição	7
2.1.3. Processo de Polpação.....	8
2.1.4. Processo de Branqueamento.....	9
2.1.5. Extração Álcali.....	10
2.1.6. Química do Cloro.....	11
2.1.7. Remoção de Metais.....	11
2.1.8. Branqueamento com Cloro.....	11
2.1.9. Efluentes Papeleiros.....	12
2.2. CARACTERIZAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO	14
2.2.1. Fisiologia Reprodutiva.....	16
2.2.2. Determinação Sexual.....	18
2.2.3. Diferenciação Sexual.....	20
2.2.4. Reversão.....	21
2.2.5. Avaliação da eficácia da reversão sexual.....	22
2.3. XENOBIONTES VERSUS AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL	22
2.3.1. Bioindicador.....	24
2.3.2. Marcadores Bioquímicos.....	25
2.3.3. Desregulação Endócrina.....	27
2.3.4. Efeitos Estrogênico e Androgênico.....	29
2.3.5. Mecanismos de Desregulação Endócrina.....	32
3. OBJETIVOS GERAIS	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. PEIXES	36
4.2. EFLUENTE.....	36
4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA.....	37
4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	37
4.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	38
4.6. ÍNDICE SOMÁTICO.....	38
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE PEIXES MACHOS AO EFLUENTE.	39
5.1.1.	Efeito Sobre a Concentração de Testosterona.....	39
5.1.2.	Efeito Sobre a Concentração de Estradiol.....	41
5.1.3.	Efeito Sobre a Concentração de Colesterol Total e Fração LDL.....	44
5.1.4.	Efeito da Exposição no Índice Somático de Gônadas (ISG).....	45
5.1.5.	Efeito da Exposição no Índice Somático de Fígado (ISF).....	46
5.1.6.	Efeito da Exposição na Concentração de Proteínas Totais e Frações	48
5.2.	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE PEIXES FÊMEAS AO EFLUENTE	50
5.2.1.	Efeito Sobre a Concentração de Testosterona.....	50
5.2.2.	Efeito Sobre a Concentração de Estradiol.....	51
5.2.3.	Efeito Sobre a Concentração de Colesterol Total e Frações.....	54
5.2.4.	Efeito da Exposição no Índice Somático de Gônadas.....	55
5.2.5.	Efeito da Exposição no Índice Somático de Fígado.....	56
5.2.6.	Efeito Sobre a Concentração de Proteínas Totais e Frações.....	57
5.2.7.	Efeito da Exposição Sobre a Relação do Índice Geral.....	60
5,3.	HISTOLOGIA DE GÔNADAS.....	61
5.3.1.	Histologia de Gônadas de Machos.....	61
5.3.2.	Histologia de Gônadas de Fêmeas.....	61
6.	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA EM TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	38
FIGURA 2	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE ESTRADIOL PLASMÁTICO EM TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	41
FIGURA 3	RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DOS HORMÔNIOS TESTOSTERONA/ESTRADIOL DURANTE O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO DOS PEIXES AO EFLUENTE.....	42
FIGURA 4	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL PLASMÁTICO EM TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	43
FIGURA 5	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DA FRAÇÃO LDL PLASMÁTICA EM TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	44
FIGURA 6	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NO ÍNDICE SOMÁTICO DE GÔNADAS DE TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	45
FIGURA 7	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NO ÍNDICE SOMÁTICO DE FÍGADO DE TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	46
FIGURA 8	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	47
FIGURA 9	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NA CONCENTRAÇÃO DE ALBUMINA DE TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	48
FIGURA 10	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NA CONCENTRAÇÃO DE GLOBULINAS DE TILÁPIAS ADULTAS MACHOS.....	49
FIGURA 11	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	50
FIGURA 12	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE ESTRADIOL PLASMÁTICO DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	51
FIGURA 13	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NA RELAÇÃO HORMONAL ENTRE TESTOSTERONA E ESTRADIOL PLASMÁTICOS DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	52
FIGURA 14	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL PLASMÁTICO DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	53
FIGURA 15	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DA FRAÇÃO LDL PLASMÁTICA DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	54

FIGURA 16	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NO ÍNDICE SOMÁTICO DE GÔNADAS DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	55
FIGURA 17	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NO ÍNDICE SOMÁTICO DE FÍGADO DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	56
FIGURA 18	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE PROTEÍNA TOTAL PLASMÁTICA DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	57
FIGURA 19	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE ALBUMINA PLASMÁTICA DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	58
FIGURA 20	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NOS NÍVEIS DE GLOBULINA PLASMÁTICA DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	58
FIGURA 21	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE – NO ÍNDICE GERAL DE TILÁPIAS ADULTAS FÊMEAS.....	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	DESEMPENHO DO BRASIL EM 2003.....	4
QUADRO 2	BRASIL – MAIORES PRODUTORES DE PAPEL – 2002	5
QUADRO 3	PRODUÇÃO MUNDIAL DE PAPEL POR TIPO – 2001.....	5
QUADRO 4	COMPOSIÇÃO DA PRODUÇÃO 2004.....	6
QUADRO 5	CARACTERÍSTICAS DE FIBRAS DE MADEIRA.....	7
QUADRO 6	PROCESSO DE EXTRAÇÃO ÁLCALI.....	10
QUADRO 7	TILÁPIA DO NILO – VISTA INTERNA.....	14
QUADRO 8	CLASSIFICAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO.....	15
QUADRO 9	TILÁPIA DO NILO – VISTA EXTERNA.....	15
QUADRO 10	DETERMINAÇÃO SEXUAL EM VERTEBRADOS.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRACELPA	Associação Brasileira de Celulose e Papel
Cl ₂	Cloro Elementar
O ₃	Ozônio
CLO2	Dióxido de Cloro
O ₂	Oxigênio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
R-	Radical

H ₂ O	Água
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
AOX	Organo-halogenados totais
XX/XY	Sistema cromossômico
ZW/ZZ	Sistema cromossômico
MT	17 alfa-metiltestosterona
F-1	Primeira geração
LC ₅₀	Concentração letal para mais de 50%
SED	Substâncias endócrino desreguladoras
E2	Estradiol
E1	Estrona
EE2	Etinil-estradiol
MES	Mestranol
LDL	Low density lipoprotein
ISF	Índice somático de fígado
ISG	Índice somático de gônada
IG	Índice geral

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a qualidade do efluente de uma indústria de papel e celulose através de parâmetros físico-químicos e biológicos, em tilápias adultas quanto às possíveis alterações dos níveis plasmáticos de hormônios sexuais, colesterol total e fração LDL, proteínas totais, albumina e globulinas, e também quanto aos índices somáticos de fígado e gônadas. Foram utilizadas 24 tilápias fêmeas e 24 tilápias machos, peso entre 20-70g. A classificação sexual foi por observação da genitália. Após aclimação, foram acondicionados em tanques contendo efluente a 1%, separados em machos e fêmeas, ambiente controlado (temperatura de 25°C, iluminação em claro/escuro 12/12h, sob aeração constante). Foram alimentados com ração comercial, uma vez ao dia, pela manhã. Dois grupos de peixes controle (macho/fêmea), não expostos ao efluente, foram mantidos nas mesmas condições. Foi utilizado o efluente final do processo de produção de polpas branqueadas por processo convencional e tratado. Em 4 semanas foram analisados 12 peixes por semana, sendo 6 fêmeas e 6 machos em exposição ao efluente e, de maneira idêntica, os peixes controle. O sangue foi coletado da veia caudal com uma seringa com heparina. Após a coleta de sangue, fez-se a eutanásia dos peixes por secção da medula espinhal. Em seguida foram medidos o comprimento e o peso do corpo e coletado o fígado e as gônadas para pesagem. As gônadas foram fixadas

em formalina 10% tamponada, e encaminhadas para preparação de lâminas para estudo histopatológico. As análises bioquímicas de metabólitos sanguíneos e parâmetros hematológicos foram realizados através de técnicas convencionais em análises clínicas. A determinação da concentração de estradiol e testosterona foram feitas por quimiluminescência, os demais metabólitos foram dosados por colorimetria. Os resultados obtidos com os machos apontaram para um aumento nos níveis de testosterona a partir da 3ª semana, após um período de indução. Efeito inverso foi obtido para estradiol, cuja concentração foi reduzida nas duas primeiras semanas, seguida por uma discreta correção. A relação numérica entre as concentrações de testosterona/estradiol, ao longo do período de exposição, mostrou uma clara desregulação hormonal. A concentração de colesterol total apresentou um acentuado aumento apenas na 4ª semana. A fração LDL do colesterol acompanhou o perfil de alteração do colesterol total. O aumento dos índices somáticos de fígado e de gônadas foram bem caracterizados. As concentrações das proteínas totais e das globulinas permaneceram elevadas durante a maior parte do período, enquanto que a concentração de albumina reduziu-se nas duas primeiras semanas, retornando ao valor inicial na 4ª semana. Nas fêmeas ocorreu diminuição progressiva do estradiol, ao longo do período, enquanto que para testosterona, observou-se um aumento a partir da 1ª semana, permanecendo neste valor até o final do período experimental. A concentração de colesterol total apresentou-se reduzida nas 3 primeiras semanas e elevada na 4ª semana. A fração LDL foi mais elevada apenas na 4ª semana. A concentração das proteínas totais aumentou a partir da 2ª semana permanecendo elevada até a 4ª semana. Comportamento diferente foi apresentado pela concentração de albumina, que se manteve inalterada nas 4 semanas de exposição. A concentração das globulinas também manteve-se elevada durante todo o período. O índice somático de gônadas permaneceu elevado durante as 4 semanas de exposição. Para o índice somático de fígado, os valores foram mais elevados nas 3 primeiras semanas, retornando ao valor dos peixes controle na 4ª semana. Em ambos os sexos ocorreram alterações histológicas em gônadas. Os resultados mostraram uma evidente desregulação endócrina, marcada pela diminuição do estradiol e aumento da testosterona, caracterizando uma masculinização. Corroborando este mesmo resultado, a relação hormonal mostrou um forte predomínio de testosterona em ambos os sexos. Além disto, os níveis do colesterol total e LDL aumentaram no decorrer do período, sugerindo uma resposta à demanda de hormônios esteroidais, mais especificamente, a testosterona. O aumento das proteínas totais, globulina, ISF e ISG, indicaram uma reação de resposta orgânica a uma agressão xenobiótica. As alterações histológicas poderiam estar relacionadas a masculinização. O efluente estudado causou desregulação endócrina em tilápias, sugerindo fortemente que o tratamento industrial do efluente, não foi suficiente para evitar esta toxicidade.

Palavras chave: Tilápias, Hormônios esteróides, Papel e celulose, Desregulação, Masculinização.

ABSTRACT

The quality of bleaching effluent from the pulp and mill industry was analyzed by physical, chemical and biological parameters. Adult tilapias (*Oreochromis niloticus*) were available to determine levels of plasmatic sexual hormones, cholesterol total and LDL fraction, total proteins, albumin and globulins. Were available too, the somatic indices of liver and gonads. Were used 24 tilapias female and 24 tilapias male, with weight between 20-70g. The sexual classification was by macroscopic visualization of genitals. After acclimatization period, they was exposed in 1% effluent in tanks, separately in males and females, within control environment, with 25°C, light/dark (12/12h), constantly aeration. Fishes ate commercial food once a day in the morning. Two groups (male/female) of fishes not exposed to effluent was received the same environment conditions. The effluent was from the finish process of conventional bleaching and was treated. During 4 weeks, 12 fishes were analyzed, where 6 was male and 6 was female both exposed to effluent and more 6 of each sex not exposed to effluent. The blood was draw by caudal vein with a heparinized syringe. After draw the blood, were made euthanasia fishes by spine medulla section. Was measured the length and the weight of the body and separately, the gonads and liver. The gonads were fixed in formalin-10% tamponade, and made histopathologic study. Biochemistry and hematology's parameters were made by

conventional methodologies in biochemistry analyzes. Estradiol and testosterone was available by quimiluminescence, and the others metabolites by colorimetria. Male results show on a 3rd week a increase level of testosterone after de induction period. Inverse effect was reach for estradiol, where concentrations on 2 first weeks were reduced, follow by a discrete correction. The rate between testosterone/estradiol, spending de experiment, showed a evident endocrine disruption. Total cholesterol has a high increase just on the 4th week. LDL has the same comporment that total cholesterol. Somatic index of liver and gonads have an increased. Total protein and globulin levels, staying high for almost complete period, while albumin have lower levels on 1st and 2nd weeks and return to initial values on the 4th week. Continued reduction level of estradiol of female was showed, while testosterone increased since 1st week. Total cholesterol showed a reduction level on the 1st to 3rd weeks, although, on the 4th week showed a increased level. The LDL was high level just on 4th week. Total proteins increased since 2nd week until 4th week. Differently, albumin level staying without alterations for all the time of experiment. Globulins have increased for all weeks. Somatic index of gonads show high levels for 1st to 4th week. However, somatic index of liver, the values were increased until 3rd week. Both sexes have gonadal histological alterations. The results show an evident endocrine disruption, markedly for reduced level of estradiol and increased of testosterone characterizing a masculinization. Corroborant results of hormonal rate show the predominant level of testosterone in both sexes. The levels of total cholesterol and LDL have increased during the period and this may suggest a reaction about demands of steroidal hormones, mainly the testosterone. The increased of total proteins, globulins, somatic index of liver and gonads, proposed an organic reaction to a xenobiotic aggression. Histological changes can be associated with the masculinization. The effluent investigated make disruption endocrine in tilápias.

Key Words: Tilapias, Steroidal hormones, Pulp and mill, Disruption, Masculinization.

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos o mundo vem se modernizando e com ele vem aumentando o consumo de papel por todos os setores da sociedade, seja para uso pessoal ou profissional. Este grande consumo fez com que houvesse investimento na abertura de novas indústrias do ramo em diversos países, sem, no entanto, ocorrer o mesmo investimento suficiente em tecnologia para tratamento de seus efluentes. Em países como Alemanha, Suécia, Finlândia, Canadá e Estados Unidos, o avanço tecnológico observado na indústria papelreira foi induzido por uma legislação eficaz quanto aos parâmetros e características a serem observados na avaliação da qualidade de efluentes industriais. Hoje existem muitas indústrias no mundo e principalmente no Brasil, que mantém a mesma estrutura de 30 anos atrás, inclusive no processo de produção Kraft, utilizando ainda, no processo de branqueamento, o cloro elementar ou substâncias cloradas como dióxido de cloro ou ainda hipoclorito de sódio, gerando uma grande quantidade de compostos organoclorados. Além destes compostos clorados outras substâncias integram o este grupo que de alguma forma prejudicam os diferentes ecossistemas, sendo causadores de desregulação hormonal. O processo convencional de branqueamento de polpas, que emprega cloro elementar, gera um dos efluentes com índice de toxicidade estimado mais elevado (Soares et al. 1997; 2000; Karels & Oikari, 2000). As técnicas universalmente utilizadas na descontaminação de efluentes derivados da indústria papelreira são principalmente as lagoas aeróbicas e lodos ativados onde o processo consiste, basicamente, na agitação dos efluentes na presença de microorganismos e oxigênio atmosférico, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica (Efluentes Papeleiros 2004). Ou o método é mal executado ou é ainda ineficaz para este tipo de produto, já que o efluente tratado e o próprio lodo das lagoas são tóxicos ao ambiente (Soares et al. 1997). Efluentes industriais tratados e não tratados são a origem primária de estrógenos sintéticos não-esteroidais (Pojana et al., 2004).

Efluentes de indústrias de papel e celulose podem causar sobre organismos aquáticos desde modificações de comportamento e de distribuição populacional (Munkittrick et al. 1994) até efeitos mais drásticos como alterações no crescimento,

lesões de órgãos e desregulação hormonal, entre outros (Owens, 1991, MacLatchy et al. 1997). Nos últimos anos, o impacto dos químicos ambientais com atividade endócrina, também chamados de substâncias endócrino desreguladoras (SEDs), na diferenciação sexual de peixes tem sido a principal preocupação (e.g., Arcand-Hoy e Benson, 1998; Jobling et al., 1998; Lange et al., 2001). Efluentes industriais tratados e não tratados são a origem primária de estrógenos sintéticos não-esteroidais (Pojana et al., 2004).

Masculinização tem sido reportada de águas próximas a efluente de papel e celulose na Suécia (Larsson & Forlin, 2002).

Os mecanismos de ação de muitos agentes suspeitos de afetarem um ou mais aspectos da função reprodutiva, ainda não foram totalmente determinados. Um químico pode envolver múltiplos sítios de ação e complexos distúrbios nos processos homeostáticos. Alterações nos genes codificadores de enzimas esteroidogênicas pode negativamente alterar produção de estradiol (E2) (Kazeto et al., 2004). Desreguladores endócrinos e seus metabólitos podem, se estruturalmente similares aos ligantes endógenos, interagir diretamente com o ligante do receptor fisiológico nas células das gônadas ou órgãos acessórios sexuais. Isto pode mimetizar a ação do hormônio resultando numa estimulação do receptor em efeitos biológicos (agonista), ou podem bloquear ou reduzir a ligação e sua atividade biológica dos hormônios naturais presentes (antagonista). Efeitos indiretos podem também resultar de indução química ou inibição de enzimas metabólicas causando mudanças na produção ou eliminação de hormônio endógenos ou alterações em proteínas carreadoras no sangue. As conseqüências destas interferências no organismo do peixe são preocupantes se considerarmos a possibilidade de real de desequilíbrio ecológico.

Os peixes foram escolhidos para este estudo por serem considerados excelentes bioindicadores, no estudo de impacto de efluentes direcionados para ambientes aquáticos (Soares et al. 1997). Os peixes são muito sensíveis a modificações do meio em que vivem, constituindo o grupo de animais mais evoluído que depende exclusivamente de água. Mais especificamente, no caso de desregulação hormonal gerada por efluentes de papel e celulose, já existem muitos trabalhos preconizando o uso de peixes como bioindicadores de teste-padrão para avaliação do impacto do

efluente sobre o ambiente aquático (Ankley et al., 2001 e Sharpe et al., 2004). A maioria dos estudos que investigam a desregulação endócrina tem sido focado em peixes segundo Segner *et al.* (2003). A reprodução dos peixes é a fase mais importante na vida do animal, pois através dela ele garante a manutenção de sua espécie. É um processo fisiológico mediado pela complexa atuação de eventos neurohormonais que, desencadeado por estímulos ambientais, provocam no peixe, reações específicas que culminam com a desova.

Hoje a piscicultura vem se destacando na produção mundial de alimentos devido a alta produção em curto espaço de tempo e em espaços relativamente menores que os necessários para outros tipos de produção animal. No caso da produção de peixes, a Tilápia é valorizada devido a suas características de altas taxas de reprodução, rápido crescimento e alta prolificidade. Na piscicultura de tilápias, objetiva-se o cultivo de machos por seu ganho de peso mais rápido, sendo assim, as pós-larvas, por apresentarem sexo indefinido, são alimentadas por 21 a 28 dias com ração contendo hormônios masculinizantes. Estes níveis de hormônios presentes no peixe para consumo, são ínfimos, sem produzir efeito significativo nas pessoas. Seria muito interessante a descoberta de outra substância que substituísse o hormônio administrado aos peixes. Hormônio é um produto caro e que necessita de extrema atenção ao seu manuseio.

Parte integrante de um grande projeto desenvolvido pelo Laboratório de Ecotoxicologia, este estudo avaliou o comportamento hormonal, metabolismo bioquímico, histologia de gônadas e índices somáticos de peixes tilápia (*Oreochromis niloticus*) quando expostos ao efluente tratado de uma indústria catarinense de papel e celulose.

Responder se houve ou não desregulação hormonal e o relacionamento entre as alterações e o efluente aos quais os peixes foram expostos, foi o objetivo da pesquisa. A coleta e análise de todos os dados possibilitou fazer uma relação entre os dados considerados alterados, em relação a um grupo controle, e o efeito destes no peixe e por consequência, no ecossistema.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A INDÚSTRIA PAPELEIRA

Em todo o mundo as indústrias de papel e celulose têm, nas últimas décadas, apresentado mudanças no processo fabril na tentativa de atender as necessidades de aumento de produção e de respeito a algumas regras ambientais. A Associação Brasileira de Celulose e Papel – BRACELPA (2004) divulga, em seu site, dados (Quadro 1) relacionados ao desempenho das indústrias brasileiras em 2003. Relata que são 220 empresas em 450 municípios, gerando mais de 100 mil empregos com um saldo comercial de US\$2,5 bilhões, e ocupando o 7º lugar no ranking mundial em produção de celulose, e 11º em produção de papel. Tais indústrias utilizam apenas madeira de florestas plantadas com eucalipto e pinus em 394 municípios. Segundo Bassa et al., (2002), atualmente o Brasil ocupa a primeira posição entre os produtores e exportadores mundiais de polpa celulósica branqueada de eucalipto, e ainda possui enorme potencial de crescimento.

QUADRO 1 – DESEMPENHO DO BRASIL EM 2003

- 220 empresas, em 450 municípios, em 16 estados e nas cinco regiões brasileiras
- 100 mil empregos diretos nas indústrias e florestas
- US\$ 3,1 bilhões a exportar em 2003, gerando saldo comercial de US\$ 2,5 bilhões
- R\$ 1,7 bilhão em impostos pagos em 2003
- 9 milhões de toneladas de celulose produzidas por ano (7º do mundo)
- 7,9 milhões de toneladas de papel produzidas por ano (11º do mundo)
- Utiliza exclusivamente madeira de florestas plantadas (eucalipto e pinus)
- 1,5 milhão de hectares de florestas plantadas em 11 estados e 394 municípios
- 1,5 milhão de florestas nativas preservadas e cultivadas
- 3 milhões de toneladas de papel reciclado anualmente

FONTE: BRACELPA, (2004)

Ainda segundo a BRACELPA, em 2002 (Quadro 2), a Klabin liderava a produção de papel com 1610000 toneladas, seguida por Suzano, International Paper, Votorantin, Ripasa, Rigesa, Orsa, Trombini, Norske Skog, em ordem decrescente de produção, responsáveis por 64% da produção nacional, com praticamente 4,9 milhões de toneladas.

