

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CRESCIMENTO E FEMINILIZAÇÃO DE LARVAS DE
JUNDIÁS *Rhamdia quelen* SUBMETIDAS A DIETAS COM
HORMÔNIOS ESTERÓIDES FEMININOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tanise dos Santos Medeiros

Santa Maria, RS, Brasil

2009

CRESCIMENTO E FEMINILIZAÇÃO DE LARVAS DE
quelen **SUBMETIDAS A DIETAS COM JUNDIÁS *Rhamdia***
HORMÔNIOS ESTERÓIDES FEMININOS

por

Tanise dos Santos Medeiros

Dissertação Apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal –
Fisiologia de Peixes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau
de
Mestre em Zootecnia

Orientador: Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil
2009

M488c Medeiros, Tanise dos Santos.

Crescimento e feminilização de larvas de Jundiás *Rhamdia quelen* submetidas a dietas com hormônios esteróides femininos / Tanise dos Santos Medeiros ; Bernardo Baldisserotto. – Santa Maria, 2009.
50f. : figs. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

Inclui Bibliografia.

1. Peixe-Criação. 2. Transsexualismo. 3. *Rhamdia quelen*. 4 Fêmeas.
I. Baldisserotto, Bernardo. II. Título.

CDU: 639.2.04

Elaborada por: Simone da Silva Conceição CRB
14/526

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**CRESCIMENTO E FEMINILIZAÇÃO DE LARVAS DE
JUNDIÁS *Rhamdia quelen* SUBMETIDAS A DIETAS COM
HORMÔNIOS ESTERÓIDES FEMININOS**

elaborada por
Tanise dos Santos Medeiros

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Everton Rodolfo Behr, Dr. (UDESSM)

Maria Amália Pavanato, Dr. (UFSM)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo em mais essa caminhada.

Tenho muito a agradecer, em especial ao meu orientador professor Bernardo Baldisserotto, primeiramente por ter acreditado no meu potencial de produzir uma dissertação e sempre estar disponível para esclarecer dúvidas, organizar, corrigir, alertar, enfim orientar, tenho muito orgulho de ter participado a menos um pouquinho dos teus conhecimentos.

Agradeço em especial as pessoas que mais me deram força e incentivo durante esses anos que são as mais importantes na minha vida, meu marido Adonis e minha filha Laura. E a todos que de uma forma e outra ajudaram na realização deste trabalho, mãe, Nani, Gabi, Márcia, Adriano, tia Neusa, Rafael, Tabita, Laiane, as professoras Analéia, Lílian e Ana Rúbia, muito obrigada por terem cuidado da Laura para eu poder trabalhar este projeto.

Obrigada a todos que contribuíram com o meu trabalho, o pessoal do laboratório, Alexssandro, Daiane, Daniele, Dirlaine, Karine, Luciano, Mauro, Tatiane, não posso esquecer de todos do laboratório de piscicultura em especial a Maria, o Ronaldo, o João Batista, a Viviane, o professor Radünz que me acompanham desde o tempo da graduação, vocês foram muito importantes, e gostaria de deixar um agradecimento especial a Francesca por ter contribuído para as análises histológicas e ser super amiga, me hospedou com muito carinho na sua casa com sua família, muito obrigada Keka.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Curso de pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade de fazer o mestrado. Aos professores da banca por terem atendido um convite e terem contribuído para o meu trabalho, a professora Kátia por emprestar o laboratório e os seus conhecimentos.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

**CRESCIMENTO E FEMINILIZAÇÃO DE LARVAS DE JUNDIÁS *Rhamdia quelen*
SUBMETIDAS A DIETAS COM HORMÔNIOS ESTERÓIDES FEMININOS**

AUTORA: TANISE DOS SANTOS MEDEIROS
ORIENTADOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

As técnicas de inversão sexual servem para destacar vantagens existentes sobre um dos sexos nas diferentes espécies de peixes, várias espécies de interesse comercial já foram analisadas sob este aspecto. Pesquisas recentes demonstram crescimento superior da fêmea jundiá em relação ao macho na fase adulta, mas não existem ainda dados de dosagens, princípios ativos hormonais, nem estágio de aplicação e desenvolvimento da espécie sob o efeito de tratamento de inversão sexual. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi determinar níveis e princípios ativos hormonais femininos para a inversão sexual de larvas de jundiá avaliando o seu crescimento. Foram testados as inclusões de 10, 20, 40 e 50 mg/kg de ração de benzoato de estradiol e os princípios ativos do estradiol: valerato, cipionato e 17 β -estradiol no nível de 30 mg/kg ração por 20 dias experimentais. A análise histológica das gônadas aos 40 dias experimentais demonstrou até 96% de fêmeas nas dosagens 20, 40 e 50 mg/kg de hormônio na ração. Larvas alimentadas com o maior nível de hormônio (50mg/kg de ração) apresentaram menores valores de peso em relação aos demais tratamentos. Não houve diferença significativa na sobrevivência larval entre os tratamentos. Testando os princípios ativos do estradiol aos sete dias, o peso médio das larvas da dieta sem hormônio foi maior que os demais tratamentos. Aos 21 dias do experimento somente o tratamento com cipionato de estradiol apresentou peso inferior em relação aos demais tratamentos, os quais não tiveram diferenças entre si. Nos 40 dias do experimento o ganho de peso por ocasião da inclusão de 30mg/kg de cipionato de estradiol foi superior aos demais. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos na inversão sexual das larvas pela inclusão de 30mg/kg de valerato, cipionato, 17 β -estradiol e sem hormônio.

Palavras-chave: desempenho, fêmeas, inversão sexual, *Rhamdia quelen*, peixes.

ABSTRACT

Master dissertation

Postgraduate Program in Animal Husbandry

Universidade Federal de Santa Maria

**GROWTH AND SEX REVERSAL OF SILVER CATFISH LARVAE FED DIETS
WITH FEMALE STEROID HORMONES**

AUTHOR: TANISE DOS SANTOS MEDEIROS

ADVISOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

The techniques of sex reversal serve to highlight existing advantages on one of the sexes in different fish species, several species of commercial interest have been considered in this respect. Recent studies show that in silver catfish there is higher growth in female compared to male, but there is still no data regarding dose, active hormone, or stage of development and application of hormones for sex reversal. Therefore, the objective of this study was to determine dose and active principles of female steroid hormone levels for sex reversal in catfish larvae, as well as evaluating its growth under the effect of these treatments. The inclusion of 10, 20, 40 and 50 mg/kg feed of estradiol benzoate and the active principles of estradiol: valerate, cipronate and 17 β -estradiol level of 30 mg/kg was tested for 20 days. Histological analysis of gonads at 40 days showed up to 96% females at doses 20, 40 and 50 mg/kg feed. Larvae fed the highest hormone level (50 mg / kg feed) had lower weight values compared to other treatments. There was no significant difference in survival between the larval treatments. Testing the active ingredients of estradiol up to seven days, the average weight of larvae of the diet without hormone was higher than the other treatments. At 21 days of the experiment only larvae of the treatment with cipronate of estradiol showed lower weight compared to the other treatments, which did not differ between themselves. At 40 days of experiment the weight gain in larvae fed 30mg/kg of cipronate of estradiol was superior to the others. There were no significant differences between treatments on sex reversal of the larvae by adding 30mg/kg of valerate, cipronato, 17 β -estradiol and without hormone.

Key-words: development, feminilization, *Rhamdia quelen*, fish

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
Indução da inversão sexual	15
Feminilização.....	16
Masculinização.....	17
OBJETIVO GERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
RESULTADOS.....	20
Manuscrito 01: Inversão sexual, crescimento e sobrevivência em larvas de jundiá <i>Rhamdia quelen</i> submetidas a dietas com diferentes níveis de benzoato de estradiol.....	20
Resumo.....	21
Abstrac.....	22
Introdução.....	23
Materiais e Métodos.....	24
Qualidade da água.....	25
Determinação do sexo.....	25
Análise do desenvolvimento.....	25
Análise estatística.....	25
Resultados.....	26
Discussão.....	26
Conclusão.....	27
Agradecimentos.....	31
Referências.....	31
Manuscrito 02:Inversão sexual e crescimento de larvas de jundiá, <i>Rhamdia quelen</i> , alimentadas com rações contendo diferentes princípios ativos de	

estradiol.....	33
Resumo.....	34
Abstratc.....	35
Introdução.....	36
Materiais e Métodos.....	37
Determinação do sexo.....	38
Análise do desenvolvimento.....	38
Análise estatística.....	38
Resultados.....	38
Qualidade da água.....	38
Discussão.....	39
Conclusão.....	40
Agradecimentos.....	43
Referências.....	43
CONCLUSÕES.....	45
BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	46

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 01

TABELA1- Ração base utilizada para as inclusões de benzoato de estradiol e análise laboratorial realizada no Departamento de Zootecnia, Laboratório de Nutrição Animal (LNA).....28

TABELA 2- Peso, comprimento, sobrevivência, biomassa e taxa de crescimento de larvas de jundiá submetidas a dietas com diferentes níveis de inclusões de benzoato de estradiol.....29

Manuscrito 02

TABELA 3- Peso médio e crescimento total de larvas de jundiá, submetidos a dietas com diferentes princípios ativos do estradiol.....41

TABELA 4- Machos e fêmeas da amostra retirada aos 40 dias experimentais nos diferentes princípios ativos de estradiol.....42

TABELA5- Ração base utilizada para as inclusões de benzoato de estradiol e análise laboratorial realizada no Departamento de Zootecnia, Laboratório de Nutrição Animal (LNA).....42

LISTA DE FIGURAS**Manuscrito 01**

FIGURA - Porcentagens de machos e fêmeas obtidas nas larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) alimentadas com diferentes níveis de inclusão na dieta de benzoato de estradiol	30
---	----

INTRODUÇÃO

O estudo da sexualidade em peixes é um assunto de grande importância na aquicultura, visto que, de acordo com Yamazaki (1983) há diferenças na taxa de crescimento, padrão comportamental, época de reprodução, coloração do corpo, forma e tamanho entre machos e fêmeas. Desta maneira, as técnicas de inversão sexual em peixes apresentam um grande potencial para aumentar a produtividade em cultivo, pois permitem obter benefícios associados ao sexo que apresentam as características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico.

Nas criações comerciais, uma das principais vantagens obtidas pelo cultivo monossexo é quando um dos sexos apresenta em relação ao outro uma marcada superioridade na taxa de crescimento. Contudo, dependendo da espécie, as técnicas de controle do sexo podem trazer outros benefícios, tais como supressão da reprodução, contenção de gastos energéticos com a atividade reprodutiva, uniformidade de tamanho na despesca, redução dos efeitos da maturação sexual na aparência e na qualidade da carne, bem como a diminuição dos riscos de impacto ambiental decorrente de escapes de peixes para os sistemas naturais (BEARDMORE et al., 2001)

A inversão sexual permite que o criador consiga ter nos seus tanques exemplares de apenas um sexo, preferencialmente o que apresenta melhor crescimento. Por exemplo, alguns machos de truta arco-íris atingem a maturação sexual já nos primeiros meses de vida, enquanto as fêmeas só alcançarão a maturação em dois anos. Nesta espécie a maturação está associada a uma diminuição do ganho de peso, perda da qualidade da carne e maior incidência de doenças. Portanto o criador tem interesse em ter a maior quantidade

de fêmeas por grupo, de modo a obter exemplares de maior tamanho. Em algumas espécies de Cichlidae e Cyprinidae, a inversão de sexo pode proporcionar espécimes que cresçam duas ou três vezes mais rápido que grupos não-tratados. Além disso, com apenas exemplares de um sexo nos tanques, dificilmente haverá desenvolvimento gonadal completo e a energia que seria destinada para o crescimento das gônadas poderá ser toda direcionada para crescimento corporal. Esse princípio é válido para espécies que apresentam alto índice de reprodução, como as tilápias.

A necessidade de produção de alimentos de qualidade e em quantidade capaz de atender a crescente demanda mundial faz dos cultivos alternativos, como a aquicultura, uma atividade promissora para a produção de proteína animal de alta qualidade e quantidade por área utilizada.

A produção global de peixes tem aumentado vigorosamente nos últimos anos, crescendo de 10 milhões de toneladas (mt) em 1980 para 32,9 mt em 1999, sendo estimada a produção de 45 mt durante 2006 (FAO).

O conhecimento da biologia e fisiologia reprodutiva das espécies que possuem interesse econômico é indispensável para acompanhar o avanço da piscicultura como modelo econômico alternativo. O aproveitamento de águas públicas esbarra muitas vezes na legislação que proíbe o uso de espécies exóticas, assim é de fundamental importância à pesquisa e o domínio tecnológico sobre os peixes nativos do Brasil, em especial os adaptados às condições climáticas locais, o caso do jundiá (*Rhamdia quelen*) no sul do Brasil. Esta espécie apresenta crescente interesse por ser rústica, de bom crescimento e fornecedora de carne de excelente qualidade e quantidade. zootécnico em termos de crescimento. É muito importante realizar trabalhos específicos. Em constatação de cultivo,

as fêmeas da espécie jundiá crescem em torno de 30% que os machos, até a fase da primeira maturação sexual, em função de que os machos ficam precocemente maduros e as fêmeas atrasam um pouco mais a sua maturidade sexual (GRAEFF *et al*, 2008).

A administração do hormônio através da alimentação deve iniciar-se antes que o tecido da gônada primitiva tenha se diferenciado em tecido ovariano (POPMA E LOVSHIN, 1996). Por isso, além de mais trabalho que devem ser realizados sobre crescimento específico entre os sexos deve-se elaborar uma formulação hormonal eficaz e fácil de ser utilizada por criadores para inversão sexual dos jundiás, pois não existem dados sobre forma, dose e tempo de aplicação dos hormônios e eficácia dos diferentes tipos de hormônios ou bloqueadores hormonais no processo de feminilização desta espécie.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Indução da inversão sexual

Na fase inicial do desenvolvimento embrionário, os embriões já têm definido geneticamente se vão originar machos ou fêmeas, mas ainda não apresentam sexo definido morfológicamente. Silva (2004), fazendo um estudo do desenvolvimento morfológico do jundiá a 24°C, desde a eclosão até os 21 dias de idade, verificou que a abertura da boca se dá após 24 horas e seus órgãos se definem aproximadamente aos 21 dias após a eclosão, ou seja, esta definição morfológica ocorre na fase larval, sob a ação de hormônios ou mesmo por fatores ambientais. Portanto, se o criador alterar o balanço hormonal da larva ou alguns fatores ambientais, poderá induzir uma mudança do sexo.

A inversão sexual fenotípica de machos para fêmeas ou vice-versa pode ser efetuada através da aplicação de hormônios em duas formas: diretamente na água onde as larvas se encontram ou misturado à ração. É importante conhecer a dosagem correta para a espécie com a qual se pretende trabalhar, pois doses acima ou abaixo da faixa recomendada diminuem significativamente a eficiência do tratamento, podendo inclusive gerar indivíduos estéreis. Dependendo da espécie, idade do peixe e do hormônio, as doses para imersão podem ser de 50 a 5000 µg/L e para administração oral de 5 a 500 mg/kg de ração. A imersão em água com hormônio por apenas algumas horas pode ser suficiente para promover a inversão, mas no caso da administração oral ela se prolonga por 10 - 90 dias. O período mais sensível para a inversão é quando se inicia a diferenciação da gônada, o que varia grandemente entre as espécies já estudadas. Em alguns casos podem ser obtidos

indivíduos com inversão incompleta, gerando hermafroditas (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002).

Feminilização

A expressão do sexo depende de dois eventos: da determinação sexual e da diferenciação sexual. A determinação sexual é responsável pelo sexo genético (ou genotípico), 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 e fêmea, seja morfológico, comportamental, ou funcional (PIFERRER, 2001). Contudo, HARRINGTON (1974) comentou que a diversidade entre 20.000 espécies de teleosteos e o conhecimento limitado sobre sua sexualidade não permite generalização dos mecanismos de determinação e diferenciação de sexo.