QUADRO 2 - BRASIL – MAIORES PRODUTORES DE PAPEL – 2002¹

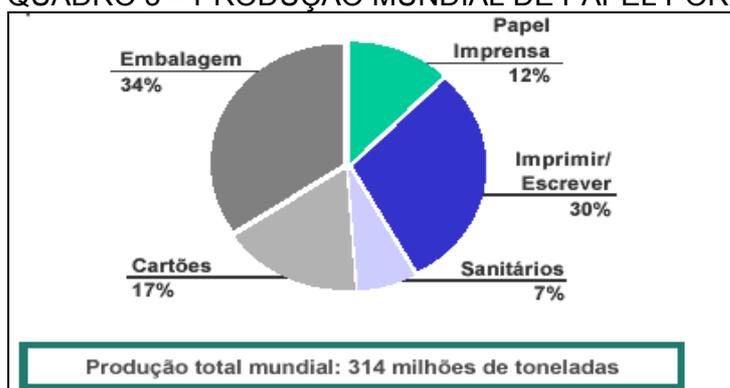
Empresa	Produção (x 10 ³ toneladas)
Kablin	1610
Suzano	769
International Paper	591
Votorantin	570
Ripasa	387
Rigesa	297
Orsa	268
Trombini	201
Norske Skoga	173

FONTE: BRACELPA, (2004)

As indústrias de Papel e Celulose Klabin S.A. iniciaram suas operações aproximadamente há 100 anos em São Paulo. Hoje a companhia é a maior produtora integrada de produtos de celulose e papel na América Latina, com 27 fábricas. Seus ativos incluem um total de 236000 hectares de plantações de eucaliptos e pinheiros com alta produtividade em cinco estados, todos próximos à Mata Atlântica (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Bahia).

A distribuição da produção mundial de papel por tipo em porcentagem segue um padrão semelhante ao demonstrado no Quadro 3, onde os papéis e cartões para embalagem representam mais de 50% da produção.

QUADRO 3 – PRODUÇÃO MUNDIAL DE PAPEL POR TIPO – 2001 – %



FONTE: POU, MIGUEL SAMPOL, (2003)

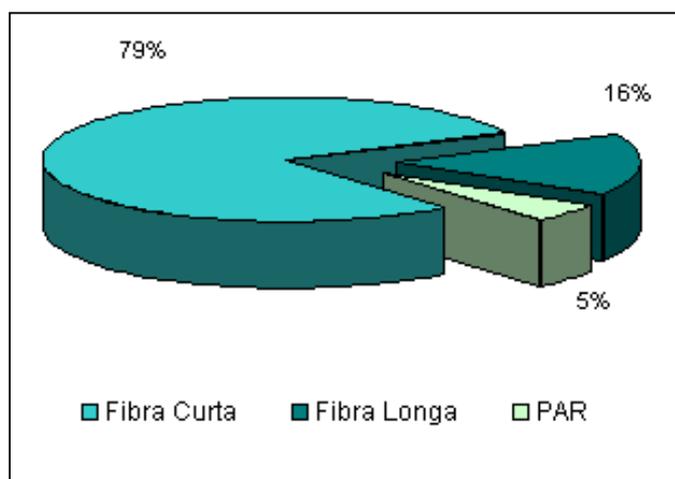
O desenvolvimento da silvicultura brasileira, implantação de unidades produtoras de polpa celulósica modernas e as tecnologias empregadas nas industriais brasileiras de polpação, as quais utilizam em sua maior parte o processo Kraft,

¹ 9 empresas, 4,9 milhões de toneladas e 64% da produção brasileira.

contribuem para a primeira posição do Brasil no cenário mundial no que diz respeito à celulose de fibra curta de eucalipto.

Numa tentativa de adequação às questões ambientais e econômicas, o processo Kraft vem sendo objeto de numerosos estudos visando aumentar o rendimento do processo e melhorar a qualidade do produto final obtido (Bassa et al., 2002).

QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DA PRODUÇÃO 2004



FONTE: BRACELPA, (2005b)

2.1.1. Componentes da Madeira

2.1.1.1. Celulose

Consiste em longas cadeias poliméricas de moléculas de glicose. Responsável principal da estrutura da parede celular dos vegetais, possui as principais propriedades desejadas para a produção de papel.

2.1.1.2. Hemicelulose

São cadeias poliméricas ramificadas e curtas de glicose e outras moléculas de açúcares, particularmente pentoses. Estas preenchem os espaços das paredes celulares das plantas. Hemiceluloses são mais solúveis em água e então, normalmente, são removidas durante o processo de polpação.

2.1.1.3. Lignina

É uma estrutura polimérica randômica formada por unidades fenólicas tri-dimensionais, responsável pela união e rigidez das fibras de celulose. A polpação química e o processo de branqueamento, seletivamente, removem a lignina sem degradar as fibras.

2.1.1.4. Extrativos

Correspondem a 3-5 % da parte mole da madeira. Este material inclui hormônios vegetais, resinas e ácidos graxos, que, junto com outras substâncias, ajudam o crescimento e a resistência a doenças. Estas substâncias são altamente tóxicas à vida aquática e, particularmente, são responsáveis pela toxicidade aguda dos efluentes de papel e celulose.

2.1.2. Tipos de Madeira e composição

QUADRO 5 - CARACTERÍSTICAS DE FIBRAS DE MADEIRA

	Mole	Dura
Conteúdo de Celulose	42% +/- 2%	45% +/- 2%
Conteúdo de Lignina	28% +/- 3%	20% +/- 4%
Conteúdo de Extrativos	3% +/- 2%	5% +/- 3%
Comprimento de Fibra	2-6 mm	0.6-1.5 mm

Quanto ao tipo de fibra, as madeiras podem ser divididas em duas classes gerais, fibras moles e duras (Quadros 4 e 5). As coníferas podem ser classificadas como de fibra mole. As de fibra dura são aquelas que perdem suas folhas a cada ano (caducifólias).

Madeiras moles com suas fibras compridas e rudes são geralmente usadas para prover força à folha de papel. Fibras de madeiras duras são mais finas e conformáveis, dando à folha de papel uma superfície lisa imprimível e opaca. Estas fibras de madeira duras são também mais fáceis de branquear e dar brilho, devido à menor quantidade de lignina.

Papel geralmente consiste de uma combinação de polpas de fibras duras e fibras moles, reunindo força e superfície imprimível para atender à demanda.

2.1.3. Processo de Polpação

A polpação visa separar as fibras das madeiras e estas da lignina, com o mínimo prejuízo às propriedades das fibras. No processo de polpação química, sob calor, substâncias químicas são adicionadas a cavacos de madeira num cozimento sob pressão, no chamado digestor.

Os processos químicos da polpação podem ser classificados em: ácido (pH entre 1 e 3), bissulfito (4,5), neutro (entre 6 e 10) e alcalino (entre 11 e 14). Entre os alcalinos, podemos destacar os processos: sulfito, soda e sulfato ou Kraft, que é o único método utilizado no Brasil atualmente (Papel e Celulose, 2004).

No processo Kraft, uma solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfito de sódio, conhecida como líquido branco, seletivamente dissolve a lignina e a solubiliza no líquido em cozimento. Após 2 a 4 horas, a mistura composta de polpa, um concentrado de químicos da polpação e o material refugado da madeira são descarregados do digestor. A polpa é lavada para separá-la do líquido negro – concentrado químico e o refugo da madeira. Polpação Kraft é um processo de baixo rendimento – somente 45% da madeira usada tornam-se polpa. A polpa é chamada de polpa marrom ou polpa não branqueada, por conter ainda 5 a 10% de lignina oxidada residual, e neste ponto está pronta para ser branqueada. Polpas de fibra mole, de um processo de cozimento convencional, contêm em torno de 4.5% de lignina. Esta lignina será removida e a polpa se tornará clara durante o processo de branqueamento.

Fantuzzi Neto (1997) sumariza as vantagens do processo Kraft: alta qualidade da polpa, eficiência na recuperação de reagentes químicos, grande flexibilidade com relação às espécies de madeira e auto-suficiência na produção de energia. Como o processo de polpação é praticamente fechado, apenas 3 a 5 % do licor é destinado ao efluente, sendo o restante utilizado como fonte de energia, após passar por um processo de concentração por evaporação. Entretanto, o processo Kraft apresenta algumas desvantagens, segundo Bassa et al., (2002), sendo as principais: alto custo de

investimento na construção da fábrica, problema de odor dos gases produzidos, baixo rendimento de polpação e alto custo de branqueamento.

Hartler (1996) e Herschmiller (1997) comentam que o impacto ambiental da formação de compostos organoclorados durante o branqueamento tornou indispensável a diminuição do teor de lignina residual nas polpas celulósicas não branqueadas.

2.1.4. Processo de Branqueamento

O branqueamento consiste numa seqüência de tratamentos físicos e químicos para melhora de algumas propriedades das fibras celulósicas, como alvura, limpeza e pureza química. No branqueamento de pastas químicas, das quais a maior parte da lignina foi removida na polpação, a remoção de cor atinge apenas a lignina remanescente e seus derivados. É um mercado ainda dominado pelo cloro molecular e dióxido de cloro, com ascensão para o peróxido de hidrogênio, oxigênio, dióxido de cloro e ozônio (Papel e Celulose, 2004).

A remoção da lignina ocorre no estágio inicial, seguido por uma lavagem da polpa para a retirada de qualquer material orgânico solúvel e, posteriormente, num estágio final, a polpa é branqueada.

Os branqueadores químicos podem ser classificados em agentes fortemente oxidantes, álcalis e removedores de metal. Os agentes oxidantes podem degradar a lignina removendo a cor da polpa, de acordo com as condições de operação.

O cloro elementar (Cl_2) é um efetivo agente deslignificante. Como as ligações de lignina são quebradas, os átomos de cloro são adicionados aos produtos da degradação da lignina, produzindo assim, uma quantidade significativa de material orgânico clorado.

O ozônio (O_3) também é um efetivo agente deslignificante com boa capacidade de clarear a polpa. Ozônio não era utilizado no passado devido à falta de habilidade das fábricas em lidar com a seletividade do agente, uma vez que ele ataca a lignina, assim como a fibra de celulose. No entanto, o desenvolvimento de tecnologias recentes tem permitido a redução de custos efetivos num processo de branqueamento com ozônio.

O dióxido de cloro (ClO_2) é um agente químico altamente seletivo que pode deslignificar e clarear a polpa. Oxida a lignina sem adicionar átomos de cloro aos fragmentos de lignina, no entanto, pequenas quantidades de cloro elementar e outros compostos clorados formados durante o processo de branqueamento, reagem com a lignina degradada para formar compostos organoclorados.

O oxigênio molecular é um agente deslignificante muito efetivo, barato e que é usado no início do processo de branqueamento e possui uma seletividade intermediária.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um agente deslignificante barato formado por uma combinação de cloro elementar e álcali na indústria. Hoje em dia está em desuso devido à grande formação de clorofórmio quando usado no branqueamento.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é usado principalmente no clareamento de polpas no estágio final do processo, sendo muitas vezes utilizado no fim da seqüência de branqueamento convencional para prevenir a perda de alvura.

2.1.5. Extração Álcali

A soda cáustica (hidróxido de sódio) solubiliza os produtos de lignina degradados (Quadro 6).

Cloro, dióxido de cloro e ozônio trabalham melhor em condições ácidas, num pH entre 1,5 a 4,0. Quando a reação de branqueamento termina, a polpa é lavada para remover a lignina degradada ou outros rejeitos orgânicos, os quais são carregados pela água empregada no processo. Muitos destes rejeitos orgânicos, no entanto, consistem de ácidos orgânicos e álcoois. Estes compostos não são solúveis em água acidificada, portanto, permanecem com a polpa durante a lavagem. Por esta razão, a lavagem (extração) é realizada em meio alcalino.

QUADRO 6 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO ÁLCALI

R-COOH	+	NaOH	=>	R-COO-Na	+	H₂O
Ácido orgânico insolúvel em água		Soda cáustica (hidróxido de sódio)		Sal de sódio orgânico solúvel em água		Água

No estágio de extração álcali, estes ácidos orgânicos e álcoois reagem com a soda cáustica (hidróxido de sódio) para formar compostos de sódio orgânicos e água. A maioria dos dejetos orgânicos e cores presentes no efluente da indústria vêm do primeiro estágio de extração. Há muito menos dejetos orgânicos na segunda fase do estágio, se a primeira é utilizada, porque pouca lignina é removida nos últimos estágios do processo de branqueamento.

2.1.6. Química do Cloro

Cloro elementar e dióxido de cloro reagem diferentemente com a lignina. Cloro elementar quebra a molécula de lignina pela adição de cloro a lignina. Dióxido de cloro transfere oxigênio à lignina para quebrar um anel. Ácido hipocloroso também é formado. Isto pode reagir diretamente com anéis aromáticos da lignina ou ser convertido a cloro elementar.

Assim, o único caminho para não formar dioxinas e compostos organoclorados no processo de branqueamento, é a eliminação de todas as bases clorídricas do processo de branqueamento.

2.1.7. Remoção de Metais

Metais de transição presentes na madeira reagem com ozônio e peróxido de hidrogênio, desta forma, eles são removidos antes de se juntarem à polpa.

2.1.8. Branqueamento com Cloro

Assim que a polpa, no processo de branqueamento, é exposta ao cloro ou ao dióxido de cloro, a concentração de íons derivados de cloro resultantes, faz com que seja corrosivo para ser recirculado e reaproveitado, sem água, no processo de queima para geração de energia na câmara de recuperação. Então, a parte orgânica do efluente é descartada no sistema de tratamento e finalmente direcionada aos rios e lagos.

2.1.9. Efluentes Papeleiros

O elevado potencial poluente das indústrias papeleiras está relacionado principalmente com a geração de grandes volumes de efluentes, os quais, além de fortemente coloridos, contêm variadas concentrações de substâncias persistentes e tóxicas. Estatísticas relativamente recentes indicam que a produção mundial de polpas de madeira corresponde a aproximadamente 50 milhões de toneladas, o que implica uma liberação diária de mais de 62 milhões de metros cúbicos de efluentes, volume equivalente ao consumo doméstico de água de aproximadamente 200 milhões de pessoas. Muitos estudos que buscam diminuir o volume e a toxicidade destes efluentes têm sido realizados. Entretanto, o impacto ambiental causado por estas descargas líquidas continua sendo um problema de caráter grave (Efluentes Papeleiros, 2004).

O processo de polpação predominante no mundo, denominado processo Kraft, é responsável pela geração de efluentes com alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), turbidez, cor, sólidos suspensos, e baixas concentrações de oxigênio dissolvido. No branqueamento, etapa posterior à polpação, universalmente realizado através da cloração, ocorre a formação de um grupo de substâncias de estrutura diversa, denominadas “cloroligninas”.

As indústrias papeleiras descarregam no meio ambiente uma grande variedade de substâncias químicas reconhecidamente tóxicas, como clorofenóis, cloroligninas, ácidos orgânicos, resinas ácidas e, particularmente, dioxinas e seus derivados clorados (Kringstad e Lindstrom, 1984; Suntio; 1988; Soares e Duran, 2001).

Mais de 300 substâncias orgânicas têm sido detectadas em efluentes de branqueamento, algumas de reconhecido efeito tóxico e/ou genotóxico (fenóis clorados, derivados de catecol e guaiacol, dioxinas, etc.) (Efluentes Papeleiros, 2004). Muitas destas substâncias apresentam grande resistência à degradação biológica e química que, associada à natureza hidrófoba dos mesmos, potencializa seus efeitos tóxicos pela bioacumulação. Em ambientes aquáticos, onde os sedimentos podem ser enriquecidos em concentração de compostos clorados, especialmente os clorofenóis, os efeitos biológicos decorrentes de bioacumulação via cadeia alimentar, são de

extrema importância (Carlberg et al., 1987; Talka & Priha, 1987), mormente se o atual agravamento da disponibilidade de água para consumo humano for considerado.

Atualmente existe uma forte tendência pela utilização de processos de branqueamento isentos do cloro elementar (processos ECF, Elemental Chlorine Free) e inclusive, isentos de qualquer insumo clorado (processos TCF, Totally Chlorine Free). Estes novos procedimentos permitiram a completa eliminação de compostos organoclorados adsorvíveis no efluente. O processo convencional de branqueamento de polpas que emprega cloro elementar gera um dos efluentes com índice de toxicidade estimado mais elevado (Soares et al., 1997; 2000; Pedrosa et al., 1997; Wilhelm Filho et al., 1997; Karels & Oikari, 2000). No entanto, alguns estudos demonstram que a toxicidade dos efluentes da indústria papelreira não é uma função exclusiva do teor de organo-halogenados totais (AOX). Isto significa que a utilização desta nova tecnologia de branqueamento permite reduzir a zero o nível de AOX nos efluentes, mas a toxicidade não é significativamente reduzida.

As técnicas universalmente utilizadas no tratamento de efluentes derivados da indústria papelreira são representadas por lagoas aeróbias e lodos ativados. Em geral, tratamentos anaeróbios são pouco utilizados. Normalmente, a toxicidade aguda é eliminada nas lagoas aeróbias; no entanto, ligninas cloradas de elevada massa molecular são resistentes à degradação por consórcios de bactérias isoladas destas lagoas. O sistema de lodos permite uma diminuição mais significativa de compostos clorados (40%), em comparação aos resultados conseguidos em lagoas aeróbias (25%). O processo consiste, basicamente, na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e oxigênio atmosférico, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. Embora este tipo de tratamento se mostre bastante eficiente, o sistema de lodo ativado apresenta o grande inconveniente de ser bastante susceptível à composição do efluente (cargas de choque), além de formar quantidades exageradas de lodo. Atualmente, existem programas que consideram a utilização destes lodos como fertilizantes para solo, contudo, muitas vezes o lodo não pode ser utilizado com fins agrícolas, devido à presença de determinados contaminantes.

Em países como Alemanha, Suécia, Finlândia, Canadá e Estados Unidos, o avanço tecnológico observado na indústria papelreira foi induzido por uma legislação eficaz quanto aos parâmetros e características a serem observados na avaliação da qualidade de efluentes industriais.

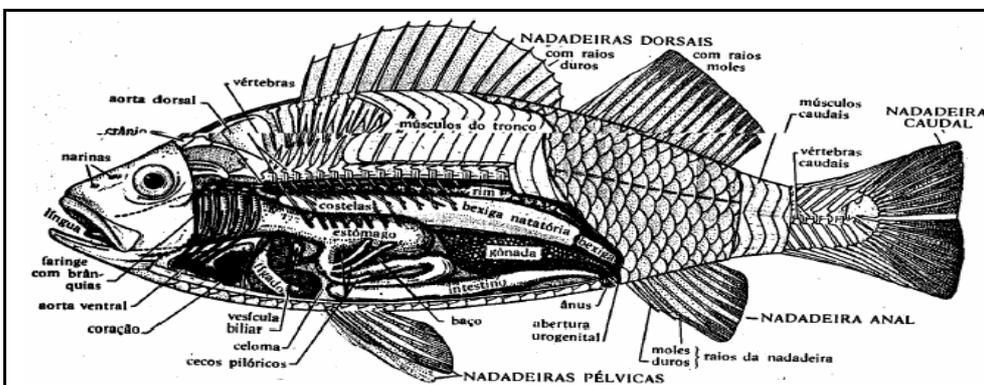
2.2. CARACTERIZAÇÃO DATILÁPIA DO NILO

A piscicultura vem se destacando na produção mundial de alimentos devido à alta produção, em curto espaço de tempo, e em espaços relativamente menores que os necessários para outros tipos de produção animal. No caso da produção de peixes, a tilápia é valorizada devido às suas características de altas taxas de reprodução, rápido crescimento e alta prolificidade.

Tem grande tolerância às temperaturas extremas, sendo que as mínimas letais variam de 8 a 13 °C e a máxima entre 38 e 44 °C, ambas dependentes da adaptação. A temperatura ideal é aquela entre 27 e 32°C. As tilápias toleram baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água. O pH ideal da água no cultivo de tilápias deve ser mantido entre 6 a 8,5. Abaixo de 4,5 e acima de 10,5 a mortalidade é significativa.

Através de um excelente filtro branquial e de uma produção de muco faríngeo, as tilápias conseguem aglutinar pequenas partículas, tendo um maior aproveitamento de alimento. Além disso, o estômago das tilápias é mais ácido (1,25 – 1,60) comparado aos de outros peixes, facilitando a digestão das algas e dos fitoplânctons.

QUADRO 7 – TILÁPIA DO NILO – VISTA INTERNA



FONTE: PADUA, D. M. C. (2005)

QUADRO 8 – CLASSIFICAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO

- **Classe:** Actinopterygii
- **Ordem:** Perciformes
- **Familia:** Cichlidae,
 subfamilia: Pseudocrenilabrinae
- **Gênero e espécie:** *Oreochromis niloticus*
- **Nome Comum:** Tilápia do Nilo

Introduzida no Brasil na década de 50 e originária do continente africano, atualmente a tilápia é um peixe encontrado em quase todo país, tanto em cultivos comerciais como em reservatórios e açudes.

Entre as várias espécies de tilápia utilizada na piscicultura, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Quadro 8 e 9), tem sido a mais cultivada.

QUADRO 9 – TILÁPIA DO NILO – VISTA EXTERNA



FONTE: PISCICULTURA TERRA MÃE (2006)

No gênero *Oreochromis*, as fêmeas realizam incubação oral dos ovos e proteção pós larvas. É um peixe que pode chegar a 5 quilos, 60 cm de comprimento e viver até 9 anos, tendo como habitat águas oceânicas, rios, estuários e lagos. Possui hábitos, principalmente diurnos e alimentam-se de fitoplâncton e/ou algas bênticas.

A desova freqüente e o cuidado parenteral por duas ou mais semanas consomem muita energia da fêmea, e faz com que praticamente não se alimentem durante este período. Por esta razão, as criações são focadas na produção de alevinos masculinos.

Na piscicultura de tilápias, objetiva-se o cultivo de machos por seu ganho de peso mais rápido, sendo assim, as pós-larvas, por apresentarem sexo indefinido, são alimentadas por 21 a 28 dias com ração contendo hormônios masculinizantes.

No cultivo de tilápias com o intuito de produção de carne (peso médio acima de 400 gramas / peixe) a técnica de reversão sexual para a obtenção de tilápias monossexo é de essencial importância para uma atividade economicamente viável.

Como as tilápias atingem a maturidade sexual entre o 4º e o 6º mês de vida, elas possuem uma alta capacidade de reprodução, e podem superpovoar o tanque de engorda antes mesmo de atingir os 400g desejados. Essa superpovoação de viveiros e tanques resulta em uma maior competição pelo alimento e, conseqüentemente, em um crescimento insatisfatório para uma atividade econômica. Além disto, as tilápias fêmeas utilizam uma grande parte de sua energia para a produção de óvulos em vez de converter essa energia em carne. Somado a esse problema, as fêmeas incubam seus ovos na boca protegendo as pós-larvas durante no mínimo 2 semanas e, logicamente, deixando de comer por este período. Assim, o macho chega a crescer até 2,5 vezes mais rápido que a fêmea (Brunello, 2004), tornando a obtenção de uma população monossexo de machos torna-se de grande eficiência na produção de carne de tilápias.

2.2.1. Fisiologia Reprodutiva

O processo reprodutivo em peixes é conhecido por ser significativamente mais variado do que nas outras classes de vertebrados, com algumas espécies sendo machos sexualmente maduros, e mais tarde convertendo-se naturalmente em fêmeas, ou vice-versa.

Em termos de filogenia, os agnatos da ordem Cyclostomata, são considerados os mais primitivos e os teleósteos os mais recente. O desenvolvimento gonadal nos teleósteos é completamente controlado pela pituitária, a qual é ligada ao hipotálamo por uma inervação direta e um sistema porta sanguíneo, como nos demais vertebrados. Nos teleósteos os hormônios esteroidais estão envolvidos na diferenciação das gônadas e ductos acessórios. O balanço entre andrógenos e estrógenos durante a diferenciação sexual determina quais gônadas sexuais serão desenvolvidas, como conseqüência, a determinação sexual genética pode ser alterada epigeneticamente cancelada.

Uma espécie de peixe gonocorista é definida pela existência de testículos ou ovários. O sexo gonadal é determinado durante a fase sensitiva do estágio de

desenvolvimento sexual e, naturalmente, não se modifica no decorrer da vida (Hahlbeck et al., 2004a). A maioria das espécies de peixes é gonocorista sob condições naturais, no entanto, a diferenciação sexual pode ser variável e sujeita as influências de fatores externos (Chan and Yeung, 1983; Patiño, 1997).

Intersexualidade (ou intersexo) é uma condição que muitas espécies de peixes gonocoristas têm, os quais possuem funções específicas de apenas um sexo, mas com suas gônadas contendo células que são geralmente típicas do sexo oposto (ovário-testículo ou testículo-ovário) (Sadovy and Shapiro, 1987). Intersexo pode ser definido, em linhas gerais, como co-ocorrência de tecido ovariano e testicular (Hahlbeck et al., 2004a).

Intersexualidade, ou mesmo a reversão total gonadal podem ser induzidas por certas condições ambientais, principalmente temperatura, ou pelo tratamento com hormônios esteróides. O período no qual as espécies gonocoristas são susceptíveis à ação de fatores externos coincide com o período de diferenciação sexual, e ambos diferem de espécie para espécie (Yamamoto, 1969; Chan and Yeung, 1983; Hunter and Donaldson, 1983; Piferrer et al., 1993; Blazquez et al., 1995, 1998b). Indivíduos que apresentam intersexualidade, algumas vezes são também chamados de hermafroditas (Brown e Scott, 1988). No entanto, mais estritamente, uma espécie é hermafrodita se uma substancial proporção de indivíduos, numa dada população, funciona como ambos os sexos, simultaneamente ou seqüencialmente, durante alguma etapa de sua vida (Sadovy and Shapiro, 1987). Embora, intersexualidade muitas vezes seja considerada anormal, em ciprinídeos como a carpa, aparenta ser normal, se ocorrer com baixa incidência (Komen et al., 1989; Jobling et al., 1998), sendo que 2–4% de intersexos foram observados em controles (Blazquez et al., 2001). Indivíduos apresentando intersexo são muitas vezes observados em peixes tratados com esteróides para induzir reversão sexual (Piferrer and Donaldson, 1989; Piferrer et al., 1993; Blazquez et al., 1995, 1998b).

Inúmeros estudos têm investigado a regulação neuroendócrina da reprodução em peixes maduros, incluindo eixo hipotálamo-hipófise, retro-alimentação esteróide e a liberação de gonadotropina (Liley e Stacey, 1983; Nagahama, 1994; Blazquez et al., 1998a; Habibi e Huggard, 1998; Kah et al., 1997).

A expressão do sexo é composta por dois eventos distintos, a determinação sexual e a diferenciação sexual. A determinação sexual é responsável pelo sexo genético, enquanto que a diferenciação sexual é responsável pelo desenvolvimento das gônadas (sexo gonadal ou fenotípico). A interação desses dois eventos resulta em dois fenótipos: macho ou fêmea, seja morfológica, comportamental, ou funcionalmente (Piferrer, 2001).

2.2.2. Determinação sexual

Geralmente a determinação sexual em peixes é mais variável que em mamíferos ou aves. O sexo genético é determinado na fertilização, pela combinação dos cromossomas provenientes do ovo e do espermatozóide (Yamazaki, 1983). A determinação sexual é definida como a soma de genes responsáveis pela formação das gônadas e de suas características. Esses genes podem estar espalhados pelo genoma ou a maioria deles concentrados em um par de cromossomas que, neste caso, são chamados de cromossomas sexuais. Três modelos de determinação sexual podem ser aplicados em peixes: cromossômico, poligênico e interação genótipo-ambiente (Piferrer, 2001).

Segundo Tabata [2000], a determinação sexual cromossômica é orientada por cromossomas sexuais em pares de cromossomas (denominados de heterocromossomas), os quais acumulam a maioria dos genes responsáveis pelo desenvolvimento sexual, apesar de a maioria dos peixes não apresentar heterocromossomas, não sendo morfologicamente distintos. Porém, com base em análises citogenéticas, reversão sexual e cruzamentos controlados, oito sistemas cromossômicos já foram descritos segundo Tave (1993). Estes sistemas variam desde sistemas simples, como XX/XY ou WZ/ZZ, até os mais complexos, envolvendo mais que um par de cromossomas sexuais ou diferentes números de cromossomas, dependendo do sexo. O sexo em que os cromossomas são iguais é chamado de homogamético, e heterogamético quando os cromossomas são diferentes.

QUADRO 10 – DETERMINAÇÃO SEXUAL EM VERTEBRADOS

Taxonomia (Classe, Ordem, Sub-ordem)	Determinação Sexual Genotípica		Determinação sexual Temperatura-dependente
	XX/XY	ZZ/ZY	
Mamíferos	!		
Aves		!	
Répteis			
Crocodilos			!
Tartarugas	!	!	!
Squamates			
Lagartos	!	!	!
Cobras		!	
Anfíbios			
Anuros	!	!	!
Urodélos	!	!	!
Peixes			
Teleósteos	!	!	!

XX/XY, macho heterogamético; ZZ/ZW, fêmea heterogamética
 FONTE: ADAPTADO DE PIEAU, C. ET AL., (1994).

Em termos de determinação sexual, os peixes exibem principalmente a influência genotípica (XX/XY e ZZ/ZW), conforme Quadro 10, porém também são muito importantes os fatores ambientais como temperatura, fotoperíodo, salinidade e altas densidades de estocagem. Diversos estudos mostram que fatores exógenos podem alterar a diferenciação sexual em várias espécies de peixes (Baroiller et al., 1995; Struessmann et al., 1997; Pavlidis et al., 2000), ressaltando a importância das condições ambientais, tanto na piscicultura quanto nas pesquisas envolvendo peixes.

Os sistemas cromossômicos XX/XY e ZW/ZZ são os mais frequentes entre as espécies cultivadas e, neles a proporção sexual na progênie não difere significativamente de 1:1. No sistema XX/XY, as fêmeas são homogaméticas, e os machos heterogaméticos, enquanto que no sistema ZW/ZZ, as fêmeas são heterogaméticas e os machos homogaméticos. A denominação de XY ou ZW é usada apenas para evitar confusões, quando se descreve os dois sistemas (Tave, 1993).

2.2.3. Diferenciação Sexual

A Diferenciação sexual em peixes é um processo muito instável e, em muitos casos, um alto grau de plasticidade fenotípica de caracteres sexuais continua por toda sua vida. A diferenciação sexual de gônadas em peixes acontece após incubação e, em muitas espécies, até mesmo anos após a incubação (Blazquez et al., 1998b). Durante o estágio inicial da vida, quando as gônadas ainda estão sexualmente indiferenciadas, a diferenciação gonadal de peixes permanece especialmente suscetível à ação de fatores endógenos e exógenos (Fenske e Segner, 2004). Inclui os primeiros eventos que ocorrem desde a gônada primordial, até a diferenciação completa em testículos ou ovários.

A diferenciação sexual ocorre próximo ao período final da absorção do saco vitelínico, quando se inicia a alimentação (Yamazaki, 1983). Nas trutas arco-íris, os primeiros sinais da diferenciação aparecem primeiro nas fêmeas, entre 18 e 28 dias após a eclosão, a uma temperatura de incubação de 11,5°C (Van den Hurk e Sloff, 1981). Dependendo da temperatura da água, as pós-larvas de tilápias definem seus sexos entre o 15° e o 30° dias. Nesses estágios iniciais do desenvolvimento, a diferenciação sexual é bastante lábil e a reversão completa e funcional dos sexos pode ser facilmente obtida pela administração de hormônios esteroidais (Yamamoto, 1969).

A natureza do indutor endógeno da diferenciação sexual ainda não está totalmente esclarecida, mas muitas evidências reforçam a idéia de que os esteróides sexuais são, de fato, indutores naturais da diferenciação sexual em peixes. Mais recentemente, pesquisas têm focado a importância das enzimas esteroidogênicas no processo da diferenciação sexual em peixes e outros vertebrados.

Também é sabido que as gônadas dos peixes desenvolvem capacidade de sintetizar esteróides sexuais logo no início de seu desenvolvimento.

2.2.4. Reversão

De acordo com Yamamoto (1969), desde a década de 30, vem se pesquisando o uso de hormônios para a manipulação dos sexos em peixes. Os resultados obtidos nesses estudos proporcionaram não somente informações sobre os mecanismos

genéticos da diferenciação sexual, mas também demonstraram as potencialidades de suas aplicações em espécies economicamente importantes, onde os cultivos monosexos são vantajosos (Tabata [2000]).

Sendo assim, é possível através de uma aplicação de hormônios obter uma população monosexo (macho ou fêmea) de tilápia ou outros peixes. O tipo de hormônio é que caracteriza uma população de machos ou de fêmeas. Em produção de tilápias busca-se 100% na reversão sexual e isso pode ser conseguido com a adição de hormônio masculinizante na ração como a metiltestosterona, a fluoximesterona, o acetato de trembolona, entre outros. A masculinização tem sido conduzida usando-se 17 alfa-metiltestosterona (MT), o qual é sintético e mais potente do que os hormônios naturais e, portanto, a dose empregada é menor. Por outro lado, por demandar maior tempo para ser degradado na natureza é mais nocivo ao ambiente. A reversão sexual pode ocorrer também pela imersão das pós-larvas em água contendo o hormônio, mas neste caso os resultados são inconstantes e o gasto de hormônio é superior à técnica de adição à ração. O desempenho esperado na reversão sexual após o 28º dia é de sobrevivência maior que 85%, tamanho dos alevinos entre 3 a 5 cm e principalmente com índice de reversão acima de 99% (Brunello, 2004).

Não há na literatura relatos que indiquem a possibilidade de tilápias revertidas voltarem ao seu sexo original. Tilápias revertidas são machos funcionais e não produzem ovos. Outro ponto interessante é que o macho funcional tem a capacidade de reproduzir-se com outras fêmeas, mesmo que seu genótipo seja de fêmea e que apenas apresente aparência de macho. Em comparação, no cruzamento de uma população de machos normais " XY " de tilápias com fêmeas normais " XX " obtêm-se uma F-1 (primeira geração) de pós-larvas igual a 50% de machos XY e 50% de fêmeas XX. Já no cruzamento de machos que sofreram reversão hormonal " XX " com fêmeas normais " XX ", obtêm-se uma F-1 com 100% de fêmeas XX. Portanto, não se recomenda o uso de machos revertidos para a produção de pós-larvas, pois com o índice de 100% de fêmeas, seria difícil conseguir atingir os 99% de reversão desejada (Brunello, 2004).

Como é utilizada uma substância sintética, no caso do hormônio, muita dúvida é gerada em torno deste ponto, pois busca-se saber o nível residual do hormônio no peixe. A taxa de declínio do resíduo é bastante rápida, em torno de 120 a 150 dias, porém incompleta. Peixes revertidos exibem concentrações de hormônio mais elevadas do que peixes não tratados. Sendo assim, um ser humano deveria comer de 500 a 2500 Kg de filé de tilápia diariamente para ingerir o equivalente a uma dose diária de metiltestosterona usada em tratamentos médicos (Brunello, 2004).

2.2.5. Avaliação da eficácia da reversão sexual

Para ter certeza de que um peixe é macho devem-se analisar suas duas gônadas, porém, somente após o 3º ou 4º mês de idade, o qual pode acarretar em um maior custo para a obtenção dos resultados na relação custo benefício da produção (Brunello, 2004).

Outro método é a visualização das gônadas através da microscopia, a qual pode ser aplicada ao final da reversão, ou no máximo 15 dias após a reversão dos peixes. Essa técnica permite a classificação de indivíduos machos, intersexos e fêmeas. A presença de ovócitos nas gônadas indica uma fêmea. Gônadas com aspecto granular e sem a presença de ovócitos indicam um macho, e finalmente, gônadas que apresentam áreas com ovócitos e o restante com aparência granular como os machos, indicam indivíduos intersexo os quais não foram completamente revertidos (Brunello, 2004).

2.3. XENOBIONTES E AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL

Enquanto muitos estudos sobre substâncias que causam alterações na fisiologia endócrina humana são individuais, a preocupação com os animais estende-se à população e à perpetuação da espécie dentro do ecossistema estudado.

Já é bem documentado que muitos agentes químicos naturais e antropogênicos interferem nos organismos vertebrados e invertebrados (Fry e Toone, 1981; Colborn et al., 1993; Bergeron et al., 1994; Sumpter, 1995; Matthiensen e Gibbs, 1997; Tillmann

et al., 2001). O impacto de diferentes tipos de efluentes de atividades humanas sobre várias espécies de peixes tem sido reportado em diferentes regiões do mundo (Vos et al., 2000).

As conseqüências da exposição de vertebrados a xenobióticos em ambientes aquáticos têm sido o foco de muitos estudos nos últimos anos (ex. Sumpter, 1998; Tyler et al., 1998; Lister and VanDer Kraak, 2001). Pesquisadores têm usado uma grande variedade de técnicas para investigar em peixes os impactos da exposição a agentes químicos, incluindo pesquisa de campo (Folmar et al., 1996; Sepúlveda et al., 2002), experimentos em rios artificiais (Dubé and MacLatchy, 2000), e estudos em laboratório (Tremblay and Van Der Kraak, 1998; McArdle et al., 2000; Dubé and MacLatchy, 2001). Poluentes ambientais tais como metais, pesticidas e outras substâncias orgânicas são sérios riscos a muitos organismos aquáticos. A concentração na qual o composto é letal pode depender de muitos fatores, incluindo a característica da espécie e a qualidade da água (Scott e Sloman, 2004).

Efluentes de indústrias de papel e celulose podem causar, sobre organismos aquáticos, desde modificações de comportamento e de distribuição populacional (Munkittrick et al., 1994) até efeitos mais drásticos como diminuição da taxa de crescimento individual, hipertrofia e disfunção hepática e renal (Munkittrick et al., 1991), aumento do nível de certas oxidases hepáticas (Munkittrick et al., 1991), desenvolvimento irregular ou atrofia de gônadas (Owens, 1991), maturação sexual irregular e comprometimento da reprodução em peixes, deformação vertebral (Munkittrick et al., 1991), alterações morfológicas em células sangüíneas (Owens, 1991, Soares et al., 2000), alteração do nível de esteróides sangüíneos (MacLatchy et al., 1997), modificações fisiológicas e histopatológicas (Owens, 1991, Soares et al., 2000). Também a capacidade mutagênica de alguns compostos existentes nestes efluentes, tais como cloroguaiacóis e clorocatecóis, tem sido claramente evidenciada (Krinstad & Lindstrom, 1984 ; Souza, 2006).

Grandes esforços têm sido empregados para gerar dados sobre toxicidade baseados em testes cuja referência é a morte fisiológica (i.e., mortalidade) de animais aquáticos, porém, testes de letalidade aguda ignoram ‘morte ecológica’ que pode

ocorrer após exposição de baixa toxicidade. Mesmo que os animais não fiquem visivelmente debilitados por um contaminante, eles podem perder a função num contexto ecológico se o seu comportamento normal estiver alterado.

Em verdade, análises de poluentes em ecossistemas naturais muitas vezes mostram concentrações bem abaixo daquelas que causam significativa mortalidade (Jensen e Bro-Rasmussen, 1992; Cabrera et al., 1998; Norris et al., 1999), mascarando assim os efeitos de toxicidade em longo prazo. Portanto, uma grande quantidade de pesquisas tem sido conduzida para entender os efeitos da toxicidade na fisiologia e sobrevivência de muitos animais (e.g., Wood, 2001). Normas regulatórias para poluentes aquáticos em ecossistemas naturais têm sido tradicionalmente baseadas nos testes de letalidade agudos tal como LC50 - 96h (CCME, 1999; USEPA, 2001), apesar de que impactos no desenvolvimento, crescimento e reprodução tenham sido considerados (Rand e Petrocelli, 1985).

2.3.1. Bioindicador

Peixes constituem um dos grupos de animais selvagens mais profundamente estudados em termos de efeitos de agentes químicos sobre o desenvolvimento do processo reprodutivo. (U.S. Environmental Protection Agency. 1997; Jobling et al., 1998, 2003, Ternes et al., 1999, Pojana et al., 2004)

Peixes são considerados um modelo apropriado para pesquisa de substâncias endócrino desreguladoras (SED) porque seu ambiente é muito exposto a múltiplas origens de SEDs, tais como esgotos, efluentes industriais e águas correntes de áreas urbanas e agrícolas (Kazeto et al., 2004).

O mummichog *Fundulus heteroclitus* é altamente responsivo a andrógenos e anti-andrógenos (Sharpe et al., 2004). O *Fundulus heteroclitus* também é sensível a contaminantes com atividade hormonal. Vários estudos têm mostrado que o *mummichog* responde a efluentes de indústrias, incluindo aqueles provenientes do processo de branqueamento (Leblanc et al., 1997; Couillard and Nellis, 1999; Dubé and MacLatchy, 2000, 2001; McArdle et al., 2000). Da mesma forma, as tilápias têm sido utilizadas em estudos em nosso laboratório, demonstrando ótima sensibilidade

para pesquisas sobre desregulação hormonal como efeito de exposição a efluentes de papel e celulose, corroborando com Segner et al. (2003).

Vários grupos de pesquisa têm realizado um considerável esforço, de interesse internacional, para o desenvolvimento de uma padronização de ensaios laboratoriais com peixes (Gray et al., 1997; OECD, 1999; Ankley et al., 2001), que possam ser usados para testar e classificar substâncias com potencial para atuar como desreguladoras endócrinas (Sharpe et al., 2004).

2.3.2. Marcadores Bioquímicos (biomarcadores)

Marcadores ou indicadores bioquímicos caracterizam-se pela possibilidade de representar a condição orgânica, de modo geral ou específico, num determinado momento. Análises de marcadores poderiam, por exemplo, identificar uma alteração na estrutura ou função de um sistema ou órgão.

Soares e Mosimann (2000), caracterizam indicadores bioquímicos como sendo baseados em alterações metabólicas e assim, revelando a resposta orgânica, antes que manifestações clínicas drásticas comecem a se evidenciar. Diversos pesquisadores tem voltado seus estudos para a caracterização de biomarcadores em animais aquáticos, e particularmente em peixes, com resultados eficazes (Thomaz, 1990; Lehtinen, 1992; Johsen, 1995; D'surney et al., 2000). A maioria dos estudos que investigam a desregulação endócrina tem sido focada em peixes, segundo Segner et al. (2003).

Para o estudo da toxicidade de xenobióticos presentes em efluentes industriais, uma grande variedade de técnicas que utilizam biomarcadores tem sido desenvolvida. Como rotina, as metodologias utilizadas, tem como objetivo testar a sobrevivência de um determinado organismo (Baptista et al., 2000).

Elevada incidência de intersexo e de proporção de desvios sexuais são muitas vezes usados como um indicador para a desregulação sexual em peixes expostos a agentes químicos com atividade estrogênica (Hahlbeck et al., 2004a).

A partir de estudos em mamíferos, sabe-se que esteróides sexuais são a chave na origem da diferenciação sexual no cérebro, portanto, influenciando todos os

aspectos da reprodução - do desenvolvimento das gônadas sexuais ao comportamento sexual (Balthazart, 1989; Balthazart e Ball, 1998). Os indutores endógenos naturais de diferenciação sexual em peixes são os esteróides sexuais. Estrógenos atuam com indutores femininos e andrógenos com indutores masculinos, conforme postulado por Yamamoto (1969), de acordo com seus estudos pioneiros em medaka (*Oryzias latipes*). Desde então, acumulam-se evidências sobre a função chave dos esteróides sexuais na diferenciação sexual de peixes (Hunter e Donaldson, 1983; Pandiam e Sheela, 1995; Baroiller et al., 1999; Nakamura et al., 1998; Guiguem et al., 1999).

Baseado na excreção diária de estrógenos por humanos e fatores de diluição, bem como por observações de campo, níveis de SED, naturais e sintéticos, inferiores à faixa de ng/L a ug/L são esperados em qualquer ambiente aquático afetado por atividades humanas. Um grande número de estudos, em peixes, sobre efeitos estrogênicos de agentes químicos ou efluentes, foi iniciado como consequência de observação de “hermafroditas” em *Rutilus rutilus* por pescadores em águas do Reino Unido que recebem efluentes de tratamento de esgotos (Harries et al., 1996; Matthiessen e Sumpter, 1998). Adicionalmente, foi reportada via parâmetros genéticos, a feminilização de carpa macho (*Cyprinus carpio*), após exposição a alquifenóis (Gimeno et al., 1996).