Segundo Harper (1990), a diferenciação sexual envolve uma série de sequências de processos ordenados que podem ser descritos como: cromossomo sexual agindo nas gônadas sexuais e refletirá no fenótipo sexual.

Segundo Yamamoto (1969) e Yamazaki (1983) o sexo fisiológico dos peixes é determinado na ontogênese pelo processo biquímico realizado sob controle genético, e vai depender do tipo primário de gônada, isto é, do sexo gonadal.

Nos Salmonídeos o mecanismo de determinação do sexo é similar ao dos anuros, onde as fêmeas são homogaméticas (XX), enquanto que os machos são heterogaméticos (XY).

Segundo Cunningham (1992) a organização sexual da genitália e do cérebro depende da presença, ou ausência, de testosterona.

Segundo Gallien (1944) citado por Houllien (1972), os hormônios androgênicos permitem inverter totalmente o sexo das fêmeas genéticas nos anuros, pois em seus experimentos os girinos de Rã Ruiva criados em presença de propionato de testosterona apresentam testículos na época da metamorfose, até mesmo vários meses mais tarde.

Segundo este autor, os hormônios estrogênicos, em doses fracas na rã, tem uma ação feminilizante, ou seja, um efeito ortodoxo, até a época da metamorfose, mas depois, haverá sempre uma volta ao sexo genético inicial, mesmo se continuar o tratamento hormonal. Entretanto, se os girinos de rã são criados em presença e uma grande dose de hormônio feminino (250 até 1000 micrograma de hormônio por litro de água de criação, ao invés de 50 micrograma no caso precedente), observam-se unicamente machos ou intersexuados na época da metamorfose.

A adição de 17β -estradiol (20 e 50 mg/kg) na dieta de alevinos de peixe-rei *Odontesthes bonasiensis* no período entre 28 a 49 dias (16 - 23°C) após a eclosão (pelo menos) produz 100% de fêmeas (STRÜSSMANN et al., 1996). Doses de 20 e 40 mg/kg provocam 90 e 100% de feminilização do lote, respectivamente, em *Pelteobagrus fulvidraco*, mas aumenta a mortalidade das larvas (até 22% com dose de 40 mg/kg ração) (PARK et al., 2004).

Masculinização

As doses efetivas de metil-testosterona na ração para esta transformação variam: na truta arco-íris doses de 0,5 a 1,0 mg/kg de ração são suficientes para provocar a inversão, mas em tilápias é necessário utilizar 30 a 60 mg/kg. Doses altas de andrógenos podem levar a uma feminilização paradoxal, pois reagem com receptores de esteróides e também porque pode haver uma grande conversão de andrógenos a estrógenos por causa de uma maior ativação da aromatase (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002). Imersão de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de 14 dias por 4 horas em metil-testosterona, metil-dihidrotestosterona ou etinil-testosterona só causa masculinização com doses acima de 600 µg/L no caso de metil-dihidrotestosterona ou 1800 µg/L para os outros andrógenos (WASSERMANN & AFONSO, 2003). Em alguns casos a metil-testosterona pode não ser efetiva, como no caso do “sunshine bass”, um híbrido (*Morone saxatilis* x *Morone*

chrysops). A imersão de larvas deste híbrido (4 dias após eclosão) em 400 µg/L de metil-testosterona por 8 h não alterou a proporção de sexos. Alimentação com rações com 100 mg/kg por 21 dias em larvas a partir de 50 dias ou 30 mg/kg em larvas com 60 ou 103 dias (períodos e doses efetivos para induzir a feminilização com estradiol neste híbrido) também não alterou a proporção de sexos (DAVIS & LUDWIG, 2004). Para a perca prateada (*Pomoxis nigromaculatus*), uma espécie utilizada na pesca esportiva nos Estados Unidos e Canadá, a administração oral de metil-testosterona (60 mg/kg de ração) em peixes com 40 dias de idade durante 45 dias também não aumentaram a proporção de machos, mas a imersão de espécimes da mesma idade em 1 mg/L metiltestosterona ou acetato de trembolona (andrógeno sintético) por 5 h (7 vezes, em intervalos de 3-5 dias) produziu 96-100% de machos (ARSLAN & PHELPS, 2004).

Outro modo de induzir a inversão sexual é a adição de inibidores da síntese de estrógenos, como o fadrozole, um inibidor da enzima aromatase, na ração de larvas. A adição desta substância na ração de larvas de tilápia nilótica com 9 dias, durante 15-30 dias nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, aumentou significativamente a masculinização do lote, chegando a 100% nas doses mais altas (com alimentação por 30 dias) (AFONSO et al., 2001). O tamoxifen, um antiestrógeno, se aplicado na ração de larvas do bagre *Pseudobagrus fulvidraco* nas doses de 100 e 200 mg/kg de ração do terceiro ao vigésimo dia pós-eclosão provoca a masculinização de 74 e 90% do lote, respectivamente (54% no controle), mas o aumento da dose também aumenta a mortalidade das larvas (até 14% com dose de 200 mg/kg de ração) (PARK et al., 2004).

Os machos de jundiá crescem mais que as fêmeas no primeiro ano de vida no ambiente natural (BENADUCE et al., 2006), mas até o momento não se sabe se esta

diferença é devido a uma maturação mais precoce nas fêmeas ou por menor desempenho zootécnico em termos de crescimento.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Induzir a feminilização no jundiá, considerando o tipo e dose de hormônios conhecidos por influenciarem a indução da feminilização sexual em outras espécies de peixes e avaliar o desempenho das larvas.

Objetivos específicos

- 1) Induzir a feminilização de machos de jundiá com diferentes doses de benzoato de estradiol na ração (10,20,40 e 50mg/Kg de ração);
- 2) Comparar o efeito de diferentes princípios de estradiol (17 β -estradiol, valerato de estradiol e cipionato de estradiol) na ração sobre a inversão sexual de jundiá;
- 3) Verificar o efeito destes hormônios no crescimento e sobrevivência de larvas de jundiá.

A seguir estão os artigos que compõem a dissertação.

Manuscrito 01

**Feminilização, crescimento e sobrevivência
em larvas de jundiá *Rhamdia quelen*
submetidas a dietas com diferentes níveis de
benzoato de estradiol**

FEMINILIZAÇÃO, CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA EM LARVAS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* SUBMETIDAS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE BENZOATO DE ESTRADIOL

T.S.Medeiros, V.Corrêa, K. P. Barreto, F. W. Ferreira, B. Baldisserotto

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria ,97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes níveis de benzoato de estradiol na dieta e inversão sexual, crescimento e sobrevivência de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*. Para o experimento foram utilizados lotes de larvas (300 larvas/caixas de 30L) alimentadas com ração a partir do momento em que aceitaram alimentação exógena (3 dias pós-eclosão). A dieta foi acrescida de benzoato de estradiol nas doses de 0, 10, 20, 40 ou 50mg/kg de ração, e o período de tratamento com hormônio durou 20 dias. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata. As larvas receberam alimento em excesso 4 vezes por dia com uma ração baseada em levedura de cana e fígado de ave. No final dos 20 dias foram feitas as contagens, pesagens e medições das larvas, as mesmas foram mantidas separadas nas suas respectivas caixas sob condições normais de cultivo por mais 40 dias para coleta e análise histológica das gônadas visando à determinação do sexo. Observou-se uma porcentagem de fêmeas de até 96% nas dosagens 20, 40 e 50 mg/kg de hormônio na ração. Larvas alimentadas com o maior nível de hormônio (50mg/kg de ração) apresentaram menores valores de peso em relação aos demais tratamentos. Não houve diferença significativa na sobrevivência larval entre os tratamentos. Pode-se concluir que a inversão sexual foi satisfatória a partir da inclusão de 20mg/kg de ração de benzoato de estradiol e o nível maior de hormônio feminino adicionado na dieta prejudicou as larvas no ganho de peso durante o período do tratamento hormonal, mas doses mais baixas não alteraram o crescimento nem a sobrevivência das mesmas.