Marcadores genéticos para cromossomos sexuais estão sendo de valor inestimável para a comprovação da ocorrência de reversão sexual em laboratório e em população de campo. Tais marcadores não são similares entre espécies e têm sido desenvolvidos apenas para poucas espécies de peixes. Em muitas espécies o sexo genético é desconhecido devido à falta de marcadores genéticos ou por cromossomos discerníveis, então o sexo tem sido identificado somente com ajuda do tipo das células gonadais e da aparência das características sexuais externas nos indivíduos maduros (Hahlbeck et al., 2004a). O aspecto do gonoduto também pode ser utilizado como referência para avaliação de desregulação de desenvolvimento sexual, especialmente quando o sexo genético de cada peixe é conhecido (Hahlbeck et al., 2004a).

Outros indicadores de desregulação endócrina são as características sexuais secundárias (Cody and Bortone, 1997; Larsson et al., 2002) e marcadores bioquímicos estrógenos-induzidos ou andrógenos-induzidos. Elevada concentração de vitelogenina

encontrada em machos ou jovens tem sido muitas vezes encontrada junto com a ocorrência de intersexos e outras falhas de desenvolvimento ou reprodução (Gimeno et al., 1997; Jobling et al., 1998).

Alterações na *spiggin*, uma proteína responsável por formar uma espécie de cola entre os ovos recém postos, é o primeiro marcador bioquímico para desregulação endócrina androgeno-induzida em peixes. O epitélio renal fica espessado e o nível de *spiggin* aumenta após a exposição à metil-testosterona (MT) e ao estradiol (E2) (Hahlbeck et al., 2004b).

De acordo com Allard et al., (2004), o fígado é o principal sítio de biotransformação de tóxicos e substâncias endógenas, e seus metabólitos podem ser excretados diretamente pela bile. Um composto que é eliminado pela bile pode então ser eliminado pelas fezes ou ser reabsorvido e ser excretado pela urina. No entanto, os estrógenos têm duas principais vias de eliminação, a via renal e a via intestinal, através da bile nas fezes. Porém, a reabsorção intestinal só é possível se os compostos forem suficientemente lipossolúveis. Esteróides estrogênicos normalmente tem de baixa a moderada solubilidade em água. Para facilitar a excreção, esteróides são conjugados como glucoronídeos ou sulfatos, dos quais é a forma mais importante nos peixes (Truscott, 1979). Estes conjugados são mais polares e mais facilmente excretados, mas não são totalmente lipossolúveis para serem reabsorvidos no intestino. No entanto, a microflora intestinal pode hidrolisar os conjugados glucoronídeos e sulfatos em metabólitos mais solúveis que podem ser mais prontamente absorvidos. Repetidas reabsorções podem prolongar a meia-vida do metabólito no organismo e, assim, aumentar o tempo de exposição e, conseqüentemente, seus efeitos (Cassarett e Doull, 1996).

2.3.3. Desregulação Endócrina

Poluentes ambientais que podem alterar as funções endócrinas têm sido identificados em maior número nos últimos anos, devido à ampla ocorrência de tais agentes químicos no ambiente aquático e seu potencial risco a ambos, ambiente

aquático (Körner et al., 2001) e vida humana (Commission of the European Communities, 1999).

As chamadas substâncias endócrino desreguladoras (SEDs) são aquelas com o potencial de interferir na função do sistema endócrino. SEDs tem sido definidas como agentes exógenos que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, e na ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, responsáveis pela manutenção da homeostasia e a regulação do processo de desenvolvimento.

Nos últimos anos, consideráveis esforços de pesquisa têm sido focalizados nos compostos químicos produzidos pelo homem que podem modular e/ou desregular o sistema endócrino nos vertebrados incluindo teleósteos (Colborn et al., 1993; Sumpter, 1998, Kazeto et al., 2004, Allard et al., 2004).

Possíveis efeitos adversos à saúde reprodutiva devido à ação de SEDs têm sido observados em populações selvagens de peixes (Jobling et al., 1998; Hashimoto et al., 2000; Larsson et al., 2000). O efeito potencial dos assim chamados compostos químicos desreguladores endócrinos sobre reprodução de peixes tem estimulado o interesse em pesquisas nos últimos anos (Colborn et al., 1993; Jobling et al., 1998).

Estudos sobre desregulação endócrina em ambientes aquáticos têm sido predominantemente voltado aos efeitos das substâncias estrógenas em rios e estuários (Purdom et al., 1994; Allen et al., 1999; Mochida et al., 2004). Entretanto, com relação aos efeitos das substâncias androgênicas e sua identificação, poucos estudos têm sido reportados (Howell et al., 1980; Thomas et al., 2002a, 2004).

Distúrbios na fisiologia da reprodução de peixes vivendo em águas contaminadas com efluentes de papel e celulose têm sido observados, incluindo indução de desvios de funções nas atividades de oxidase, redução dos níveis de esteróides sexuais e redução na reprodução (Owens, 1991; Munkittrick et al., 1998).

Alguns pesquisadores têm relatado que a avaliação da potência de agentes químicos com atividade hormonal, bem como seus mecanismos de ação (Harries et al., 1997; Islinger et al., 1999; Pawlowski et al., 2000; Thorpe et al., 2001, 2003) somente podem ser determinados usando bioensaios *in vitro* (Soto et al., 1991, 1995; Routledge and Sumpter, 1996; Pawlowski et al., 2003, 2004). Argumenta-se ainda que sistemas

in vivo também são necessários para melhor caracterização destes agentes químicos, particularmente para estimar sua potência hormonal (Kloas et al., 1999; Braunbeck et al., 2001).

2.3.4. Efeitos Estrogênico e Androgênico

A grande maioria dos estudos relatando a desregulação endócrina em peixes tem focalizado os efeitos dos xenoestrógenos (e.g., MacLatchy e Van Der Kraak, 1995; Routledge et al., 1998; Tremblay e Van Der Kraak, 1998; Kelly e DiGiulio, 2000; McArdle et al., 2000). Poucos estudos têm examinado as conseqüências de exposição a substâncias androgênicas e anti-androgênicas. O presente entendimento dos efeitos anti/andrógenos nos peixes, vem da soma dos estudos usando xenobióticos (Baatrup e Junge, 2001; Makynen et al., 2000), hormônios endógenos (Davie e Thorarensen, 1997; Kobayashi e Nakanishi, 1999), e esteróides artificiais (Singh e Joy, 1998).

O E2 é o mais potente estrógeno biologicamente ativo, naturalmente sintetizado nos ovários das fêmeas, enquanto estrona (E1) é o principal produto da degradação ocorrido no fígado (Pojana et al., 2004). Em virtude de, em pessoas, o E2, E1 e etinil-estradiol (EE2) e mestranol (MES) serem excretados na urina, efluentes finais de tratamento de esgoto industrial e esgotos municipais não tratados são a origem primária de estrógenos esteroidais naturais e sintéticos em ambientes aquáticos (Pojana et al., 2004). Verificando-se estudos que descrevem a ação de estrógenos e anti-estrógenos em peixes, constata-se que poucos têm pesquisado os efeitos anti-androgênicos sobre a condição endócrina reprodutiva, mesmo que substâncias anti-androgênicas (ex. efluentes de papel e celulose, Hewitt et al., 2000; Durhan et al., 2002, e pesticidas Makynen et al., 2000; Baatrup and Junge, 2001), possam ser encontradas em ambientes aquáticos.

Existe muito interesse em torno dos efeitos dos compostos estrogênicos em ambientes aquáticos sobre a espermatogênese de peixes. No entanto poucas pesquisas têm sido direcionadas ao mecanismo molecular pelos quais SEDs podem exercer tais efeitos (Mochida et al., 2004).

Recentes pesquisas mostraram que de acordo com Hornung et al. (2004) e Zerulla et al. (2002), o andrógeno sintético 17 α -Metiltestosterona apresenta ambos os efeitos em peixes, androgênico e estrogênico, em acordo com a aromatização parcial de andrógenos para estrógenos. Quando peixes são tratados com testosterona (T) ou metil-testosterona (MT), em altas doses ou por períodos extensos, estes andrógenos ganham potencial de feminilização (Hahlbeck et al., 2004a). Hoje é largamente aceito que esta paradoxal feminilização é o resultado da aromatização de andrógenos para estrógenos (Krisfalusi and Cloud, 1999; Kwon et al., 2000).

Muitos estudos indicam que andrógenos ou moléculas com efeitos tipo andrógenos ocorrem em efluentes de tratamento de esgotos industriais com concentrações de 2 a 4033 ng/L dihidrotestosterona equivalente (Kirk et al., 2002; Thomas et al., 2002b). Estas concentrações de andrógenos em alguns efluentes de esgotos industriais tratados são consideravelmente mais altas que as de estrógenos esteróides (acima de 88 ng/L para 17- β estradiol e 220 ng/L para estrona, respectivamente; Rodgers-Gray et al., 2000).

A presença de múltiplos esteróides que tem a capacidade de se ligarem a receptores, incluindo a androstenediona, tem sido recentemente demonstrada em diferentes efluentes de indústrias de papel e celulose, mas a maioria dos ligantes e seus respectivos potenciais precisam ser identificados (Hewitt et al., 2000; Jenkins et al., 2001; Parks et al., 2001). A masculinização tem sido reportada em águas próximas a efluentes de papel e celulose na Suécia, onde uma baixa porcentagem de embriões fêmea foi encontrada em fêmeas grávidas de *Zoarcis viviparus* (Larsson and Forlin, 2002), mas o sexo genético dos indivíduos não foi determinado.

Estudos de campo e laboratório com *Gambusia affinis*, peixe mosquito, e outros poecilídeos (Bortone e Davis, 1994; Cody e Bortone, 1997) indicam que, neste caso, ocorre a modificação inclusive de caracteres sexuais secundários de fêmeas, as quais adquirem caracteres típicos de machos, em ambientes cronicamente contaminados com efluentes de papel e celulose. O grau de masculinização que certa população apresenta pode ser correlacionado com o grau de exposição dos peixes, sendo assim indicado como um possível biomarcador de contaminação. Por outro lado, outras espécies de

peixes não demonstram o mesmo comportamento. Vários estudos com carpa (*Cyprinus carpio*, Gimeno et al., 1997) e truta (*Oncorhynchus mykiss*, Jobling et al., 1996) evidenciaram o potencial de alquilfenóis em induzir modificações bioquímicas e fisiológicas que caracterizam a feminilização de machos, como por exemplo, a produção hepática de vitelogenina e Zr proteínas, as quais estão envolvidas no processo de fertilização de fêmeas. Da mesma maneira, alterações da concentração de esteróides sexuais têm sido relatadas em peixes expostos a efluentes (MacLatchy et al., 1997).

O desenvolvimento do gonopódio em fêmeas de peixe-mosquito no Rio Fenholloway, Florida (Parks et al., 2001) tem sido identificado como uma resposta à contaminação andrógena em efluente de papel e celulose. Um específico composto associado com atividade androgênica foi inicialmente postulado como sendo a androstenediona (Jenkins et al., 2001), e outros andrógenos além de androstenediona por estudos mais recentes (Durhan et al., 2002). Hewitt et al. (2000) afirmam que um fraco desempenho reprodutivo em peixes de vida selvagem tem sido associado ao rápido acúmulo de ligantes biodisponíveis que ocupam receptores esteróides andrógenos, quando expostos ao efluente de uma fábrica com branqueamento em Ontário.

A metil testosterona liga-se com alta afinidade a receptores andrógenos em peixes (Sperry and Thomas, 1999) e induz o desenvolvimento de tubérculos sexuais masculinos em *fathead minnow*, *Pimephales promelas* (Ankley et al., 2001).

É evidente que existem diferenças fisiológicas entre as espécies de peixes relativamente a receptores andrógenos, que resultam em diferenças nas respostas a compostos anti-androgênicos (Wells e Van Der Kraak, 2000).

Peixes do gênero *Poecilia* vivendo em exposição a efluente de papel e celulose exibem masculinização do orifício anal feminino; efeito semelhante ao desenvolvimento do gonopódio (órgão copulatório) (Howell et al., 1980; Bortone and Drysdale, 1981; Bortone et al., 1989; Cody and Bortone, 1997; Bortone and Cody, 1999; Parks et al., 2001). Em adição ao desenvolvimento do gonopódio em fêmeas, o comportamento reprodutivo masculino em fêmeas de peixe-mosquito (*Gambusia* sp.) tem sido descrito após exposição ao efluente de papel e celulose ou fitoesteróides

microbiologicamente degradados (Howell et al., 1980; Krotzer, 1990). Nenhuma mudança histológica visível nos ovários foi encontrada em fêmeas masculinizadas de peixe-mosquito (Hunsiger et al., 1988), mas a redução na fecundação foi observada em fêmeas coletadas de um rio contaminado com efluente de papel e celulose quando comparada com fêmeas não expostas (Rosa-Molinar e Willians, 1984).

Jenkins e colegas (2001) fracionaram a água contaminada com efluente de papel e celulose na tentativa de identificar os andrógenos ativos, e encontraram atividade androgênica em duas frações, uma destas contendo o composto androgênico androstenediona. No entanto, quando Durhan et al. (2002) testaram o efluente do mesmo rio para atividade andrógena, ele demonstrou que a fração contendo androstenediona tinha muito baixa atividade androgênica. Assim, o agente específico da causa ainda não foi bem identificado, mas andrógenos produzidos microbiologicamente ainda são o foco principal como causadores de masculinização de fêmeas encontradas no rio, abaixo do ponto de despejo de efluentes de papel e celulose (Toft et al., 2004).

2.3.5. Mecanismos de Desregulação Endócrina

Os mecanismos de ação de muitos agentes suspeitos de afetar um ou mais aspectos da função reprodutiva, ainda não foram totalmente determinados. Um agente químico pode envolver múltiplos sítios de ação e complexos distúrbios nos processos homeostáticos.

Desreguladores endócrinos e seus metabólitos podem se estruturalmente similares aos ligantes endógenos, interagir diretamente com o ligante do receptor fisiológico nas células das gônadas ou órgãos acessórios sexuais. Isto pode mimetizar a ação do hormônio resultando numa estimulação do receptor em efeitos biológicos (agonista), (e.g., metoxicloro, um fraco estrógeno; Laws et al., 1995), ou podem bloquear ou reduzir a ligação e sua atividade biológica dos hormônios naturais presentes (antagonista) (metabólitos de vinclozolin, anti-andrógenos; Kelce et al., 1994).

Existe um grande número de mecanismos pelos quais os xenobióticos podem afetar o sistema endócrino. Por exemplo, compostos com homologia estrutural com

hormônios esteroidais reprodutivos (e.x. andrógenos e estrógenos) atuando como substâncias endócrino-desreguladoras por se ligarem a receptores estrógenos (ex. alquifenóis; Kelly and DiGiulio, 2000) ou andrógenos (ex. 1,1 dicloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etileno (*p,p'*-DDE); Gray et al., 1997).

As desordens no receptor estrógeno devido a xenobióticos, têm sido reveladas como um dos principais mecanismos de desregulação endócrina (Gray et al., 2002). Desregulação de receptores estrógenos de sinalização por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, também tem sido relatado, devido à ativação do receptor aril-hidrocarboneto (Vondracek et al., 2004). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos têm sido apontados como interferentes de várias vias endócrinas, afetando, por exemplo, a mediação das sinalizações dos receptores estrógenos ou andrógenos (Clemons et al., 1998; Vinggaard, 2000).

Hidrocarbonetos alogenados aromáticos também têm sido reportados como responsáveis por anormalidades endócrinas e o mecanismo de ação envolvendo a ligação entre o receptor aril-hidrocarboneto numa evolucionariamente conservada ligação com fator de transcrição ativada (Aluru e Vijayan, 2004). O ligante unido ao heterocomplexo receptor aril-hidrocarboneto transloca-se dentro do núcleo e forma um hetero-dímero com o translocador nuclear aril-hidrocarboneto, os quais então interagem com a resposta do elemento xenobiótico e o cofator transcricional para regular a transcrição de vários genes de receptor aril-hidrocarboneto (Hahn, 1998).

Além de ligarem-se ao receptor, também podem desregular a síntese hormonal, transporte, metabolismo e depuração, resultando em mudança organizacional e funcional (Sharpe et al., 2004). A desregulação do processo de organização pode resultar em mudança permanente, enquanto mudanças funcionais podem ser reversíveis e transitórias (Lister e Van Der Kraak, 2001).

Estrógenos ambientais exercem sua atividade hormonal através da clássica via de ação dos receptores de hormônios esteróides, como por exemplo, ligando-se como os ligantes para os receptores estrógenos, e o complexo ligante-receptor subsequentemente ativa a transcrição dos genes-alvos (Tsai and O'Malley, 1994).

Um modo alternativo de ação seria modificar a via de sinalização pós-receptor dentro das células, entretanto, efeitos podem também resultar de alterações em altos

níveis de organização dentro do corpo, por exemplo, interferência no eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, no eixo cérebro-pituitária-tiroide, ou em neurotransmissores no sistema nervoso. Efeitos indiretos podem também resultar de indução química ou inibição de enzimas metabólicas, causando mudanças na produção ou eliminação de hormônios endógenos ou alterações em proteínas carreadoras no sangue.

Um químico pode ser diretamente ativo ou pode atuar indiretamente, requerendo ativação metabólica inicial. Assim, a desregulação da secreção endócrina, ligação ao receptor, controle *feedback* ou atividade-alvo, podem ser afetadas por ação em diversos sítios. Quando se observa uma alteração na atividade hormonal, muitas vezes não é entendido o quanto isto resulta de um efeito primário sobre secreção hormonal e sobre a subsequente interação com receptores, ou se o efeito é uma resposta a um dano orgânico ou algum outro mecanismo.

Efeitos de exposição num período de sensibilidade crítica do ciclo de vida (ex. durante desenvolvimento embrionário) têm sido nomeados “efeitos organizacionais” porque eles podem determinar uma modificação estrutural permanente de vários sistemas corporais. Pelo fato de que estes efeitos se manifestam em estádios jovens, seu impacto pode não ser sentido em fases posteriores, possivelmente não observados na fase adulta. Quando os organismos são expostos durante a fase adulta, os efeitos sobre o sistema endócrino são muito comumente transitórios e têm sido denominados “efeitos ativacionais”.

O córtex da adrenal é um dos tecidos-alvo da toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos alogenados, incluindo a corticosteroidogênese, segundo trabalhos citados por Aurun e Vijayan (2004). Nos teleósteos, este tecido é inter-renal. O ponto-chave na via esteroideogênica para a produção de corticosteróides inclui a proteína esteroideogênica regulatória aguda, o lado de clivagem da cadeia do citocromo P450 e as enzimas 11 β -hidroxilases. A proteína esteroideogênica regulatória aguda está envolvida na translocação do colesterol, precursor para produção de hormônios esteróides, de fora para dentro da membrana mitocondrial e a disponibilidade dela para citocromo P450, os quais iniciam a biossíntese de esteróides (Stocco, 2000). Recentes estudos mostraram que ativação de receptores aril-hidrocarboneto inibiram a ativação inter-renal da corticosteroidogênese em peixes (Aurun e Vijayan, 2004).

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a toxicidade crônica do efluente de indústria de papel e celulose (Klabin S.A.) em tilápias adultas, particularmente com relação à possível alteração dos níveis de hormônios sexuais e outros esteróides plasmáticos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1. Realizar análises físico-químicas (pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, DQO e DBO) em amostra de efluente;

3.1.2. Realizar análises bioquímicas, utilizando sangue de peixes expostos ao efluente e controles, quanto aos parâmetros: proteínas totais, níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL, concentração de estradiol e testosterona, hematócrito.

3.1.3. Mensurar cada peixe coletado visando obter o peso corporal e separadamente os pesos de fígado e gônadas para avaliar os índices somáticos correspondentes.

3.1.4. Avaliar histologicamente as gônadas de peixes machos e fêmeas.

3.1.5. Correlacionar as possíveis alterações nos níveis dos diversos biomarcadores em estudo com a exposição dos peixes aos efluentes, visando estabelecer uma seqüência temporal de eventos bioquímicos e fisiológicos de forma integrada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PEIXES

Os peixes estudados (n = 30♂ e 30♀) foram tilápias (*Oreochromis niloticus*) adultas, machos e fêmeas, peso entre 20-70g e idade entre 6 e 8 meses. A classificação sexual foi baseada em observação dos orifícios genitais.

Os peixes foram capturados em um açude no bairro Ingleses, Florianópolis, SC, cuja qualidade da água tem sido mantida sob condições controladas, e em seguida trazidos para o Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica na UFSC. Foi realizado um período de aclimatação por 60 dias em tanques de 310L, mantendo machos e fêmeas separados. As condições ambientais de laboratório foram controladas, com temperatura de 24-26°C e iluminação em fase claro/escuro (12/12h). As tilápias foram alimentadas com ração comercial uma vez ao dia, pela manhã, e sob aeração constante.

4.2. EFLUENTE

Foi utilizado o efluente final do processo de produção de polpas branqueadas por processo convencional: O – C – E – D – E , onde O = tratamento com O₂, C = tratamento com Cl₂ , D = tratamento com dióxido de cloro e E = tratamento com NaOH. O efluente foi previamente tratado pela indústria Klabin através da tecnologia de lagoas aeradas. A indústria está localizada no município de Correia Pinto, SC.

O efluente foi armazenado em bambonas de material plástico, mantidas sob proteção da luz solar e em temperatura ambiente.

O efluente chegou ao laboratório com as seguintes características: pH 6.8 e Condutividade 0,968 ; Oxigênio Dissolvido 7,0 – 7,6 mg/L, Demanda Química de Oxigênio 432 mg/L, Demanda Bioquímica de Oxigênio 742 mg/ml.

As análises físico-químicas de água e efluentes (DBO, DQO, pH, condutividade elétrica, e O₂ dissolvido), foram realizadas segundo normas descritas por método-padrão APHA (APHA AWWA, 1998).

4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA

Para estes experimentos foram utilizados 72 peixes, sendo um grupo de 30 peixes fêmeas, outro de 30 peixes machos, e mais 2 grupos controle divididos em 6 peixes machos e 6 fêmeas, mantidos durante 5 semanas em tanques plásticos de 310 L. Foram analisados 14 animais por semana, sendo 6 fêmeas e 6 machos em exposição ao efluente diluído (1/100) e de maneira idêntica, 2 peixes controles, não expostos ao efluente.

O sangue foi coletado da veia caudal com uma agulha 25x7G acoplada a uma seringa de 3ml e heparinizada. O sangue coletado foi depositado em tubos Eppendorf dispostos em recipiente com gelo para transporte até a centrifuga. Destes Eppendorf preencheram-se tubos capilares para microhematócrito, vedados com massa apropriada.

Com a centrifugação do sangue obteve-se o plasma para a realização das dosagens bioquímicas.

Após a coleta de sangue, fez-se a eutanásia dos peixes por secção da medula espinhal. Em seguida, foi medido o comprimento e o peso do corpo e coletado o fígado e as gônadas para pesagem individual. Os fígados e gônadas foram fixados em formol a 10% e tamponado, e em seguida encaminhados para preparação de lâminas para estudo histopatológico.

4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas de metabólitos sangüíneos e parâmetros hematológicos foram realizados através de técnicas convencionais em análises clínicas. A determinação da concentração de estradiol e testosterona foi feita por quimiluminescência. Os metabólitos plasmáticos, proteínas totais, globulina, albumina, colesterol total e fração HDL, foram dosados por colorimetria utilizando-se kits comerciais.

4.5. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Coletou-se o fígado e as gônadas dos peixes e imediatamente foram colocados dentro de recipientes com formol 10% e tamponado, já posicionado numa balança analítica digital para pesagem. As peças foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da UFSC, onde foram incluídas em parafina e laminadas em espessura de 5 μ m. As leituras das lâminas foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

4.6. ÍNDICE SOMÁTICO

A mensuração do peso dos peixes foi feita logo após a eutanásia. Em seguida pesou-se o fígado e gônada, para então poder estipular os índices somáticos respectivos. A fórmula empregada para este cálculo foi a seguinte:

$$IS = \text{peso do tecido} / \text{peso total do indivíduo}$$

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com a auxílio do software StatGraph versão 5.0. Para as análises entre grupo testado e grupo controle, foi utilizado o Teste t, e quando ocorreram diferenças significativas, foi utilizado o Teste ANOVA, entre os dados do grupo testado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo fato de estudos prévios terem mostrado comportamentos diferenciados entre grupos de machos expostos a efluentes de papel e celulose, demonstraremos aqui os resultados em grupos de ambos os sexos, separadamente, iniciando com os resultados dos machos e, em seguida, com os das fêmeas.

5.1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE PEIXES MACHOS AO EFLUENTE

5.1.1. Efeito Sobre a Concentração de Testosterona

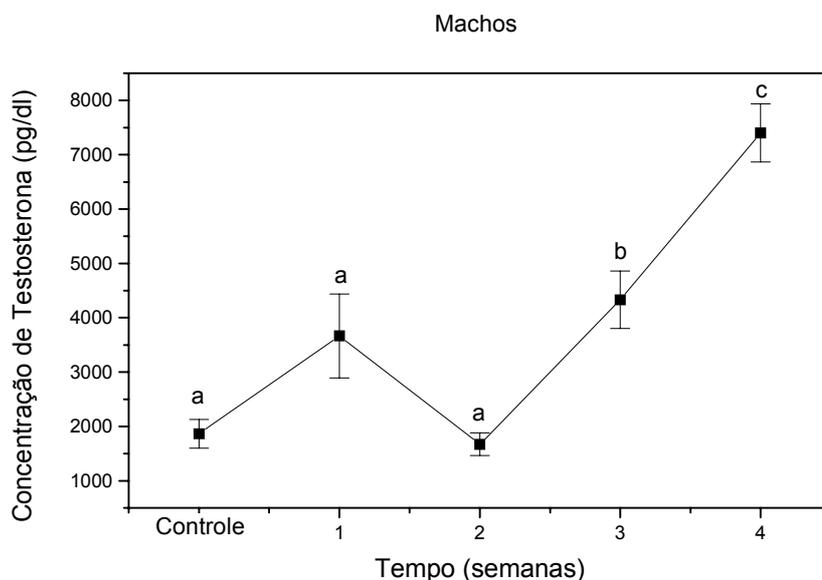


Figura 1. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de testosterona plasmática em tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05

A concentração plasmática de testosterona apresentou um aumento significativo a partir da 3ª semana, elevando-se ainda mais na 4ª semana (Figura 1).

Estes resultados mostram que os peixes expostos ao efluente tiveram uma alteração hormonal, após um período de indução de duas semanas. Os peixes em estudo estavam em fase adulta, e para as tilápias, a definição sexual ocorre na fase

larval, entre o 15º e 30º dia. Este aumento não ocorreu na fase de diferenciação sexual, portanto, não interferiu na determinação sexual e também não promoveu reversão sexual. No entanto, o aumento de testosterona pode acarretar alterações dos caracteres sexuais secundários, porém, estes efeitos não foram analisados neste trabalho. Ficou evidente a interferência da exposição do efluente no aumento dos níveis de testosterona tanto em machos quanto em fêmeas como será visto na seção das fêmeas.

A alteração do nível de esteróides sanguíneos já foi relatada (MacLatchy et al., 1997) e, desde 1970, tem se observado efeitos androgênicos em peixes expostos a efluentes de papel e celulose (Howell WM, et al., 1980). A androstenediona tem sido implicada como um potencial andrógeno neste tipo de efluente (Jenkins R., et al., 2001), e junto com isto, tem-se encontrado fortes evidências da presença de receptores de ligação androgênica, porém nenhuma evidência de mecanismos específicos (androgênico, estrogênico ou outro) foi encontrada, segundo Van den HEUVEL e ELLIS, (2002).

Por outro lado, outras espécies de peixes não demonstraram o mesmo comportamento. Estudos realizados por Owens (1991) e Munkittrick et al. (1998), demonstraram efeitos inversos aos obtidos no presente estudo, onde relataram distúrbios na fisiologia e reprodução de peixes vivendo em águas contaminadas com efluentes de papel e celulose, incluindo a redução dos níveis de esteróides sexuais e, conseqüentemente, na reprodução. Vários estudos com carpa (*Cyprinus carpio*) (Gimeno et al., 1997) e truta (*Oncorhynchus mykiss*) (Jobling et al., 1996) evidenciaram o potencial de alquilfenóis em induzir modificações bioquímicas e fisiológicas que caracterizaram a feminilização de machos, como por exemplo, a produção hepática de vitelogenina e Zr proteínas, as quais estão envolvidas no processo de fertilização de fêmeas.

Compostos não persistentes, capazes de alterar o sistema endócrino de peixes, incluem os componentes naturais da madeira como os ácidos graxos (Mercure e Van Der Kraak, 1995) resinas ácidas e esteróides vegetais (MacLatchy e Van der Kraak, 1995, MacLatchy et al, 1997, Tremblay e Van Der Kraak, 1998, 1999, Lehtinen, 1999). Muitos estudos têm implicado o 8-sitosterol, um esteróide vegetal, como um possível e significativo fator de contribuição para a efeitos reprodutivos observados em

peixes expostos a efluente de papel e celulose. Em goldfish (*Carassius auratus*), injeções de 8-sitosterol causam redução nos níveis de esteróides sexuais e diminuição na produção da pregnolona e testosterona gonadal sob condições *in vitro* (Sepúlveda, 2000, Sepúlveda et al., 2001, 2002). Estes compostos também podem induzir efeito estrogênico em peixes, podendo ligar-se a receptores estrógenos de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) e promover a expressão do gene da vitelogenina *in vitro* e *in vivo* (Tremblay e Van Der Kraak, 1998, 1999, Lehtinen, 1999, Mellanen et al, 1996). Por outro lado, a quebra microbiológica destes esteróides vegetais, presentes em efluentes de papel e celulose podem produzir andrógenos (Marsheck et al., 1972), e, em estudos laboratoriais, fêmeas de mosquitofish (*Gambusia affinis*) têm sido masculinizadas por esteróides incubados microbiologicamente (Krotzer, 1990).

Outros compostos presentes em efluente de papel e celulose que têm sido reportados por causar disfunção reprodutiva em peixes, incluem fenol e sulfito, os quais inibem a percepção do colesterol na circulação periférica pelo ovário, para conversão em progesterona e pregnolona. (Mukherjee, 1991).

5.1.2. Efeito Sobre a Concentração de Estradiol

Os peixes expostos ao efluente apresentaram uma diminuição nos níveis de estradiol plasmático a partir da primeira semana do experimento, quando comparados com o grupo controle. Neste caso, o efeito de indução não foi observado, diferentemente do encontrado para a testosterona. A partir da segunda semana, notou-se um aparente efeito de recuperação, porém, não suficiente para restabelecer os níveis iniciais do hormônio (Figura 2).

O comportamento do estradiol ocorre tanto nos machos quanto nas fêmeas e pode ser associado a uma inibição da conversão da testosterona em estradiol nos ovários, assim como à disponibilidade e atividade de enzimas do complexo citocromo P450 aromatase (P450arom; também chamado estrogênio sintase) (Piferrer et al., 1993; Kitano et al., 2000).

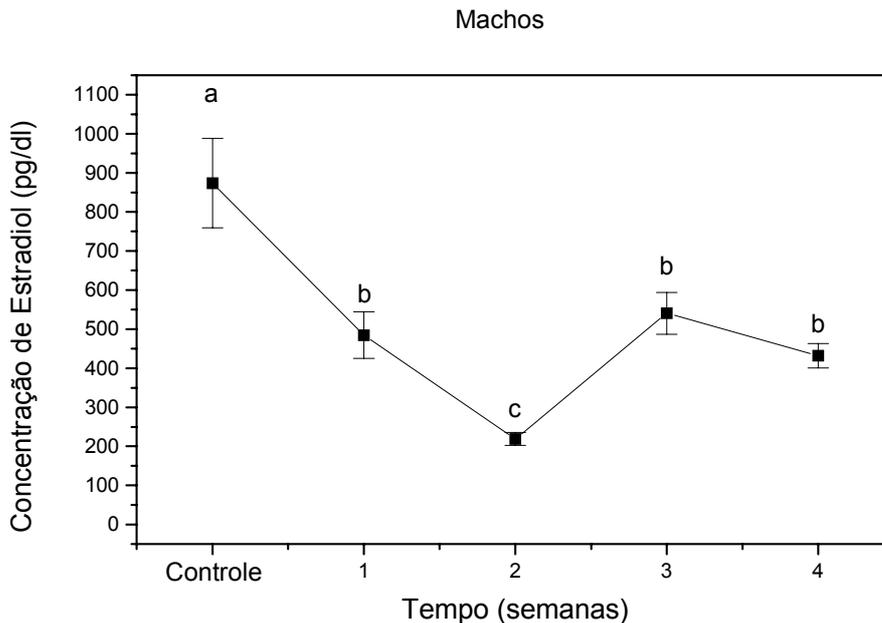


Figura 2. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de estradiol plasmático em tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

A importância do P450arom na diferenciação sexual das gônadas em peixes é mostrada pelo fato de a inibição da atividade enzimática da aromatase durante um período apropriado de desenvolvimento poder tornar um peixe geneticamente fêmea e passar a desenvolver características fenotípicas masculinas (Piferrer et al., 1993; Kitano et al., 2000; Kroon e Liley, 2000). Ainda são insuficientes os estudos sobre o complexo eixo hipotálamo-hipofisário-ovário e as suas interações com os poluentes em estudo.

Por outro lado, o efeito observado poderia ser considerado um comportamento fisiológico apenas relacionado ao estágio do ciclo sexual dos peixes, portanto, fisiologicamente normal, mas o grupo controle apresentou comportamento diferente.

A relação numérica (quociente) entre as concentrações de testosterona e estradiol nos mostra, inequivocamente, a tendência fisiológica/bioquímica das alterações promovidas pela exposição ao efluente (Figura 3). Tais alterações, quando

discutidas conjuntamente com as alterações de índice somático de gônadas e a histologia das mesmas, caracterizam-se como patológicas.

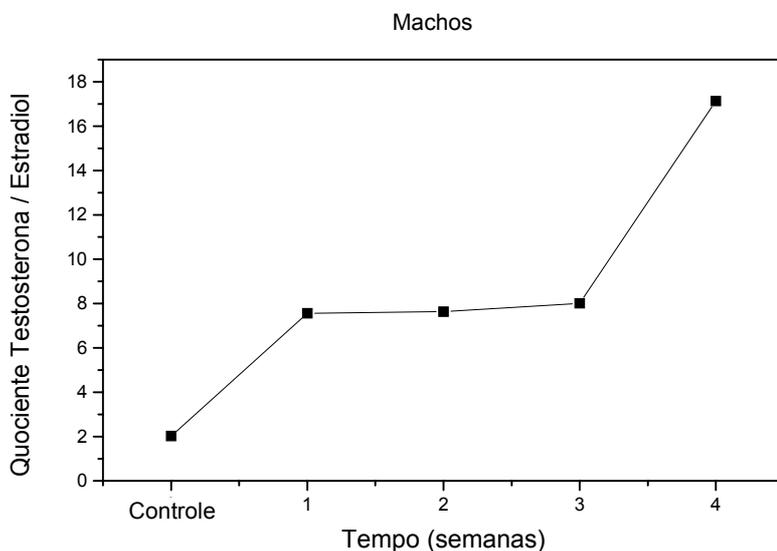


Figura 3. Relação entre as concentrações dos hormônios testosterona/estradiol durante o período de exposição dos peixes ao efluente.

Neste gráfico pode-se observar um aumento progressivo na relação entre as médias de testosterona e estradiol ao longo do período em estudo. Estes resultados sugerem marcadamente a desregulação hormonal, mais especificamente, um forte efeito androgênico sobre os peixes do experimento, com um aumento da testosterona. Os dados obtidos com as análises do grupo das fêmeas seguem na mesma direção, sugerindo uma desregulação hormonal, também marcada pelo aumento da testosterona (seção 5.2.1).

O balanço hormonal entre estrógenos e andrógenos mostra-se crucial nos processos de diferenciação em desenvolvimento de peixes teleósteos. Este balanço conta com a disponibilidade e atividade de enzimas que sintetizam esteróides, e, em particular, o complexo citocromo P450 aromatase (Kroon e Liley, 2000) como já foi destacado anteriormente.

5.1.3. Efeito Sobre a Concentração de Colesterol Total e Respectiva Fração LDL

A concentração plasmática de colesterol total mostra-se sem alterações até a terceira semana, enquanto que na quarta semana aumentou significativamente (Figura 4).

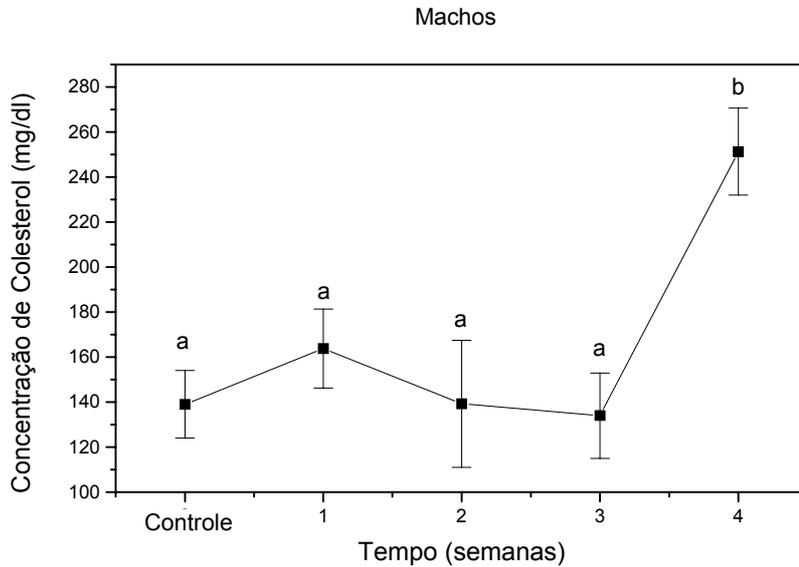


Figura 4. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de colesterol total plasmático em tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

O fígado é responsável pela síntese do colesterol, o precursor dos hormônios esteróides, como testosterona e estradiol, e de proteínas plasmáticas, incluindo a proteína carreadora de hormônios. Embora o nível elevado na quarta semana pudesse estar associado a uma aparente recuperação da atividade hepática, parece efetivamente responder a uma demanda mais elevada na biossíntese de testosterona e outros hormônios, tais como cortisol (Soares et al., 2000). Uma indicação de que esta suposição está correta consiste no fato de que o perfil da variação da fração LDL (low density lipoprotein) (Figura 5), é o mesmo do colesterol total. Em peixes, assim como em mamíferos, é esta fração – LDL – que dá origem aos hormônios esteróides.

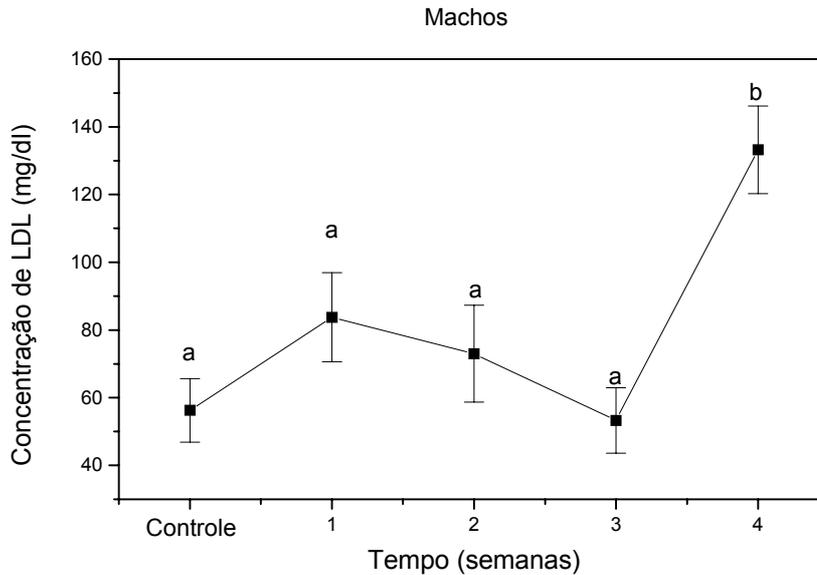


Figura 5. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis da fração LDL plasmática em tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Os peixes machos tiveram um comportamento semelhante ao das fêmeas, apresentando um aumento significativo também na quarta semana.

Como o LDL é o precursor dos esteróides, e nos machos o hormônio que apresentou um aumento foi a testosterona, o aumento do LDL deve estar diretamente relacionado ao aumento da concentração de testosterona. E, da mesma forma que ocorre nos machos, o LDL nas fêmeas também parece estar relacionado com o aumento da testosterona.

5.1.4. Efeito da Exposição no Índice Somático de Gônadas (ISG)

Observando-se o grupo controle, vê-se que o índice somático das gônadas dos machos aumentou na primeira, segunda e quarta semanas (Figura 6). Este aumento significativo das gônadas dos peixes expostos ao efluente sugere uma hipertrofia funcional, corroborando o aumento da síntese da testosterona observado.

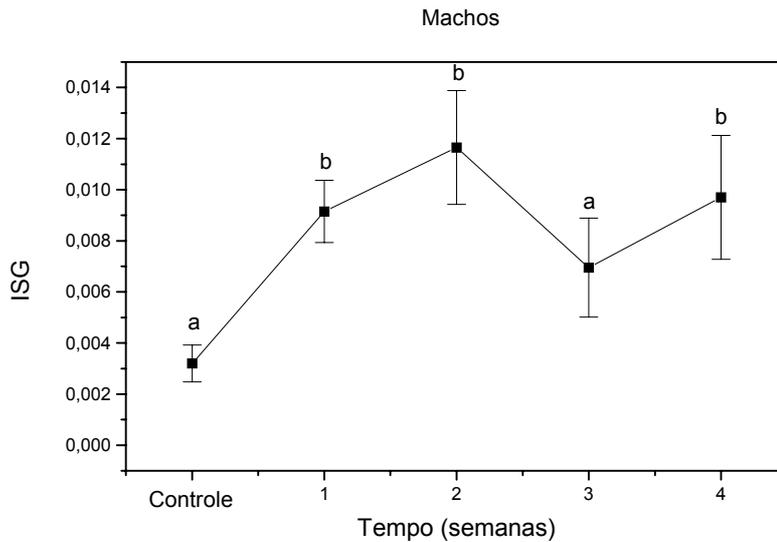


Figura 6. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - no índice somático de gônadas de tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

A mesma alteração apresentada nos machos, um aumento no ISG, ocorreu nas fêmeas, sugerindo também uma relação com a testosterona das fêmeas. Porém, histologicamente, ocorreram alterações diferentes, entre machos e fêmeas, nos tecidos das gônadas.

Em um estudo reportado por Jobling et al. (1996), a exposição de trutas arco-íris a quatro diferentes compostos alquifenólicos que induziram a síntese de vitelogenina, ao mesmo tempo inibiram o crescimento testicular.

5.1.5. Efeito da Exposição no Índice Somático de Fígado (ISF).

O índice somático do fígado aumentou nos peixes expostos ao efluente testado como pode ser visto na Figura 7, a qual mostra uma diferença significativa entre o grupo controle e os peixes expostos da primeira à última semana.