Palavras-chaves: Desempenho de larvas, feminilização, peixes, princípio hormonal.

SEX REVERSAL, GROWTH AND SURVIVAL OF SILVER CATFISH, *Rhamdia quelen*, LARVAE SUBMITTED TO DIETS WITH DIFFERENT LEVELS OF ESTRADIOL BENZOATE.

T.S.Medeiros, V.Corrêa, K. P. Barreto, F. W. Ferreira, B. Baldisserotto
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria ,97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Abstract

The purpose of this study was to analyze the effect of different levels of estradiol benzoate in the diet on sex reversal, growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, larvae. The diet was added with estradiol benzoate in the dosis of 0, 10, 20, 40 or 50 mg/kg feed, and the time of feeding with hormones was 20 days. All treatments were made in triplicate. Larvae were fed in excess four times a day with feed based on sugar cane yeast and chicken liver. After 20 days larval biometry was performed, but larvae were maintained in their own boxes under normal conditions of cultivation for additional 40 days, to the histological analysis procedures to sex determination. The doses of 20, 40 and 50 mg/kg yielded up to 96% females, and there was no significant difference on survival. Larvae that were fed with the highest hormone level (50mg/kg feed) presented lower weight compared to the other treatments. The obtained results allow concluding that sex reversal was satisfactory with the addition of 20mg/kg of estradiol benzoate in the feed, and the highest level of this hormone reduced weight gain throughout the hormonal treatment, but lower doses did not change growth or larval survival .

Key-words: larval growth, feminilization, fish, steroid hormone.

Introdução

O controle da diferenciação sexual, utilizando esteróides, tem sido realizado em diversas espécies de peixes teleósteos, em que os andrógenos levam a masculinização e estrógenos a feminilização (YAMAMOTO, 1969). A incorporação de estrógenos na ração é uma técnica eficiente na feminilização de *Oreochromis aureus* (MÉLARD, 1995) e *Odontesthes bonariensis* (STRUSSMANN et al., 1996). Contudo, existe tendência de redução do nível de intervenção dos tratamentos hormonais no controle da diferenciação sexual (PIFERRER, 2001).

Na aquíicultura, os principais interesses pela produção de fêmeas variam de acordo com a espécie cultivada, como as características ornamentais (GEORGE & PANDIAN, 1995), maiores taxas de crescimento que os machos e controle da maturidade sexual (GOETZ et al., 1979; STRUSSMANN et al., 1996; HENDRY et al., 2003; SPECKER & CHANDLEE, 2003).

Segundo Blázquez et al. (1995) e Piferrer (2001), a determinação do período de desenvolvimento ontogênico de maior sensibilidade dos animais aos tratamentos com hormônios exógenos estabelece regimes efetivos para a reversão sexual. Parâmetros como duração dos tratamentos, dose entre outros poderão ser ajustados para maior eficiência dos tratamentos (STRUSSMANN et al., 1996).

O período mais sensível para a inversão é quando se inicia a diferenciação da gônada, o que varia grandemente entre as espécies já estudadas. Em alguns casos podem ser obtidos indivíduos com inversão incompleta, gerando hermafroditas (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002).

A espécie utilizada para o desenvolvimento deste trabalho será o. O jundiá (*R. quelen*) é um bagre nativo da América Latina, habita lagos e rios, sendo muito apreciado para consumo nos países deste continente (SALHI et al., 2004). A aceitação de diferentes alimentos, boa adaptação à criação em cativeiro, rápido crescimento e excelente sabor da carne fazem desta espécie uma das mais promissoras da piscicultura brasileira (COLDEBELLA E RADÜNZ NETO, 2002; BARCELLOS et al., 2004).

Diante da carência de informações sobre dosagens hormonais e o desempenho da espécie sobre o princípio ativo hormonal aplicado na feminilização de jundiás, torna-se

necessário à realização de investigações da resposta das larvas sobre ação hormonal de esteróides femininos na inversão sexual de jundiás. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a inversão sexual e o desempenho produtivo de larvas de jundiá, alimentadas com diferentes níveis de inclusão do princípio ativo benzoato de estradiol na dieta.

Material e métodos:

As larvas utilizadas no experimento foram obtidas do Laboratório de piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, através de uma desova induzida utilizando-se extrato hipofisário de carpa, nas doses de 4mg/Kg de para as fêmeas e 2,00mg/Kg para os machos, dois casais reprodutores foram induzidos, com dosagem hormonal única e a desova ocorreu diretamente nas incubadoras cilindro cônicas sem a extrusão dos gametas sexuais. Os ovos permaneceram nas mesmas incubadoras, com aeração e circulação constante da água, em circuito fechado possuindo biofiltro de pedra com substrato para bactérias que degradam amônia e nitrito, em temperatura média de 25°C até a eclosão. As larvas foram retiradas das incubadoras 2 dias após a eclosão.

Diferentes doses de benzoato de estradiol (0, 10, 20, 40 e 50mg/kg ração) foram acrescidas em ração basal preparada conforme descrito por Silva *et al* (2005) (Tabela 1). Os ingredientes foram homogeneizados e o benzoato de estradiol (dissolvido em óleo de canola) foi incluído nesta mistura úmida. Na seqüência, a ração úmida foi submetida à secagem em estufa de circulação, regulada com temperatura de 60°C \pm 2°C. A ração seca foi dividida em granulometrias de 100-200, 200-400 e 400-600 μ m, as quais foram administradas na primeira, segunda e terceira semanas experimentais, respectivamente. Todas as frações foram embaladas em sacos plásticos e mantidas em refrigerador até o momento de consumo.

Todos os tratamentos foram feitos em triplicata. As larvas foram distribuídas aleatoriamente em aquários de 35 L e alimentadas em excesso quatro vezes por dia, por 20 dias. Os aquários continham circuito aberto da água com renovação constante (vazão de 20mL/min), e a limpeza foi realizada diariamente através de sifonagem. No final dos 20 dias de tratamento hormonal os peixes ainda foram mantidos nas suas respectivas caixas

por mais 40 dias, até que pudessem ser utilizadas 20 larvas por caixa para os procedimentos de análise histológica, visando à determinação do sexo. As medidas de peso, comprimento e sobrevivência foram realizadas aos 20 quando acabou fase hormonal e aos 40 dias experimentais utilizaram-se 20 larvas por caixa.

Qualidade da água

Diariamente, pela manhã, foi mensurada a temperatura da água das caixas com termômetro de mercúrio, escala de 1°C e, oxigênio dissolvido com oxímetro digital e, realizada a sifonagem da água das unidades experimentais, para a retirada das excretas e restos de alimento. Semanalmente, foi verificada a dureza, alcalinidade, pH, amônia e nitrito obtidos por métodos de titulação e colorimétrico da água das caixas.

Determinação do sexo

Os peixes foram fixados em formol neutro (5%), para extração das vísceras, as quais passaram por processo de desidratação em álcool etílico 70, 80, 90 e 100% e xilol. Na seqüência, foram incluídas em parafina para o corte, coradas com hematoxilina eosina conforme Mellito de Silveira et al. (1995), a fim de verificar em microscópio o tecido gonadal e o sexo. As análises foram realizadas no núcleo de Análise de Imagens Biológicas (NAIMB) – Laboratório de Ictiopatologia, do Departamento de Biologia e Química da Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, UNIJUI.

Análise do desenvolvimento

Com a finalidade de avaliar a sobrevivência e o crescimento dos jundiás foram estimados parâmetros como: taxa de sobrevivência (%), peso médio individual e comprimento total médio das larvas /tratamentos, taxa de crescimento específico (TCE)= $(\ln \text{ peso médio inicial} - \ln \text{ peso médio final}) / \text{tempo em dias} \times 100$, e a biomassa total obtido do peso médio individual x número de jundiás restantes após final do período avaliado.