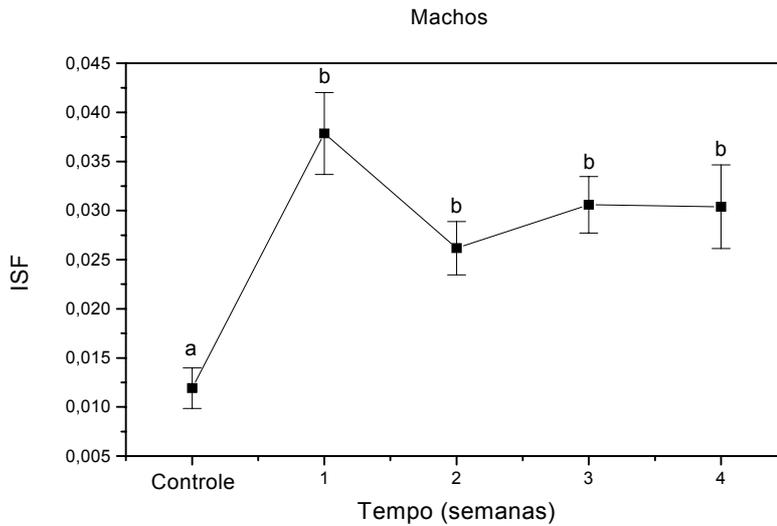


Figura 7. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - no índice somático de fígado de tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Este aumento do ISF, aparentemente, sugere um aumento funcional do fígado em decorrência da exposição do peixe a xenobióticos com o conseqüente aumento dos processos metabólicos envolvidos no processo de desintoxicação, e também relacionados a maior produção hormonal, já que o aumento do ISF acompanha o aumento do Colesterol, LDL. Estudos anteriores demonstraram efeitos histopatológicos deste tipo de efluente, incluindo necroses e degeneração celular (Soares et al 1997). Portanto, efeitos de hiperplasia e hipertrofia devem ser os responsáveis pelas alterações observadas. Hipertrofia e disfunção hepática foram descritas como alterações provenientes de exposição de peixes a este tipo de efluente (Lindstrom et al., 1989; Munkittrick et al., 1991). Além disto, as conseqüências da produção de Zr proteína e vitelogenina, apesar de serem pouco compreendidas, estão associadas à hiperplasia/hipertrofia de fígado e dano renal (Herman e Kinaid, 1988), sendo que a biossíntese destas proteínas pode ser estimulada por compostos alquifenólicos (Jobling et al., 1996).

O comportamento do ISF nas fêmeas foi semelhante ao dos machos, o que parece indicar que as alterações não estão relacionadas somente aos possíveis efeitos androgênicos do efluente testado.

5.1.6. Efeito da Exposição na Concentração de Proteínas Totais e Frações.

As proteínas totais apresentaram um aumento na primeira, terceira e quarta semanas (Figura 8). Com a albumina, uma fração das proteínas, ocorreu uma diminuição na primeira e segunda semanas (Figura 9). Já para as globulinas, outra fração das proteínas, ocorreram aumentos da primeira à última semana (Figura 10).

Um aumento nas proteínas totais poderia significar uma desregulação do balanço hídrico, como já demonstrado em outros experimentos em nosso laboratório (Pedrosa et al., 1997). Portanto, poderia significar uma resposta do organismo à exposição aos componentes do efluente testado. Por outro lado, também uma resposta inflamatória poderia justificar este aumento das proteínas, já que houve um aumento das globulinas, que são proteínas utilizadas nas defesas imunológicas do organismo.

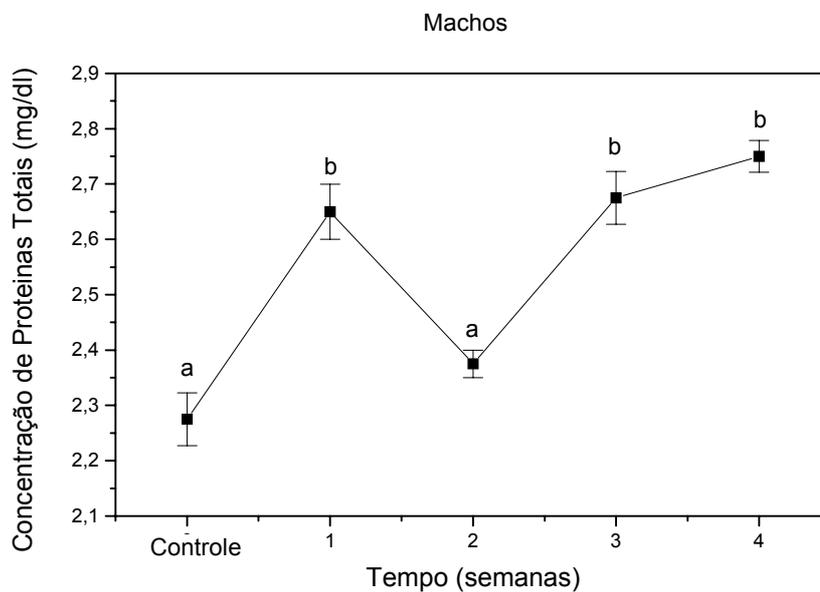


Figura 8. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - na concentração de proteínas totais de tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

A semelhança entre os perfis de alteração das proteínas totais e globulinas, no presente estudo, sugere que este é um efeito importante neste caso. Adicionalmente, não pode ser descartada a possibilidade de perda de proteínas tissulares em função de danos provocadas pelos xenobiontes contidos no efluente. Estudos anteriores demonstraram a alteração dos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina, entre outras enzimas (Soares et al., 2000), nas mesmas condições que as utilizadas neste estudo.

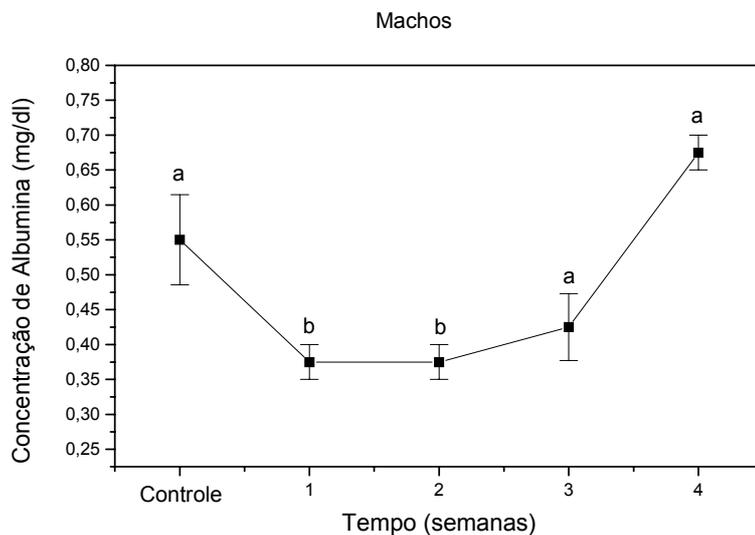


Figura 9. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - na concentração de albumina de tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Assim como nos machos, as fêmeas responderam ao experimento com um aumento das proteínas totais, não havendo diferença estatística para a concentração de albumina, mas ocorreu um aumento nas globulinas.

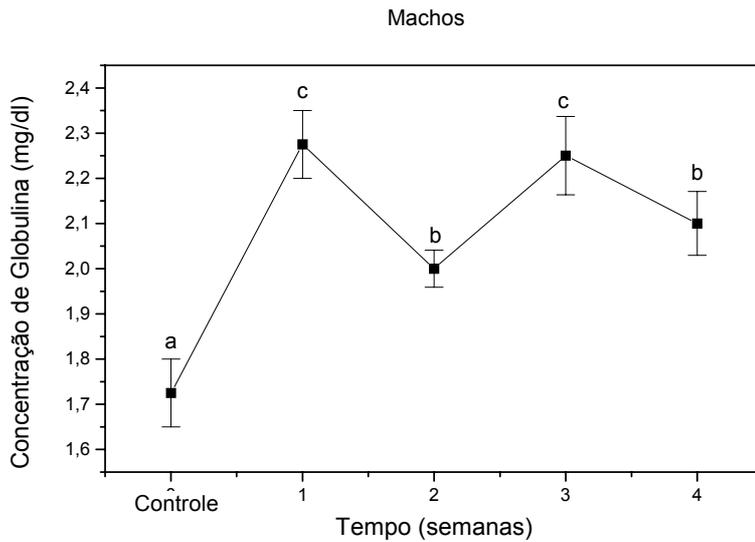


Figura 10. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - na concentração de globulinas de tilápias adultas e machos, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

5.2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE PEIXES FÊMEAS AO EFLUENTE

5.2.1. Efeito Sobre a Concentração de Testosterona

A análise do experimento com o grupo das fêmeas mostrou níveis mais elevados da concentração de testosterona na segunda, terceira e quarta semanas de exposição (Figura 11). Embora a tendência de alteração seja semelhante à observada para peixes machos, a variação ao longo do período de exposição apresentou diferenças pontuais. Em que pese este fato, como os efeitos, de um modo geral, foram semelhantes em ambos os sexos, os mecanismos operantes, provavelmente bioquímicos, deveriam também ser semelhantes (discutidos na seção 5.1.1.).

Da mesma maneira que nos machos, este aumento da testosterona pode promover alterações nos caracteres sexuais secundários dos peixes, porém não avaliados neste experimento.

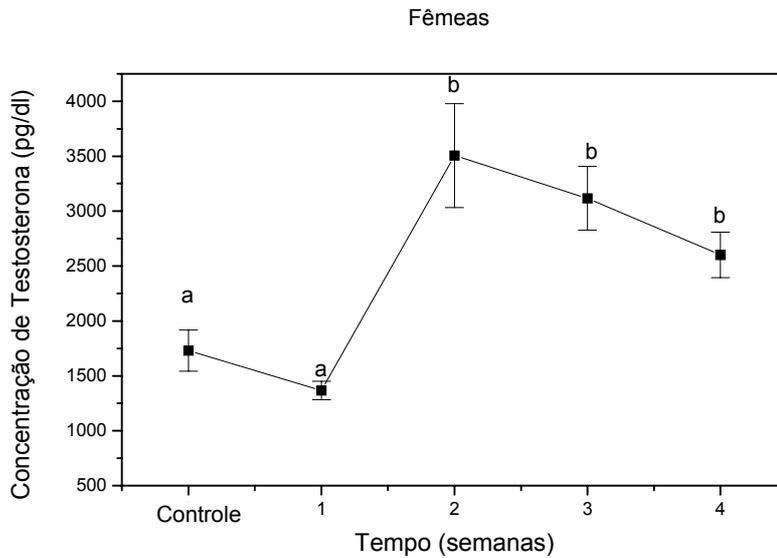


Figura 11. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de testosterona plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Resultados demonstrando diminuição nos níveis de hormônios esteroidais em fêmeas, foram relatados em truta arco-íris (Ellis, et al., 2003). Estudos de THOMAS et al. (2002) demonstraram a masculinização de fêmeas de mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) e enguia (*Zoarces viviparus*), expostos ao mesmo tipo de efluente, observada através da modificação dos caracteres sexuais secundários tipo tamanho de nadadeira, cores, entre outros. Diferentemente de tilápias, para mosquitofish existe um dimorfismo sexual bem caracterizado e evidente.

Andrógenos produzidos microbiologicamente ainda são o foco principal de estudos sobre a masculinização de fêmeas encontradas abaixo do ponto de despejo de efluentes de papel e celulose em um rio, apesar de o agente específico ainda não ter sido identificado (Toft et al., 2004).

5.2.2. Efeito Sobre a Concentração de Estradiol.

A concentração de estradiol em fêmeas reduziu na primeira semana (Figura 12).

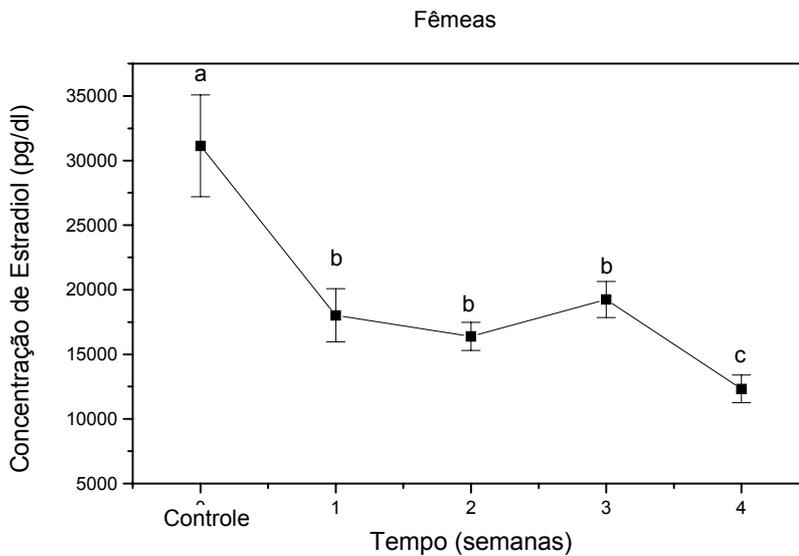


Figura 12. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de estradiol plasmático de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Também para este hormônio, os efeitos foram semelhantes ao observado para os machos, porém, um pouco mais acentuados.

Portanto, no conjunto, as alterações hormonais seguiram um direcionamento semelhante ao dos machos, indicando um aumento de testosterona e uma diminuição de estradiol, sugerindo um efeito androgênico provocado pela exposição ao efluente.

Notou-se um aumento na relação hormonal entre testosterona e estradiol quando comparado com o grupo controle (Figura 13), diferente daquela exibida por peixes machos (Figura 3), tanto quantitativamente quanto no aspecto temporal. Para fêmeas, o aumento ocorreu no início do período de exposição (1^a e 2^a semanas) e declinou em seguida. Para os peixes machos, o aumento não foi tão acentuado no início, porém, tornou-se significativo na 4^a semana. Este resultado evidenciou que os efeitos provocados pelo efluente foram semelhantes, porém, dada às especificidades típicas da fisiologia de cada sexo, a resposta ao efeito inicial foi diferenciada. De qualquer modo, em ambos os casos, as alterações caracterizaram uma desregulação hormonal.

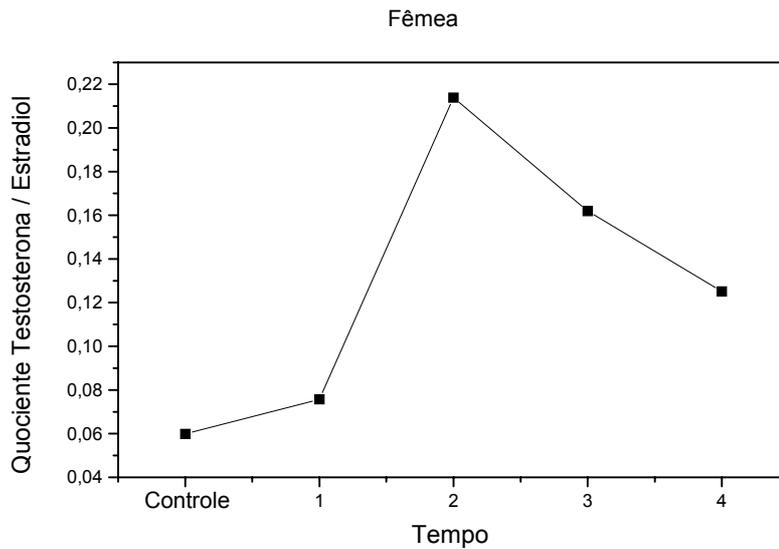


Figura 13. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - na relação hormonal entre testosterona e estradiol plasmáticos de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4.

Um outro aspecto importante a ser discutido é o fato bem conhecido de que a esteroidogênese está ligada à gonadotropina I, liberada pela hipófise. Singh e Singh (1980) relataram o efeito de redução da concentração de gonadotropina sérica e pituitária em bagre (*Heteropneustes fossilis*) exposto a inseticidas organoclorados pela percepção testicular. Em outro estudo, Van der Kraak et al. (1992) mostraram que os níveis de testosterona, em ambos os sexos, e ceto-testosterona em machos da espécie *Catostomus commersoni*, expostos a efluente de papel e celulose, não foram elevados por hormônio liberador de gonadotropina.

Outros estudos demonstraram que a metiltestosterona foi androgênica em peixes, no entanto, este agente químico também causou uma resposta indicativa de receptor estrogênico agonista. Aparentemente, isto é devido ao fato de a metiltestosterona ter sido aromatizada a metilestradiol pelo peixe, dando assim, a impressão de ser uma substância com um modo de ação misto (Ankley, G.T. et al. 2003).

5.2.3. Efeito Sobre a Concentração de Colesterol Total e Frações.

Ocorreu uma diminuição dos níveis de colesterol na primeira e terceira semanas (Fig. 14), passando a aumentar significativamente na última semana.

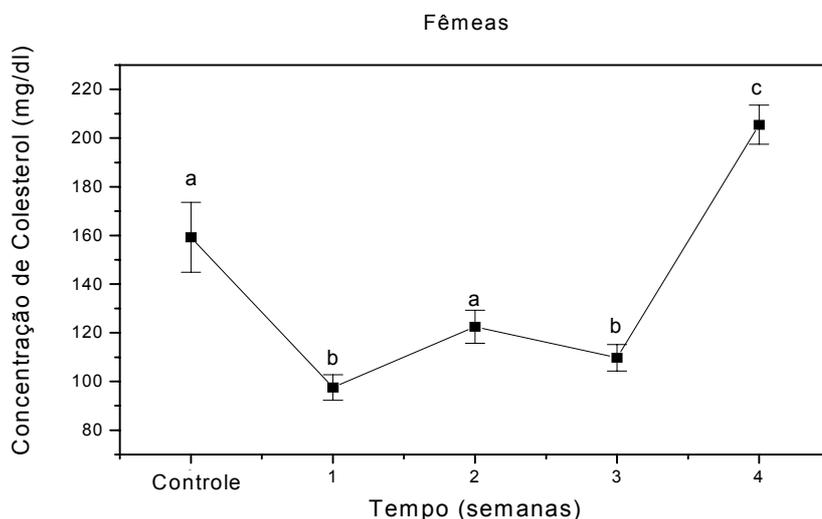


Figura 14. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de colesterol total plasmático de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Este resultado mostrou que, também neste caso, os dados de aumento da concentração hormonal de origem esteróide foram coerentes com os níveis de colesterol. Como nos machos, este parâmetro apresentou um significativo aumento na última semana.

Hidrocarbonetos aromáticos alogenados foram responsáveis pelos efeitos de toxicidade em tecidos como o córtex da adrenal, incluindo a corticosteroidogênese, segundo trabalhos citados por Aurun e Vijayan (2004). Nos teleósteos este tecido é inter-renal. O ponto-chave na via esteroidogênica para a produção de corticosteróide inclui a proteína esteroidogênica regulatória envolvida na translocação do colesterol para dentro da membrana mitocondrial e a disponibilidade dela para citocromo P450, os quais iniciam a biossíntese de esteróides (Stocco, 2000). Recentes estudos mostraram que a ativação de receptores aril-hidrocarboneto inibiu a ativação inter-renal da corticosteroidogênese em peixes (Aurun e Vijayan, 2004).

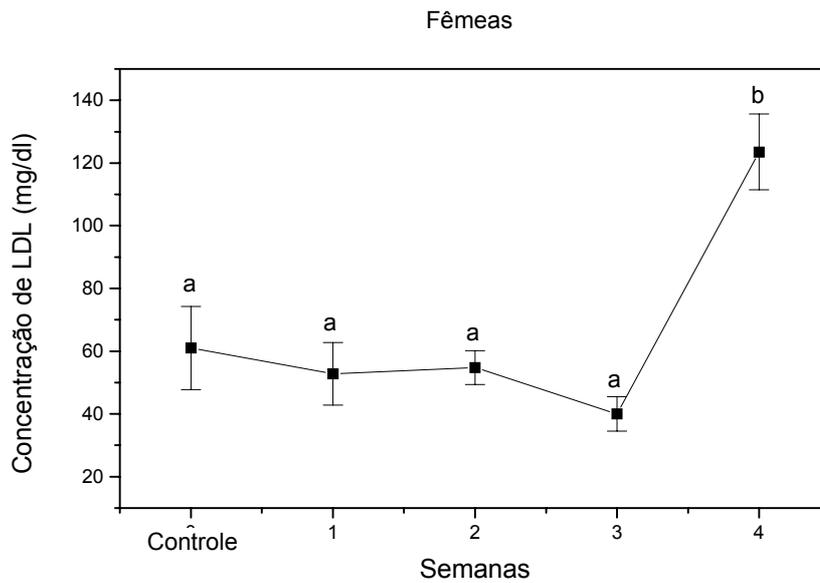


Figura 15. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis da fração LDL plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

A concentração da fração LDL seguiu sem alteração até a terceira semana quando ocorreu um aumento significativo (Figura 15), o qual não correlacionou exatamente com o aumento da testosterona, a qual já vinha aumentando a partir segunda semana. As fêmeas apresentaram o mesmo comportamento que os machos em relação às alterações dos níveis de LDL.

5.2.4. Efeito da Exposição no Índice Somático de Gônadas.

Foi evidente o aumento do índice somático de gônadas no decorrer do período de exposição (Figura 16). Essa diferença refletiu as alterações dos níveis hormonais.

Esse aumento do índice somático, revelando um aumento do tamanho das gônadas das fêmeas em resposta à exposição ao efluente, foi também acompanhado por certo grau de degeneração tecidual comprovado macroscopicamente e histologicamente.

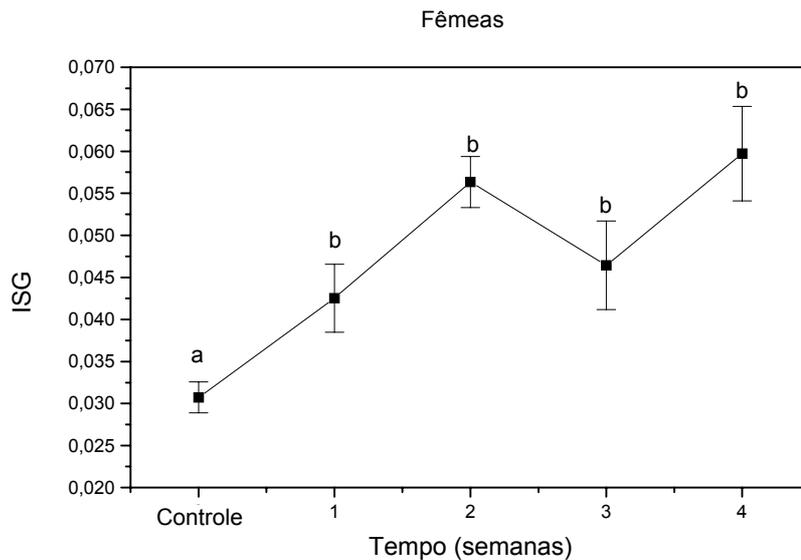


Figura 16. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - no índice somático de gônadas de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Este foi um resultado inesperado no contexto dos demais resultados, e em analogia com resultados descritos na literatura. Em função do aumento da concentração de testosterona e redução de estradiol seria esperada a redução do índice somático.

Comportamento diferente foi sugerido por van den Heuvel e Ellis R.J. (2002) quando relataram que a redução no tamanho das gônadas estaria associado aos baixos níveis do hormônio esteróide estradiol, e quando McMaster et al. (1996) sugeriu que os níveis de hormônios esteróides foram reduzidos mediante um distúrbio no desenvolvimento do ovário.

Como ocorreu um aumento do ISG nos machos, também poder-se-ia sugerir que a exposição ao efluente provocou uma hiperfuncionalidade das gônadas, gerando um aumento nos níveis da testosterona.

5.2.5. Efeito da Exposição no Índice Somático de Fígado.

Para o ISF, ocorreu um aumento da primeira semana até a terceira, quando então retornou para níveis estatisticamente semelhantes aos dos controles. Este

aumento nas primeiras semanas (Figura 17) poderia representar uma resposta à exposição do organismo aos xenobiontes, porém, já na última semana, o fígado parece começar a se adaptar à exposição.

Neste caso, os mecanismos operantes devem ser semelhantes para ambos os sexos. Como nos mamíferos, também em peixes, a maioria das enzimas que metabolizam xenobiontes estão primariamente localizadas no fígado.

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório demonstraram efeitos provocados por estresse oxidativo, tais como a indução de enzimas e outras defesas não enzimáticas antioxidantes, particularmente, citocromo P450 (Pedrosa, 1997). A relação deste grupo de enzimas oxidativas e a biossíntese de esteróides também é bem conhecida.

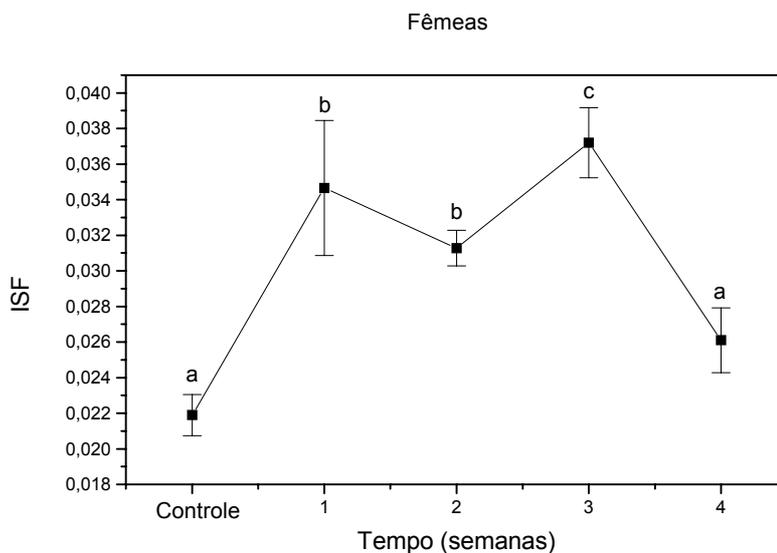


Figura 17. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - no índice somático de fígado de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Muitos estudos relataram que o índice geral e o índice somático do fígado aumentaram com a exposição a efluente de papel e celulose (Adams et al., 1992, Munkittrick et al., 1994, Gibbons et al., 1998, McMaster et al., 1996).

5.2.6. Efeito Sobre a Concentração de Proteínas Totais e Frações.

No presente estudo com fêmeas foi demonstrado que as proteínas totais aumentaram na primeira semana (Figura 18), persistindo o efeito até a última. Já a concentração de albumina permaneceu igual ao controle (Figura 19) durante todo o período de estudo, enquanto que a globulina (Figura 20) seguiu o mesmo padrão das proteínas totais. Ou seja, o aumento de proteínas parece estar diretamente relacionado com o aumento das globulinas e, provavelmente, estas globulinas correspondem a uma resposta inflamatória do organismo a exposição ao efluente. Aqui deve ser destacado que o mesmo comportamento foi observado para os peixes machos, sugerindo que estes resultados não são dependentes do sexo.

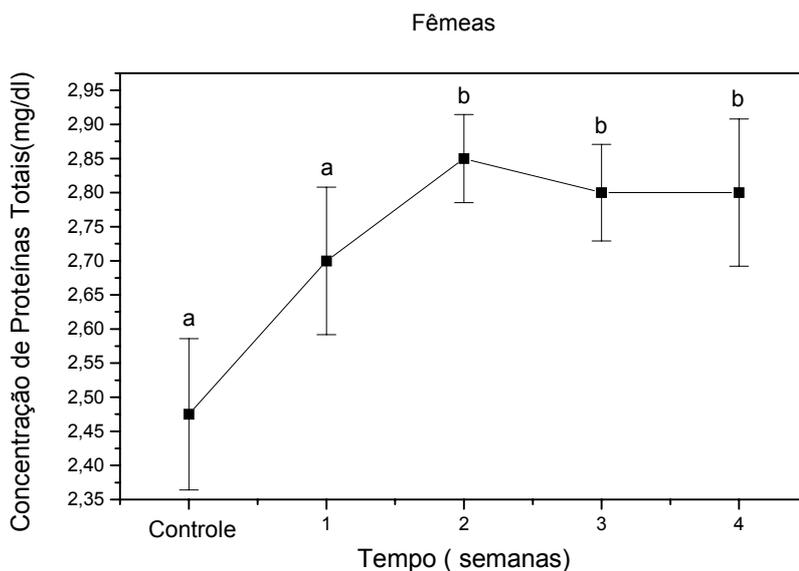


Figura 18. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de proteína total plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

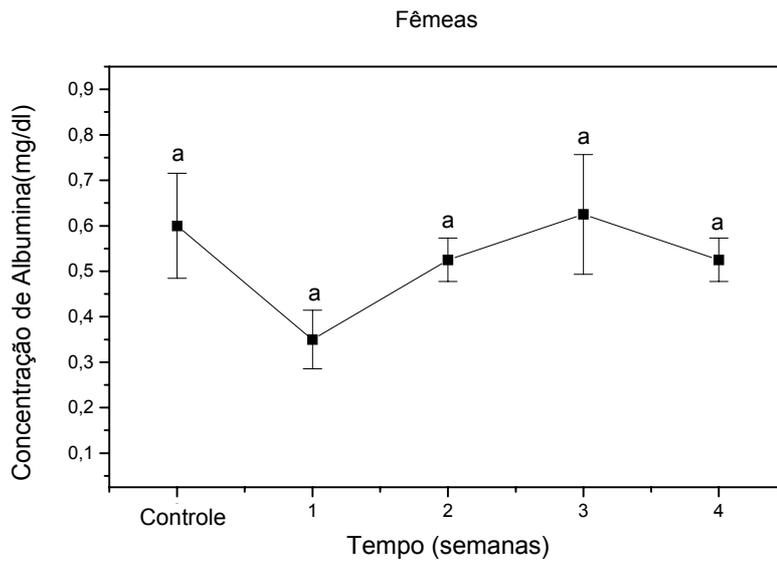


Figura 19. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de albumina plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) e (c) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

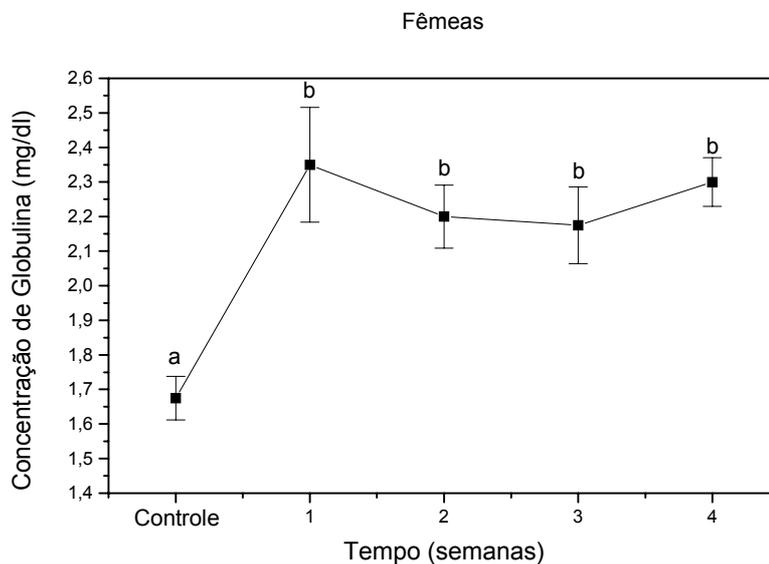


Figura 20. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - nos níveis de globulina plasmática de tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P < 0,05.

Como observado para o perfluorooctano sulfonato, de acordo com Jones, (2003), poderia ocorrer algum tipo de interação entre compostos presentes no efluente e proteínas séricas que estão envolvidas nas funções imunológicas e endócrinas. Tem sido proposto que a interação de agentes químicos com certas proteínas séricas podem causar distúrbios nas funções normais endócrinas (Joseph, 1994).

Dois importantes grupos de proteínas envolvidas na função endócrina são globulinas transportadoras de hormônios sexuais, as quais se ligam a estradiol, testosterona e dehidrotestosterona, e globulinas transportadoras de corticosteróide, as quais se ligam a glicocorticóides e progesterona. Em geral, aceita-se que a fração não ligada a proteínas é biologicamente ativa porque ela pode livremente difundir-se entre os tecidos durante a passagem do sangue pelos capilares. Em contrapartida, acredita-se que os esteróides ligados a proteínas servem como reservatórios de hormônios esteroidais (Jones, 2003).

5.2.7. Efeito da Exposição Sobre a Relação do Índice Geral.

A variação do índice geral (IG) das fêmeas (Figura 21), durante o período de estudo, mostrou um possível desgaste metabólico do organismo no decorrer do tempo.

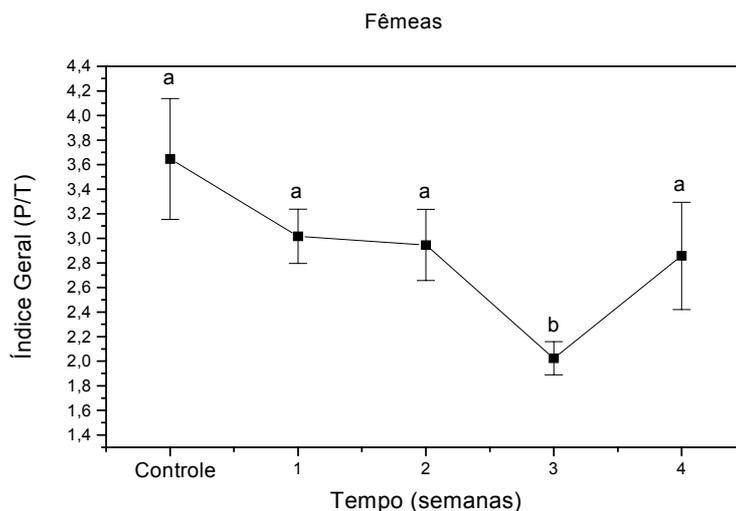


Figura 21. Efeito do tempo de exposição ao efluente – concentração 1% - no índice geral tilápias adultas e fêmeas, mantidas a 25° C, sob aeração constante (saturação de O₂) e pH 6,8-7,4. (a) representa valores estatisticamente não diferentes do controle; (b) valores estatisticamente diferentes do controle, respectivamente. P<0,05.

Isto sugere uma reação adversa do organismo aos xenobiontes presentes no efluente. Como o IG representa a relação entre tamanho e peso corporal, para curtos períodos de exposição, em geral, a redução deste parâmetro é devida a perda de peso pelo indivíduo. Este comportamento segue uma tendência de resultados apresentados em outros trabalhos feitos no nosso laboratório.

5.3. HISTOLOGIA DE GÔNADAS

5.3.1. Histologia de Gônadas de Machos

A elevada incidência de intersexo e proporção de desvios sexuais são muitas vezes usados como indicadores da desregulação sexual em peixes expostos a químicos com atividade estrogênica (Hahlbeck et al., 2004a).

Nenhuma mudança histológica perceptível nos ovários foi encontrada em fêmeas masculinizadas de peixe-mosquito (Hunsiger et al., 1988), mas a redução na fecundação foi observada em fêmeas coletadas de um rio contaminado com efluente de papel e celulose, comparativamente a fêmeas não expostas (Rosa-Molinar e Willians, 1984).

5.3.2. Histologia de Gônadas de Fêmeas

Ocorreram alterações de gônadas, revelando uma deterioração tecidual, relacionada ao tempo de exposição. Num estudo feito por Sepulveda, 2000, a avaliação histológica das gônadas revelou mudanças (relação negativa entre exposição ao efluente e desenvolvimento de gônada) em ambos, ovários e testículos, mas somente em peixes expostos por 28 dias e não por 56 dias, onde sugere-se um efeito transitório ou uma possível aclimatação.

6. CONCLUSÃO

O efluente gerado pela indústria possui potencial para causar desregulação endócrina nos peixes em estudo. Este potencial é androgênico, corroborando com outros estudos já feitos por nosso laboratório.

Este tipo de efeito presente no efluente testado, interfere de forma silenciosa, podendo gerar populações com predominância de um sexo. Não ocorre a morte do indivíduo, porém, em virtude da desregulação endócrina, a reprodução fica comprometida, podendo inclusive reduzir e até dizimar a população de uma espécie. Testes que utilizam efeitos agudos ou a letalidade como parâmetros, seriam inapropriados neste tipo de estudo, pois não revelariam o efeito em longo prazo.

Ainda serão necessários estudos complementares visando elucidar os mecanismos de ação destas substâncias desreguladoras. Trabalhando especificamente com efluente de final de processo convencional de branqueamento. A utilização de tilápias neste tipo de estudo também deve ser continuada, pois é uma espécie que tem mostrado, quando em exposição a efluente de papel e celulose, comportamento diferenciado da maioria das espécies utilizadas hoje em dia. Além disto, é uma espécie de interesse comercial, sendo interessante o desenvolvimento de pesquisas que ajudem a compreender melhor a fisiologia reprodutiva, quiçá a descoberta de substâncias que possam substituir de forma vantajosa à utilização de hormônios na reversão sexual dentro da piscicultura.

Embora o trabalho tenha sido realizado em laboratório, o risco potencial para ecossistemas naturais ficou claramente evidenciado. Esta afirmação é consubstanciada pelo fato de que estudos de campo (Martins, 2004) confirmaram a maior parte dos dados obtidos em laboratório.

É preocupante o fato de que o efluente utilizado neste estudo seja o produto final de um processo de tratamento via lagoa de aeração, um modelo de tratamento muito utilizado para este tipo de efluente no Brasil. Evidencia-se, entretanto, a necessidade de uma regulamentação por parte de órgãos governamentais, visando à aplicação de um sistema de tratamento eficiente. Já que o efluente testado, quando em contato com organismos que participam deste ambiente aquático, direta ou indiretamente, abaixo do ponto de despejo, no rio Canoas, tenham sofrido desregulação endócrina.

REFERÊNCIAS

1. ADAMS, S. M. et al. 1992. Responses on fish populations and communities to pulp mill effluents: A holist assessment. *Ecotoxicol Evirom Saf* 24:347-360.
2. ALLARD, A. S.; GUNNARSSON, M.; SVENSON, A. 2004. Estrogenicity in bile of juvenile rainbow trout as measure of exposure and potential effects of endocrine disruptors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 5, pp. 1187–1193, 2004.
3. ALLEN, Y. et al. 1999. The extent of estrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments—Further surveys of flounder. *Sci Total Environ* 233:5–20.
4. ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. 2004. B-Naphthoflavone disrupts cortisol production and liver glucocorticoid responsiveness in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 67 273–285.
5. ANKLEY, G.T. et al. 2001. Description and evaluation of a short-term promelas). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1276–1290.
6. ANKLEY, G.T. et al. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-8-Trembolone on fecundity and reproductive endocronology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem*, 22(6) 1350-1360.
7. APHA AWWA. 1998. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 550B, 20th Edition. American Public Health Association, New York: sec. 5.58-5.69.
8. ARCAND-HOY, L.D.; BENSON, W.H.; 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 49–57.
9. BAATRUP, E.; JUNGE, M., 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Environ. Health Perspect.* 109, 1063–1070.
10. BALTHAZART, J., 1989. Steroid metabolism and the activation of social behavior. In: Balthazart, J. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, pp. 105–159.

11. BALTHAZART, J.; BALL, G.F. 1998. New insight into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci.* 21, 243–249.
12. BAROILLER, J.F. et al. 1995. Temperature and sex-chromosomes govern sex-ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273, 216–223.
13. BAROILLER, J.F.; GUIGEN, Y.; FOSTIER, A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 910–931.
14. BASSA, A. et al. 2002. Polpação kraft convencional e modificada para madeiras de *Eucalyptus grandis* e híbrido (*E.grandis*x*E.Urophylla*) – ABTCP. Disponível em: http://www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/Doutor%20Celulose/ABTCP/2002/ABTCP0205_coz.zip Acesso em 15 de outubro de 2004.
15. BAPTISTA, I. E. et al. 2000. Avaliação da toxicidade aguda de efluentes de uma Indústria Têxtil Utilizando *Daphnia Magna*, *Poecilia reticulata* e *Vibrio fisheri* como Bioindicadores. In: *Ecotoxicologia – Perspectivas Para o Século XXI* (Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Neto, A.L.O., eds.), p. 365-378. Rima Editora, São Carlos, SP.
16. BERGERON, J.M.; CREWS, D.; MCLACHLAN, J.A. 1994. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102, 780–781.
17. BLAZQUEZ, M., et al. 1998a. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119, 345–364.
18. BLAZQUEZ, M., et al. 1998b. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 281, 207–216.
19. BLAZQUEZ, M. et al. 1995. Development of sex control techniques for European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* 135, 329–342.
20. BLAZQUEZ, M. et al. F., 2001. Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *J. Fish Biol.* 58, 342–358.

21. BORTONE, S.A.; CODY, R.P. 1999. Morphological masculinization in poeciliid females from a paper mill effluent receiving tributary of the St. Johns River, Florida, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 150–156.
22. BORTONE, S. A.; DAVIS, W. P., 1994. Fish Intersexuality as Indicator of Environmental Stress. *BioScience*, v. 44 (3): 165-171.
23. BORTONE, S.A.; DAVIS, W.P.; BUNDRICK, C.M., 1989. Morphological and behavioral characters in mosquitofish as potential bioindicators of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 370–377.
24. BORTONE, S.A.; DRYSDALE, D.T. 1981. Additional evidence for environmentally-induced intersexuality in poeciliid fishes. *Assoc. Southeastern Biol. Bull.* 28, 67.
25. BRACELPA, 2004. Desempenho do Setor em 2003, Disponível em : <http://www.bracelpa.org.br/informes_anuais/Desempenho%20do%20Setor2003.pdf>. Acesso em: 25 de abril de 2004.
26. BRACELPA, 2005a. Desempenho do Setor em 2003, Disponível em : <http://www.bracelpa.org.br/Bracelpa-Br/informes_anuais/Desempenho%20do%20Setor2003.pdf>. Acesso em: 15 de janeiro de 2005.
27. BRACELPA, 2005b. Estatísticas Preliminares - 2004, Disponível em : <http://www.bracelpa.org.br/Bracelpa-Br/informes_anuais/preliminares04.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2005.
28. BRAUNBECK, T. et al. 2001. Endocrine Disruptors in Fish and Fish Cells—In Vitro Versus In Vivo Testing Strategies. Second Status seminar Endocrine Disruptors. Berlin, 2–4 April.
29. BROWN, E.A.R.; SCOTT, D.B.C., 1988. A second hermaphroditic specimen of *Coregonus lavaretus* (L.) (Salmonidae, Coregonidae) from Loch Lomond, Scotland. *J. Fish Biol.* 33, 957–958.
30. BRUNELLO, A. E. M. 2004 Reversão sexual para a obtenção de populações monossexo de tilápias. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div31.htm>>. Acesso em: 10 de outubro de 2004.

31. CABRERA, C. et al. 1998. Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 154, 55– 81.
32. CARLBERG, G.E. et al. 1987. Environmental impact of organochlorine compounds discharged from the pulp and paper industry. *Paperi ja Puu- Paper och Trä*, v. 4: 337-341.
33. CASSARETT, L. J.; DOULL, J. 1996. *Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 5th ed. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
34. CCME, 1999. *Canadian Environmental Quality Guidelines*. Canadian Council of Ministers of the Environment. Environment Canada, Winnipeg, MB.
35. CHAN, S.T.H., YEUNG, W.S.B., 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In: *Fish Physiology: Reproduction*. Academic Press, New York, pp. 171–222.
36. CLEMONS, L. H. et al. 1998. Evidence of estrogen- and TCDDlike activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using in vitro gene expression assays. *Environ Sci Technol* 32:1853–1860.
37. CODY, R. P.; BORTONE, S. A., 1997. Masculinization of Mosquitofish as an Indicator of Exposure to Kraft Mill Effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 58: 429-436.
38. COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. 1993. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384.
39. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. 1999. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. COM 706. Brussels, Belgium, pp 9–19.
40. COUILLARD, C.M.; NELLIS, P., 1999. Organochlorine contaminants in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached kraft pulp mill in the Miramichi estuary, New Brunswick, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2545–2556.