Análise estatística

Para a análise dos dados retirados das amostras nos diferentes tratamentos foi

aplicado o teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Como as variâncias foram homogêneas, utilizou-se análise de variância de um fator seguida do teste de Tukey. Os cálculos foram efetuados com o programa Statistica 5.1. O nível mínimo de significância foi de 95% ($P < 0,05$).

Resultados

Todos os parâmetros de qualidade da água se mantiveram dentro das faixas ideais para cultivo de jundiás.

Após 20 dias as larvas alimentadas com ração contendo 50mg/kg de benzoato de estradiol apresentaram peso médio significativamente inferior em relação aos demais tratamentos, mas aos 40 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos. A adição de benzoato de estradiol não alterou significativamente o comprimento e a sobrevivência das larvas (Tabela 2).

As larvas alimentadas com rações contendo 20, 40 e 50mg/kg benzoato de estradiol não tiveram diferenças entre si na porcentagem de fêmeas obtidas, mas esta porcentagem é significativamente superior aos tratamentos sem e com 10mg/kg de benzoato de estradiol (Figura 1).

Discussão

As evidências da existência de um período de maior sensibilidade aos tratamentos hormonais com estrógenos e andrógenos, têm sido constatadas em diferentes espécies como *Oncorhynchus kisutch* (PIFRER & DONALDSON, 1989), *Oncorhynchus mykiss* (KRISFALUSI & NAGLER, 2000), *Oryzias latipes* (KOGER et al., 2000) e *Oreochromis niloticus* (APPLE & LEBOUTE, 1995).

As existências de diferença significativa entre os tratamentos para inversão sexual, podem ser comprovados, pelas evidências histológicas da completa diferenciação sexual nas fêmeas ocorrer antes que nos machos (STRUSSMANN et al., 1996; PIFRER, 2001).

Os resultados de feminilização, ao contrário dos tratamentos com andrógenos, mostram uma melhor resposta nas larvas mais jovens. Em *Oncorhynchus kisutch*, a sensibilidade ao 17β -estradiol ocorre alguns dias antes (aproximadamente 12 dias) que para a 17α -metiltestosterona (PIFRER & DONALDSON, 1989), sendo então uma das

suposições do resultante desta pesquisa apresentar inversão satisfatória para fêmeas de jundiá.

Koger et al. (2000), estudando o estágio de maior sensibilidade de *Oryzias latipes* a testosterona e 17 β -estradiol, não verificaram diferenças significativas quanto à mortalidade e peso corporal, porém dados sobre a ação do benzoato de estradiol são inexistentes, como o nível mais elevado diminuiu o peso das larvas aos 7 dias significativamente em relação aos demais tratamentos da pesquisa e a resposta de inversão não foi superior do que os níveis 10 e 20 mg/kg de ração, recomenda-se usar níveis menores para inversão feminina de jundiás.

Conclusão

Pode-se concluir que a inversão sexual foi satisfatória a partir da inclusão de 20mg/kg de ração de benzoato de estradiol e o nível maior de hormônio feminino adicionado na dieta prejudicou as larvas no ganho de peso durante o período do tratamento hormonal, mas doses mais baixas não alteraram o crescimento nem a sobrevivência das mesmas.

Tabelas

TABELA 1- Ração base utilizada para as inclusões de benzoato de estradiol e análise laboratorial realizada no Departamento de Zootecnia, UFSM, Laboratório de Nutrição Animal (LNA)

INGREDIENTES	% MS					
Fígado de aves (in natura)	33					
Levedura de cana	57					
Farelo de arroz desengordurado	6					
Lecitina de soja	2					
Premix Vitamínico	1					
Premix mineral	1					
	% MS					
AMOSTRA	MS	MO	PB	EE	FB	ENN
RAÇÃO	86,95	91,59	48,33	7,94	4,92	30,45

MS = Matéria Seca; **MO** = Matéria Orgânica; **PB** = Proteína Bruta; **EE** = Extrato Etéreo; **FB** = Fibra Bruta; **ENN** = Extrativos Não Nitrogenados; **NDT** = Nutrientes Digestíveis Totais (estimado);

TABELA 2- Peso, biomassa e taxa de crescimento de larvas de jundiá submetidas a dietas com diferentes níveis de inclusões de benzoato de estradiol.

Tempo (dias)	Níveis de hormônio (mg/kg ração)				
	0	10	20	40	50
Peso(g)					
20	0,77 ^a ±0,01	0,89 ^a ±0,01	0,79 ^a ±0,03	0,86 ^a ±0,02	0,47 ^b ±0,01
40	1,86±0,09	1,72±0,07	1,91±0,05	1,87±0,09	1,77±0,08
Biomassa (g)					
20	57,06 ^a	66,55 ^a	58,25 ^a	63,15 ^a	31,28 ^b
40	129,51	117,34	134,96	128,99	115,61
Taxa de Crescimento Específico (%/dia)					
40	5,46	4,14	5,62	5,07	6,51

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si por teste de Tukey (P<0,05).

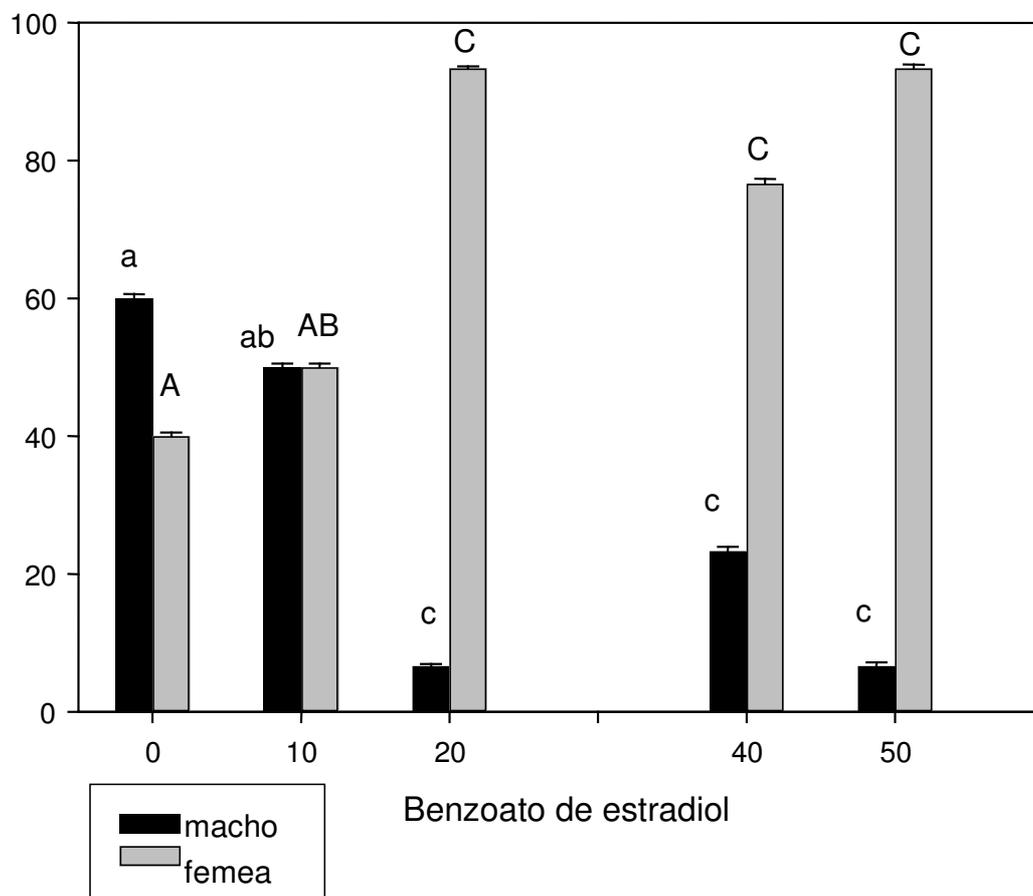


FIGURA 1- Porcentagens de machos e fêmeas obtidos nas larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com diferentes níveis de inclusão na dieta de benzoato de estradiol .

Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na porcentagem de machos entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa na porcentagem de fêmeas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior) pela bolsa de mestrado para T.S. Medeiros e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa produtividade para B. Baldisserotto.