41. DAVIE, P.S.; THORARENSEN, H., 1997. Heart growth in rainbow trout in response to exogenous testosterone and 17 α -methyl testosterone. *Comp. Biochem. Physiol. A* 117, 227–230.
42. D'SURNEY S.J.; EDDY, L.P.; FELDER, D.P., 2000. Assessment of the impact of a bleached kraft mill effluent on a south-central USA river. *Environmental Toxicology*, v. 15(1): 28-39.
43. DUBÉ, M.G.; MACLATCHY, D.L., 2000. Endocrine responses of *Fundulus heteroclitus* to effluent from a bleached-kraft pulp mill before and after installation of reverse osmosis treatment of waste stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2788–2796.
44. DUBÉ, M.G.; MACLATCHY, D.L., 2001. Identification and treatment of a waste stream at a bleached-kraft pulp mill that depresses a sex steroid in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 985–995.
45. DURHAN, E.J. et al. 2002. Evaluation of androstenedione as an androgenic component of river water downstream of a pulp and paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1973–1976.
46. EFLUENTES PAPELEIROS. Disponível em: <<http://www.quimica.ufpr.br/~tecnorat/papeleiros.htm>>. Acesso em: 27 de maio de 2004.
47. ELLIS, R.J. et al. 2003. In vivo and in vitro assessment of the androgenic potential of a pulp and paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1448-1456.
48. FANTUZZI NETO, H. 1997. Dissolução de constituintes químicos da madeira de *E. grandis* durante a polpação Kraft convencional e modificada. Viçosa. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
49. FENSKE, M.; SEGNER, H., 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 67, 105–126.
50. FOLMAR, L.C. et al. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* 104, 1096–1101.

51. FRY, D.M.; TOONE, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213, 922–924.
52. GIBBONS, W.N. et al. 1998. Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species. 2: Comparison between responses of trout-pecch (*Percopsis omiscomyus*) and white sucker (*Catostomus commersoni*) downstream of a pulp mill. *Environ Toxicol Chem* 17:2238-2245.
53. GIMENO, S. et al. 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384, 221–222.
54. GIMENO, S. et al. 1997. Disruption of Sexual Differentiation in Genetic Male Common Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to an Alkyphenol during Different Life Stages. *Environmental Science & Technology*, v. 3 (10): 2884-2890.
55. GRAY, E.L. et al. 1997. Endocrine screening methods workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod. Toxicol.* 11, 719– 750.
56. GRAY, L.E. JR et al. 2002. Xenoendocrine disrupters- tiered screening and testing: Filling key data gaps. *Toxicology* 181–182:371–382.
57. GUIGUEN, Y. et al. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Repro. Dev.* 54, 154–162.
58. HABIBI, H.R.; HUGGARD, D.L., 1998. Testosterone regulation of gonadotropin production in goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119, 339–344.
59. HAHLBECK, E.; GRIFFITHS, R.; BENGTTSSON, B.E. 2004a. The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption I. Sexual differentiation. *Aquatic Toxicology* 70, 287–310
60. HAHLBECK, E. et al. 2004b. The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption II— kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquatic Toxicology* 70, 311–326.

61. HAHN, M.E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121, 23–53.
62. HARRIES, C.A. et al. 1997. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* 105, 802–811.
63. HARRIES, J.E. et al. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1993–2002.
64. HARTLER, N. 1996. Modified kraft cooking – present and future. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON NEW AVAILABLE TECHNIQUES*, 5., Stockholm, 1996. Proceedings. Stockholm: Walter de Gruyter. p. 424-435.
65. HASHIMOTO, S. et al. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohame*) from Tokyo bay, Japan. *Mar. Environ. Res.* 49, 37–53.
66. HERMAN, R. L.; KINAID, H. L., 1988. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* 72, 165-172.
67. HERSCHMILLER, D.W. 1997. A new process for pulping with high initial hydrosulfide concentration. *Tappi Journal*, v. 80, n. 3, p. 112-121.
68. HEWITT, L.M. et al., 2000. Characteristics of ligands for the Ah receptor and sexsteroid receptors in fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4327–4334.
69. HEWITT, M. et al., 2000. Characteristics of Ligands for the Ah Receptor and Sex Steroid Receptors in Hepatic Tissues of Fish Exposed to Bleached Kraft Mill Effluent. *Environmental Science & Technology.*, 34 (20), 4327 -4334.
70. HOWELL, W.M.; BLACK, D.A.; BORTONE, S.A. 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia* 4, 676–681.
71. HUNSINGER, R.N.; BYRAM, B.R.; HOWELL, W.M. 1988. Unchanged gonadal morphology of mosquitofish masculinized by exposure to degraded plant sterols. *J. Fish Biol.* 32, 795–796.

72. HUNTER, G.A.; DONALDSON, E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S., Randell, D.J., Donaldson, E.,M. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. IXb. Academic Press, New York, pp. 223–291.
73. HORNING, M.W. et al. 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17 α -methyltestosterone: conversion of 17 α -methyltestosterone to 17 α -methyltestosterone-17 β -diol. *Aquat. Toxicol.* 66, 15–23.
74. ISLINGER, M. et al. 1999. Measurement of vitellogenin-mRNA in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection assay. *Sci. Total Environ.* 233, 109– 122.
75. JENKINS, R. J., et al., 2001. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1325-1331.
76. JENSEN, A.; BRO-RASMUSSEN, F. 1992. Environmental cadmium in Europe. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 125, 101–181.
77. JOBLING, S; et al. 1996. Inhibition of testicular Growth in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15 (2): 194-202.
78. JOBLING, S. et al. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506.
79. JOBLING, S. et al. 2003. Comparative responses of mollusks and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 65:205–220.
80. JOHSEN, K. et al. 1995. Uptake and elimination of resin acid and physiological responses in rainbow trout exposed to total mill effluent from an integrated newsprint mill. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 14 (9):1561-1568.
81. JONES, P.D. et al. 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ Toxicology and Chemistry*. 22:2639-2649.
82. JOSEPH, D.R. 1994. Structure, function and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm.* 49:197-280.

83. KAH, O. et al. 1997. Estrogen receptors in the brain-pituitary complex and the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 53–62.
84. KARELS, A.; OIKARI, A., 2000. Effects of pulp mill effluents on the reproductive and physiological status of perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) during the spawning period. *Annals of Zoology Fennica* v. 37 (2): 65-77.
85. KAZETO, Y.; PLACE, A.R.; TRANT, J.M. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25–34.
86. KELCE, W.R. et al. 1994. Environmental hormone disruptors—evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 276–285.
87. KELLY, S.A.; DIGIULIO, R.T., 2000. Developmental toxicity of estrogenic alkylphenols in killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2564–2570.
88. KIRK, L.A. et al. 2002. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ. Tox. Chem.* 21, 972–979.
89. KITANO, T. et al. 2000. Aromatase inhibitor and 17-alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 56, 1–5.
90. KLOAS, W.; LUTZ, I.; EINSPANIER, R. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59–68.
91. KOBAYASHI, M.; NAKANISHI, T. 1999. 11-Ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 178–187.
92. KÖRNER, W. et al. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environ Toxicol Chem* 20:2142–2151.

93. KOMEN, J. et al. 1989. Effects of oral administration of 17 α -methyltestosterone and 17 α -estradiol on gonadal development in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 78, 349–363.
94. KRISFALUSI, M.; CLOUD, J.G. 1999. Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 284, 466–472.
95. KRINGSTAD, K. P.; LINDSTROM, K. 1984. Spent liquors from pulp bleaching. *Environmental Science Technology*, v. 18(8):236A-248A.
96. KROON, F.J.; LILEY, N.R. 2000. The role of steroid hormones in protogynous sex change in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii* (Teleostei:Gobiidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 273–283.
97. KROTZER, M.J. 1990. The effects of induced masculinization on reproductive and aggressive behaviors in the female mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environ. Biol. Fish.* 29, 127–134.
98. KWON, J.Y. et al. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Exp. Zool.* 287, 46–53.
99. LÄNGE, R. et al. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 α -(ethynylestradiol on the life cycle of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1216–1227.
100. LARSSON, D. G. J.; HALLMAN, H.; FORLIN, L. 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2911–2917.
101. LARSSON, D. G. J.; FORLIN, L. 2002. Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: temporary recovery after a short-term shutdown. *Environ. Health Perspect.* 110, 739–742.
102. LAWS, S. C.; CAREY, S.A.; KELCE, W.R. 1995. Differential effects of environmental toxicants on steroid receptor binding. *Toxicologist* 15, 294.
103. LEBLANC, J.; COUILLARD, C. M.; BRETHERS, J. C. M. 1997. Modifications of the reproductive period in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached kraft pulp mill in the Miramichi estuary, New Brunswick, Canada. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 54, 2564–2573.

104. LEHTINEN, K. J. 1992. Environmental Effects of Chlorine Bleaching - Facts neglected? *Paperi Ja Puu - Paper and Timber*, v. 74 (9):715-719.
105. LEHTINEN K. J. et al. 1999. Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival, and offspring of brown trout (*Salmo trutta lacustris* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 42:40–49.
106. LILEY, N. R.; STACEY, N. E., 1983. Hormones, pheromones and reproductive behavior. In: Hoar, W.S., Randell, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. IXb. Academic Press, New York, pp. 1–63.
107. LISTER, A.L.; VAN DER KRAAK, G. 2001. Endocrine disruption: why is it so complicated? *Water Qual. Res. J. Canada* 36, 175–190.
108. MACLATCHY, D.; PETERS, L.; NICKLE, J.; KRAAK, G. V. D. 1997. Exposure to β -Sitosterol Alters the Endocrine Status of Goldfish Differently than 17β -Estradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16 (9) :1895-1904.
109. MACLATCHY, D. L.; VAN DER KRAAK, G. 1995. Effects of the phytoestrogen B-sitosterol on the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 305–312.
110. MAKYNEN, E. A. et al. 2000. Effects of the mammalian anti-androgen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 48, 461–475.
111. MARSSHECK, W.J.; KRAYCHY, S.; MUIR, R. D. 1972, Microbial degradation of sterols. *Appl. Microbiol.* 23,72-77.
112. MATTHIENSEN, P.; GIBBS, P., 1997. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Tox. Chem.* 17, 37–43.
113. MATTHIENSEN, P.; SUMPTER, J. P. 1998. Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 319–335.

114. MCARDLE, M. et al. 2000. Estrogenic and CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent. *Mar. Environ. Res.* 50, 175–179.
115. MCMASTER, M. E.; VAN DER KRAAK, G. J.; MUNKITTRICK, K. R. 1996. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp Biochem Physiol C* 112:169-178.
116. MELLANEN, P. et al. 1996. Wood-derived estrogens: Studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 136:381–388.
117. MERCURE, F.; VAN DER KRAAK G. 1995. Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. *Lipids* 30:547–554.
118. MOCHIDA, K. et al. 2004. Effects of endocrine-disrupting chemicals on expression of ubiquitin C-terminal hydrolase mRNA in testis and brain of the Japanese common goby. *Aquatic Toxicology* 70, 123–136.
119. MUKHERJEE, D. et al. 1991. Impairment of steroidogenesis and reproduction in sexually mature *Cyprinus carpio* by phenol and sulfide under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 21:29–40.
120. MUNKITTRICK, K. R. et al. 1991. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population, *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 48, 1371-1380.
121. MUNKITTRICK, K. R. et al. 1994. Survey of receiving water environment impacts associated with discharges from pulp mills. 2 Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environ Toxicol Chem* 13:1089-1101.
122. MUNKITTRICK, K. R. et al. 1998. An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *J. Toxicol. Environ. Health: B Crit. Rev.* 1, 347–371.
123. NAGAHAMA, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38 (2), 217–229.

124. NAKAMURA, M. et al. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281, 362–372.
125. NORRIS, D.O. et al. 1999. Impaired adrenocortical response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the Eagle River, Colorado. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 1–8.
126. ORGANIZATION FOR ECONOMIC DEVELOPMENT, 1999. Final report from the OECD expert consultation meeting, London, UK, 28–29 October 1998. Report 9906. Environmental Health and Safety Division, Paris, France.
127. OWENS, J.W., 1991. The hazard assessment of the pulp and papereffluents in the aquatic environment: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1511–1540.
128. PADUA, D. M. C., 2005. Anatomia e Fisiologia – Aula 10, Piscicultura, Departamento de Zootecnia, Universidade Católica de Goiás. Disponível em: <http://agata.ucg.br/formularios/sites_docentes/zoo/delma/pdf/aulas/ANATOMIA.pdf> Acesso em: 20/06/2005.
129. PANDIAN, T.J.; SHEELA, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1–22.
130. PAPEL E CELULOSE, 2004. Conheça as principais Etapas Químicas na indústria de celulose e papel. Disponível em : <http://www.quimica.com.br/revista/qd386/papel_celulose5.htm> Acesso em : 27/05/2004.
131. PARKS, L.G. et al. 2001. Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicol. Sci.* 62, 257–267.
132. PATINO, R., 1997. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *Prog. Fish-Culturist* 59, 118–128.
133. PAVLIDIS, M. et al. 2000. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 287, 225–232.

134. PAWLOWSKI, S. et al. 2000. Temperature-dependent vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18 .C. *Toxicol. In Vitro* 14, 531– 540.
135. PAWLOWSKI, S. et al. 2003. Combined in situ and in vitro experiments to assess estrogenic activity of environmental water samples. *Toxicol. Sci.* 75, 57–65.
136. PAWLOWSKI, S. et al. 2004. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicol. In Vitro* 18, 129–138.
137. PEDROSA, R.C. et al. 1997. Effect of bleaching eucalyptus kraft pulp effluent from a brazilian industry on the expression of cytochrome P4501A1 of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Proceedings of The Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of the Lignins and Others Wood Components.* p. 449-453.
138. PIEAU, C. et al. 1994. Environmental control of gonadal differentiation. In: Short RV & Balahan E, eds, *The Difference Between the Sexes*, Cambridge, UK, University Press, pp 433-450
139. PIFERRER, F.; BAKER, I.J.; DONALDSON, E.M. 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 91, 59–65.
140. PIFERRER, F.; DONALDSON, E.M. 1989. Gonadal differentiation in Cohosalmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture* 77, 251–262.
141. PIFERRER, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
142. PISCICULTURA TERRA MÃE, 2006. Espécies – Tilápia do Nilo. Disponível em : <<http://www.terra-mae.com.br/especies.asp?tipo=tilapia>> Acesso em 10 de janeiro de 2006.
143. POJANA, G. et al. 2004. Estrogenic Potencial of the Venice, Italy, Lagoon Waters, Department of Environmental Sciences, University of Venice, Calle Larga S.Marta, 2137, I-30123 Venice, Italy. *Toxicol. Chem.* 23, 1877.

144. POU, M. S., 2003. A Indústria de Papel no Brasil, Bracelpa - BNDES - Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/Doutor%20Celulose/2003/Florestal/031112florestal12.zip>> Acesso em: 20 de dezembro de 2004
145. PURDOM, C.E. et al. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *J Chem Ecol* 8:275–285.
146. RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R., 1985. Introduction. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere, London, UK, pp. 1–28.
147. RODGERS-GRAY, T.P. et al. 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1521– 1528.
148. ROSA-MOLINAR, E.; WILLIAMS, C.S., 1984. Notes on fecundity of an arrhenoid population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*. *Northeast Gulf Sci.* 7, 121–125.
149. ROUTLEDGE, E.J. et al. 1998. Identification of estrogenic chemical in STW effluents. 1. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565.
150. ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Tox. Chem.* 15, 241–248.
151. SADOVY, Y.; SHAPIRO, D.Y., 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, 136–156.
152. SCOTT, G.R.; SLOMAN, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392.
153. SEGNER, H. et al., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 302-314.

154. SEPULVEDA M.S. 2000. Effects of paper mill effluents on the health and reproductive success of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Field and laboratory studies. PhD thesis. University of Florida, Gainesville, FL, USA.
155. SEPULVEDA M.S. et al. 2001. Assessment of reproductive effects in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to bleached/unbleached kraft mill effluents. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:475–482
156. SEPÚLVEDA, M.S. et al. 2002. Assessment of reproductive effects in the largemouth bass (*Micropterus salmonides floridanus*) sampled from the St. Johns river. *Sci. Total Environ.* 289, 133–144.
157. SHARPE, R.L. et al. 2004. Effects of a model androgen (methyltestosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in a short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay. *Aquatic Toxicology* 67, 203–215.
158. SINGH, H.; SINGH, T.P., 1980. Effects of two pesticides on testicular P uptake, gonadotrophic potency, lipid and cholesterol content of testes, liver and blood serum during spawning phase in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Endokrinol.* 76(3), 288-296.
159. SINGH, M.S.; JOY, K.P., 1998. Effects of administration of cyproterone acetate on seminal vesicle and testicular activity, and serum testosterone and estradiol-17_β levels in the catfish, *Clarias batrachus*. *Acta Biol.* 49, 143–154.
160. SOARES, C.H.L. et al. 1997. Histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to pulp bleaching effluent. *Caderno de Resumos do International Symposium on Biology of Tropical Fishes, Manaus*, p. 116.
161. SOARES, C.H.L.; MOSIMANN, A L.P., 2000. Estudo Comparativo da Toxicidade de Efluentes de Indústrias de Papel e Celulose Utilizando Parâmetros Bioquímicos em Ecotoxicologia. In: *Ecotoxicologia – Perspectivas Para o Século XXI* (Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Neto, A.L.O., eds.), Rima Editora, São Carlos, SP., p.471-482.
162. SOARES, C.H.L.; DURÁN, N., 2001. Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained into E1-pulp bleaching effluent by fungal treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 95 : 135-149.

163. SOTO, A.M. et al. 1991. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92, 167–173.
164. SOTO, A.M. et al. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103, 113–122.
165. SOUZA, V.H. 2006. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.
166. SPERRY, T.S.; THOMAS, P. 1999. Identification of two nuclear androgen receptors in kelp bass (*Paralabrax clathratus*) and their binding affinities for xenobiotics: comparison with Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) androgen receptors. *Biol. Reprod.* 61, 1153–1161.
167. STOCCO, D.M., 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J. Endocrinol.* 164, 247–253.
168. STRUESSMANN, C.A. et al. 1997. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two altherinid fishes. *J. Exp. Zool.* 278, 167–177.
169. SUMPTER, J.P., 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol. Lett.* 82–83, 737–742.
170. SUMPTER, J.P., 1998. Xenoendocrine disruptors environmental impacts. *Toxicol. Lett.* 102/103, 337–342.
171. SUMPTER, J.P., 1998. Xenoendocrine disruptors—environmental impacts. *Toxicol. Lett.* 102–103, 337–342.
172. SUNTIO, L.R.; SHIU, W.Y.; MACKAY, D., 1988. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere* v.17 (7), p. 1249-1290.
173. TABATA, Y.A. [2000] Atualização sobre métodos e procedimentos para obtenção de populações monossexo de peixes: Produção de Fêmeas. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo. Disponível em : <<http://www.aquicultura.br/trutas/estagios/producaodefemeas.doc>> Acessado em 15 de janeiro de 2006.

174. TALKA, E.; PRIHA, M., 1987. Fractionation and identification of some biologically active compounds in bleached Kraft mill effluents. *Paperi ja Puu - Paper och Trä*. v. 3, p. 221-228.
175. TAVE, D. 1993. Review of basic genetics. *Genetics for fish hatchery managers*. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 7-20.
176. TRUSCOTT, B. 1979. Steroid metabolism in fish. Identification of steroid moieties of hydrolyzable conjugates of cortisol in the bile of trout *Salmo gairdnerii*. *Gen Comp Endocrinol* 38:196–206.
177. TERNES, T.A. et al. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigation in Germany, Canada, and Brazil. *Sci Total Environ* 225:81–90.
178. THOMAS, K.V. et al. 2004. Identification of in vitro estrogen and androgen receptor agonists in North Sea offshore produced water dischargers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 5, pp. 1156–1163.
179. THOMAS, K.V. et al. 2002a. An assessment of estrogen androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environ Toxicol Chem* 21:1456–1461.
180. THOMAS, K.V. et al. 2002b. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environ. Tox. Chem.* 21, 1456– 1461.
181. THOMAS, P., 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring in “Biological Indicators of Stress in Fish” 8th Symposium of The American Fisheries Society Ed. Adans, S.M., Bethesda, Maryland, USA, p. 9-28.
182. THORPE, K.L. et al. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1142–1149.
183. THORPE, K.L. et al. 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 35, 2476–2481.

184. TILLMANN, M. et al. 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III. Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373–388.
185. TOFT, G.; BAATRUP, E.; GUILLETTE JR.; L.J. 2004. Altered social behavior and sexual characteristics in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) living downstream of a paper mill. *Aquatic Toxicology* 70 , 213–222.
186. TREMBLAY, L.; VAN DER KRAAK, G., 1998. Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of B-sitosterol in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 43, 149–162.
187. TREMBLAY, L.; VAN DER KRAAK, G., 1999. Comparison between the effects of the phytosterol b-sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 18:329–336.
188. TSAI, M.J.; O'MALLEY, B.W., 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451–486.
189. TYLER, C.R.; JOBLING, S.; SUMPTER, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319–361.
190. USEPA, 2001. Update of ambient water quality criteria for cadmium. EPA-822-R-01-001, Office of Water, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
191. USEPA, 1997. Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. EPA/630/R-96/012. Risk Assessment Forum, Washington, DC.
192. VAN DEN HEUVEL, M. R.; ELLIS , R. J. 2002. Timing of exposure to a pulp and paper effluent influences the manifestation of reproductive effects in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 11, pp. 2338–2347.
193. VAN DEN HURK, R.; SLOFF, G.A.. 1981. A morfological and experimental study of sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research* 218: 487-497.

194. VAN DER KRAAK, G.J. et al. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiples sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115,224-233.
195. VINGGAARD, A.M.; HNIDA, C.; LARSEN, J.C. 2000. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology* 145:173–183.
196. VOS, J.G. et al. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71–133.
197. VONDRACEK, J. et al. 2004. Induction of aryl hydrocarbon receptor-mediated and estrogen receptor-mediated activities, and modulation of cell proliferation by dinaphthofurans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 9, pp. 2214–2220.
198. WELLS, K.; VAN DER KRAAK, G. 2000. Differential binding of endogenous steroids and chemicals to androgen receptors in rainbow trout and goldfish. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2059–2065.
199. WILHELM FILHO, D. et al. 1997. Effect of pulp mill effluent on two fish species. *Proceedings of The Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of the Lignins and Others Wood Components* p. 612-619.
200. WOOD, C.M. 2001. Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D., Benson, W.H. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Taylor and Francis, London, UK. pp. 1–89.
201. YAMAMOTO, T. 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randell, D.J. (Eds.), *Fish Physiology (III)*. Academic Press, New York, pp. 117–175.
202. YAMAZAKI, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33: 329-354.
203. ZERULLA, M. et al. 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Lett.* 131, 51–56.