Referências

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. et al. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v.232, p.383-394, 2004.

BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F.; ZANUY, S. et al. Development of Sex control techniques for European sea bass (*diacentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17β - metiltestosterone prior to sex differentiation. **Aquaculture**, v.135, p.329-342, 1995.

COLDEBELLA, I.J.; RADÜNZ NETO, J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Cienc. Rural**, v.32, p.499–503, 2002.

GEORGE, T.; PANDIAN, T.J. Production of ZZ females in the female – heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. **Aquaculture**, v.136, p.81-90, 1995.

GOETZ, F. W.; DONALDSON, E.M.; HUNTER, G.A. et al. Effects of estradiol 17β and 17α methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Aquaculture**, v.17, p.267-278, 1979.

GOETZ, F. W.; DONALDSON, E.M.; HUNTER, G.A. et al. Effects of estradiol 17β and 17α methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus*

kisutch. **Aquaculture**, v.17, p.267-278, 1979.

MÉLARD, C. Production of a high percentage of male offspring with 17 α ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I – Estrogen Sex-reversal and production of F2 pseudofemales. **Aquaculture**, v.130, p.25-34, 1995.

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; Y.A. TABATA E M.G. RIGOLINO. 1995. Análise macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss* esterilizadas ou masculinizadas pela 17- α metiltestosterona. **Boletim do Instituto de Pesca** 22(1):93-102.

PIFRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229- 281, 2001.

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

STRUSSMANN, C.A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, v.139, p.31-45, 1996.

YAMAZAKI, F. Application of hormones in fish celulare.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.) Fish physiology. New York: **Academic Press**, v.3. 1969. p.117-175.

Manuscrito 02

Inversão sexual e crescimento de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*, alimentadas com rações contendo diferentes princípios ativos de estradiol

INVERSÃO SEXUAL E CRESCIMENTO DE LARVAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*,
ALIMENTADAS COM RAÇÕES CONTENDO DIFERENTES PRINCÍPIOS ATIVOS
DE ESTRADIOL

T. S. Medeiros, C. Colpo, D. Grigoletto, D. I. Martins, F. W. Ferreira, K. P. Barreto,
B. Baldisserotto

Resumo

O objetivo deste trabalho é acompanhar a inversão sexual, crescimento e sobrevivência de larvas de jundiá *Rhamdia quelen*, submetidas a diferentes princípios ativos de estradiol (valerato, cipionato e 17 β -estradiol). Para o experimento foram utilizados lotes de larvas (300 larvas/caixa de 30L) alimentadas com ração a partir do momento em que aceitaram alimentação exógena (3 dias pós-eclosão). A dieta foi acrescida pelos princípios ativos de estradiol na dose de 30mg/kg de ração, e o período de tratamento com hormônio durou 20 dias. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata. As larvas receberam alimento em excesso 4 vezes por dia com uma ração baseada em levedura de cana e fígado de frango. No final dos 20 dias foram feitas as contagens, pesagens e medições das larvas, as mesmas foram mantidas separadas nas suas respectivas caixas sob condições normais de cultivo por 40 dias, para os procedimentos de análise histológica, visando à determinação do sexo. O peso médio das larvas da dieta sem hormônio foi maior que os demais tratamentos aos sete dias. Aos 21 dias do experimento somente o tratamento com cipionato de estradiol apresentou peso inferior em relação aos demais tratamentos, os quais não tiveram diferenças entre si. Nos 40 dias do experimento o ganho de peso por ocasião da inclusão de 30mg/kg de cipionato de estradiol foi superior aos demais. Não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos na inversão sexual das larvas.

Palavras-chaves: desenvolvimento, fêmeas, hormônio feminino, peixes

SEX REVERSAL AND GROWTH OF SILVER CATFISH *Rhamdia quelen*, FED DIETS WITH DIFFERENT ACTIVE PRINCIPLES OF ESTRADIOL.

T. S. Medeiros, C. Colpo , D. Grigoletto, D. I. Martins, F. W. Ferreira ,K. P. Barreto, B. Baldisserotto.

Abstract

The purpose of this study was to analyze the sex reversal, growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, larvae submitted to diets with different active principles of estradiol. The diets were added with the active principles in the dosis of 30 mg/kg feed, and the time of feeding with hormones was 20 days. All treatments were made in triplicate. Larvae were fed in excess four times a day with feed based on sugar cane yeast and chicken liver. After 20 days larval biometry was performed, but larvae were maintained in their own boxes under normal conditions of cultivation for additional 40 days, to the histological analysis procedures to sex determination. Larvae fed diet without hormone showed significantly higher weight after seven days. After 21 days larvae fed with estradiol presented lower weight compared to other treatments, but after 40 days this treatment showed higher weight gain. There was no significant differences on sex reversal between all treatments.

Key-words: development, female, female hormone, fish

Introdução

Jundiá é o nome comum dado aos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia* formado por 11 espécies, tendo presentes no Brasil: *Rhamdia foina*, *Rhamdia itascaianus*, *Rhamdia laukidi*, *Rhamdia muelleri*, *Rhamdia poeyi*, *Rhamdia jequitinhonha* e *Rhamdia quelen*, sendo esta última a mais encontrada, desde o sudeste do México até o centro da Argentina (BALDISSEROTTO,2004).

O cultivo de *Rhamdia quelen* está aumentando no sul do Brasil, por apresentar boas características zootécnicas e excelente aceitação no mercado consumidor (GOMES *et al.*, 2000). A inversão sexual permite que o criador consiga ter nos seus tanques exemplares de apenas um sexo, preferencialmente o que apresenta melhor crescimento. Por exemplo, alguns machos de truta arco-íris atingem a maturação sexual já nos primeiros dias de vida, enquanto as fêmeas só alcançarão a maturação em dois anos. Nesta espécie a maturação está associada a uma diminuição do ganho de peso, perda da qualidade da carne e maior incidência de doenças. Portanto o criador tem interesse em ter a maior percentagem de fêmeas por grupo, de modo a obter exemplares de maior tamanho.

Segundo experimentos recentes realizados no laboratório de piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria as fêmeas de jundiá crescem cerca de 30% a mais que os machos, mas até o momento não se sabe se esta diferença é devido a uma maturação mais precoce nos machos ou por menor desempenho zootécnico em termos de crescimento. Devido à importância de realizar novas técnicas de cultivo da espécie faz-se necessário estudo aprofundado sobre princípios hormonais ativos que não interfiram no crescimento dos peixes e tenham respostas satisfatórias na inversão sexual.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a feminilização de jundiás através da administração dos princípios 17 β -estradiol, de valerato de estradiol cipionato de estradiol, adicionados na dose de 30 mg/kg de ração por tratamento e o desempenho produtivo das larvas sobre ação hormonal.

Material e métodos:

As larvas utilizadas no experimento foram obtidas na Piscicultura Bela Vista, através de uma desova induzida com extrato hipofisário de carpa. Os ovos ficaram em incubadoras até a eclosão, e após as larvas foram transportadas para o Laboratório de Endocrinologia Animal da UFSM.

Foram utilizados lotes de larvas (300 larvas/ caixas de 30L) alimentados com ração a partir do momento de aceite da alimentação exógena (2-3 dias pós-eclosão).

Diferentes princípios ativos de estradiol (17 β -estradiol, valerato de estradiol, cipionato de estradiol) na dosagem de 30 mg/kg ração foram acrescentadas em ração basal preparada conforme descrito por Silva *et al* (2005) (Tabela 5).

Os ingredientes foram homogeneizados e os princípios ativos (dissolvido em óleo de canola) foram incluídos nesta mistura úmida. Na seqüência, a ração úmida foi submetida à secagem em estufa de circulação, regulada com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A ração seca foi dividida em granulometrias de 100-200, 200-400 e 400-600 μm , as quais foram administradas na primeira, segunda e terceira semanas experimentais, respectivamente. Todas as frações foram embaladas em sacos plásticos e mantidas em refrigerador até o momento de consumo.

Todos os tratamentos foram feitos em triplicata. As larvas foram distribuídas aleatoriamente nos aquários e alimentadas em excesso quatro vezes por dia, por 20 dias. Os aquários continham circuito aberto da água com renovação constante (vazão de 20mL/min), e a limpeza foi realizada diariamente através de sifonagem. No final dos 20 dias de tratamento hormonal os peixes ainda foram mantidos nas suas respectivas caixas por mais 40 dias, até que pudessem ser utilizadas 20 larvas por caixa para os procedimentos de análise histológica, visando à determinação do sexo. as medidas de peso, comprimento e sobrevivência foram realizadas aos 7, 14, 21 e 40 dias experimentais também se utilizaram 20 larvas por caixa.

Diariamente, pela manhã, foi mensurada a temperatura da água das caixas com termômetro de mercúrio, escala de 1°C e, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) com oxímetro digital e, realizada a sifonagem da água das unidades experimentais, para a retirada das excretas e restos de alimento. Semanalmente, foi verificada a dureza ($\text{mg.L}^{-1}\text{CaC}_2$),

alcalinidade ($\text{mg.L}^{-1}\text{CaC}_2$), pH, amônia e nitrito (mg.L^{-1}) obtidos por métodos de titulação e colorimétrico da água das caixas.

Determinação do sexo

Os peixes foram fixados em formol neutro (5%), para extração das vísceras, as quais passaram por processo de desidratação em álcool etílico 70, 80, 90 e 100% e xilol. Na seqüência, foram incluídas em parafina para o corte, coradas com hematoxilina eosina conforme Mellito de Silveira et al. (1995), a fim de verificar em microscópio o tecido gonadal e o sexo. As análises foram realizadas no Núcleo de Análise de Imagens Biológicas (NAIMB) – Laboratório de Ictiopatologia, do Departamento de Biologia e Química da Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, UNIJUI.

Análise do desenvolvimento

Com a finalidade de avaliar a sobrevivência e o crescimento dos jundiás foram estimados parâmetros como: taxa de sobrevivência (%), peso médio individual e comprimento total médio das larvas /tratamentos, taxa de crescimento específico (G)= $(\text{peso médio inicial} - \text{peso médio final})/\text{tempo em dias} \times 100$, e a biomassa total obtido do peso médio individual \times número de jundiás restantes após final do período avaliado.

Análise estatística

Para a análise dos dados retirados das amostras nos diferentes tratamentos foi aplicado o teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Como as variâncias foram homogêneas, utilizou-se análise de variância de um fator seguida do teste de Tukey. Os cálculos foram efetuados com o programa Statistica 5.1. O nível mínimo de significância foi de 95% ($P < 0,05$).

Resultados

Testando os princípios ativos do estradiol aos sete dias, o peso médio das larvas da dieta sem hormônio foi maior que os demais tratamentos (Tabela 4). Aos 21 dias do experimento somente o tratamento com cipionato de estradiol apresentou peso inferior em

relação aos demais tratamentos, os quais não tiveram diferenças entre si. Nos 40 dias do experimento o ganho de peso por ocasião da inclusão de 30mg/kg de cipionato de estradiol foi superior aos demais (Tabela 5).

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos na inversão sexual das larvas pela inclusão de 30mg/kg de valerato, cipionato, 17 β -estradiol e sem hormônio (Tabela 6).

Qualidade da água

Todos os parâmetros de análise da qualidade da água se mantiveram dentro das faixas ideais para cultivo de jundiás.

Discussão

As evidências da existência de um período de maior sensibilidade aos tratamentos hormonais com estrógenos e andrógenos, têm sido constatadas em diferentes espécies como *Oncorhynchus kisutch* (PIFERRER & DONALDSON, 1989), *Oncorhynchus mykiss* (KRISFALUSI & NAGLER, 2000), *Oryzias latipes* (KOGER et al., 2000) e *Oreochromis niloticus* (APPLE & LEBOUTE, 1995). Essa afirmação pode explicar o insucesso da inversão sexual, observando também outros aspectos que poderiam atuar isolados ou simultaneamente para este fato, como a dosagem e o princípio ativo utilizado.

Ao contrário dos andrógenos, a obtenção do sucesso dos tratamentos com estrógenos parece ser mais difícil de ser alcançado (MCANDREW, 1993), porque os andrógenos são agentes alteradores de sexo mais potentes que os estrógenos, fato que leva à necessidade da utilização de maiores dosagens hormonais para feminilizar efetivamente os peixes (HENDRY et al., 2003). Contudo, mesmo utilizando altas dosagens, em algumas espécies como as carpas, o emprego de 17 β -estradiol foi completamente ineficiente (KOMEN & RICHTER, 1993).

Os resultados de 63,33%, 66,66% e 50% nos tratamentos de cipionato de estradiol, valerato de estradiol e 17 β -estradiol consecutivamente para feminilização, obtidas neste experimento, confirmaram as afirmações referentes à ineficiência dos tratamentos com níveis pequenos de hormônio na ração, principalmente quando são comparados com resultados de outros autores. Mélard (1995), obteve 100 % de feminilização utilizando

suplementação dietética de 200 mg de $17\ \alpha$ -etinilestradiol.kg⁻¹ na dieta, em *O. aureus*. Scott et al. (1989) obtiveram bons resultados de feminilização em proles de *O. niloticus*, geneticamente monossexuais masculinas. Estes autores alcançaram resultados de 51,6 e 83,9% em fêmeas, em dois ensaios, respectivamente, utilizando 100 mg de dietilstilbestrol.kg⁻¹ de dieta.

Resultados de comprimento total superiores aos do presente trabalho foram verificados por Lazzari et al. (2004), testando diferentes frequências de alimentação para larvas de jundiá, em que o CT aos 21 dias variou de 14,18 até 15,53 mm. Utilizando 1,5% de pré-misturas vitamínicas para aves de postura, com ração à base de fígado bovino e levedura de cana, Piaia & Radünz Neto (1997) obtiveram comprimento total aos 21 dias para larvas de jundiá de 28,83mm, resultado este também superior aos encontrados neste trabalho.

Koger et al. (2000), ao estudarem o estágio de maior sensibilidade em *Oryzias latipes*, à testosterona e $17\ \beta$ -estradiol, não verificaram diferenças significativas quanto à mortalidade e peso corporal. Mélard (1995) também verificou altas taxas de sobrevivência (97%) de larvas de *Oreochromis aureus*, submetidas a tratamentos com estrógeno a partir de suplementação dietética. Apesar desses resultados e do presente experimento não indicarem a existência de toxicidade dos tratamentos, evidenciada por Phelps & Popma (2000), este efeito pode não ter sido verificado, em decorrência das reduzidas dosagens hormonais.

A partir dos resultados observados neste estudo, ajustes de parâmetros como dose, duração dos tratamentos, densidade e manejo, deverão ser executados a fim de melhorar a eficiência e viabilidade da inclusão de diferentes princípios ativos do estradiol.

Conclusão

Nos 40 dias do experimento o ganho de peso por ocasião da inclusão de 30mg/kg de cipionato de estradiol foi superior aos demais. Não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos na inversão sexual das larvas.

Tabelas

TABELA 3- Peso médio e crescimento total de larvas de jundiá, submetidos a dietas com diferentes princípios ativos do estradiol

Tempo (dias)	Princípio Hormonal (30mg/kg ração)			
	Sem Hormônio	Cipionato de estradiol	Valerato de estradiol	17β-estradiol
Peso(g)				
7	0,076 ^b ±0,001	0,050 ^a ±0,002	0,052 ^a ±0,001	0,048 ^a ±0,003
14	0,086±0,005	0,080±0,003	0,084±0,008	0,086±0,007
21	0,19 ^a ±0,08	0,16 ^b ±0,09	0,18 ^a ±0,10	0,19 ^a ±0,07
40	1,19 ^b ±0,14	1,24 ^a ±0,19	1,18 ^b ±0,18	1,20 ^b ±0,09
Crescimento Total (cm)				
7	0,49±0,01	0,48±0,008	0,52±0,008	0,5±0,007
14	0,53±0,07	0,53±0,08	0,57±0,03	0,56±0,04
21	0,8±0,09	0,69±0,09	0,73±0,07	0,7±0,05
40	1,76 ^b ±0,12	1,78 ^b ±0,19	1,80 ^b ±0,25	1,88 ^a ±0,18

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05) por teste de Tukey.

TABELA 4- Machos e fêmeas da amostra retirada aos 40 dias experimentais nos diferentes princípios ativos de estradiol.

	Princípio Hormonal (30mg/kg ração)			
	Sem hormônio	Ciprionato de Estradiol	Valerato de Estradiol	17 β -estradiol
	%			
MACHOS	40	36,66	33,33	50
FÊMEAS	60	63,33	66,66	50

TABELA 5- Ração base utilizada para as inclusões de benzoato de estradiol e análise laboratorial realizada no Departamento de Zootecnia, UFSM, Laboratório de Nutrição Animal (LNA)

INGREDIENTES	% MS					
Fígado de aves (in natura)	33					
Levedura de cana	57					
Farelo de arroz desengordurado	6					
Lecitina de soja	2					
Premix Vitamínico	1					
Premix mineral	1					
	% MS					
AMOSTRA	MS	MO	PB	EE	FB	ENN
RAÇÃO	86,95	91,59	48,33	7.94	4.92	30.45

MS = Matéria Seca; **MO** = Matéria Orgânica; **PB** = Proteína Bruta; **EE** = Extrato Etéreo; **FB** = Fibra Bruta; **ENN** = Extrativos Não Nitrogenados; **NDT** = Nutrientes Digestíveis Totais (estimado);

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior) pela bolsa de mestrado para T.S. Medeiros e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa produtividade para B. Baldisserotto.

Referências

APPLE, H.B.; LEBOUTE, E.M. Masculinização de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando andrógenos através de tratamentos de imersão. In: ENCONTRO SUL BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., 1995, Ibirubá. **Anais...** Ibirubá: COTRIBÁ e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p.113-119.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.

KOGER, C.S.; TEH, S.J.; HINTON, D.E. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 beta-estradiol or testosterone. **Marine Environmental Research**, v.50, n.1-5, p.201- 206, 2000.

KOMEN, J.; RICHTER, C.J. Sex control in carp In: MUIR, J.F.; ROBERTS, R.J. (Eds.) **Recent advances in aquaculture IV**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.78-86.

KRISFALUSI, M.; NAGLER, J.J. Induction of gonadal intersex in genotypic male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos following immersion in estradiol – 17beta. **Molecular Reproduction and Development**, v.56, n.4, p.495-501, 2000.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; LIMA, R. L.; PEDRON, F. A.; LOSEKANN, M. Efeito da frequência de arraçamento e da troca do tamanho de partícula alimentar no

desenvolvimento de pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 231–234, 2004.

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

MÉLARD, C. Production of a high percentage of male offspring with 17 α ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I – Estrogen Sex-reversal and production of F2 pseudofemales. **Aquaculture**, v.130, p.25-34, 1995.

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; Y.A. TABATA E M.G. RIGOLINO. 1995. Análise macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss* esterilizadas ou masculinizadas pela 17- α metiltestosterona. **Boletim do Instituto de Pesca** 22(1):93-102.

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

PIFRER, F.; DONALDSON, E.M. Dosage dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.9, n.2, p.145-150, 1991.

SCOTT, A.G.; PENMAN, D.J.; BEARDMORE, J.A. et al. The 'YY' supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. **Aquaculture**, v.78, p. 237-251, 1989.

CONCLUSÕES

Níveis hormonais de benzoato de estradiol na dieta das larvas de jundiá na faixa de 20 a 50mg/kg por 20 dias a partir do momento da primeira alimentação apresentam inversão satisfatória para fêmeas .

Os demais princípios ativos do estradiol não demonstraram inversão feminina satisfatória com a inclusão de 30mg/kg na dieta das larvas de jundiá.

Os princípios ativos testados no segundo experimento diminuíram o peso das larvas no início do período experimental, mas no término dos 40 dias obteve-se melhor ganho de peso com o cipionato de estradiol em relação aos demais que também não tiveram diferenças entre si.

BIBLIOGRÁFICA GERAL

AFONSO LOB, IWAMA GK, SMITH J, DONALDSON EM. Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on reproductive steroids and spermiation in male coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during sexual maturation. **Aquaculture**, 2000;188:175-187.

AFONSO LOB, WASSERMANN GJ, OLIVEIRA RT. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. **J Exp Zool**, 2001; 290:177-181.

AHAMMAD MM, BHATTACHARYYA D, JANA BB Indian major carp embryos. Effect of different concentrations and extenders on the hatching of (*Labeo rohita*, *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, 1998; 37:318-324.

APPLE, H.B.; LEBOUTE, E.M. Masculinização de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando andrógenos através de tratamentos de imersão. In: ENCONTRO SUL BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., 1995, Ibirubá. **Anais...** Ibirubá: COTRIBÁ e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p.113-119.

ARSLAN T, PHELPS RP. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion. **Aquaculture**, 2004; 234:561-573.

BALDISSEROTTO B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria, Editora da UFSM; 2002. 212p.

BALDISSEROTTO B. & RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiás**. Santa Maria: Ed. UFSM. p. 95-106.

BEARDMORE, J.A.; G.C.MAIR.; AND R.I. LEWIS. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, 2001, 197;

283-301.

BENADUCE, APS; RODRIGUES, LAD; MISTRO, DC; BALDISSEROTTO, B. A mathematic model for growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae, Siluriformes, Teleostei). **Ciência Rural**, 2006, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. prelo.

BLAXTER, JHS. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, 1953; 172:1189-1190.

BYE, V.J. AND R.F. LINCON.. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) **Aquaculture**, 1986, **57:299-309**.

CAROLSFELD J, HARVEY B, GODINHO HP, ZANIBONI FILHO E. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, 2003; 63(2):472-481.

CERQUEIRA VR, MIOSO R, MACCHIAVELLO JAG, BRÜGGER AM. Ensaio de indução de desova do Linguado (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). **Bol Inst Pesca**, 1997; 24: (especial)247-254.

COLDEBELLA, I.J.; RADÜNZ NETO, J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Cienc. Rural**, v.32, p.499–503, 2002.

CYR DG, EALES JG. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. **Rev Fish Biol Fish**, 1996; 6:165-200.

DAVIS KB, LUDWIG GM. Hormonal effects on sex differentiation and growth in sunshine bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. **Aquaculture** 2004;231:587-596.

DEVLIN RH, NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, 2002;

208:191-364.

DONALDSON EM, HUNTER GA. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, editores; Fish physiology. v. IX - Reproduction. part B: behavior and fertility control; 1983. p.351-403 [**Capítulo 7**].

FERRAZ E M, CERQUEIRA VR, ALVAREZ-LAJONCHÈRE L, CANDIDO S. Indução da desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. **Bol Inst Pesca**, 2002; 28(2):125-133.

FAO. **State of world aquaculture** 2006. Roma, 2006. (FAO Fisheries Technical paper, 500)

FLACH, A., GREGEL, B., SIMIONATTO, E., DA SILVA, U. F., ZANATTA, N., GLASSER F, MIKOLAJCZYK T, JALABERT B, BAROILLER JF, BRETON B. Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Gen Comp Endocrinol**, 2004; 136:171-179.

GEORGE, T.; PANDIAN, T.J. Production of ZZ females in the female – heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. **Aquaculture**, v.136, p.81-90, 1995.

GOETZ, F. W.; DONALDSON, E.M.; HUNTER, G.A. et al. Effects of estradiol 17 β and 17 α methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Aquaculture**, v.17, p.267-278, 1979.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.

HAGEDORN M, KLEINHANS EW, WILDT DE, RALL, WE. Chilling sensitivity and

cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos *Brachydanio rerio*). **Cryobiology**, 1997; 34:251-263.

HARVEY B, Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish, *Brachydanio rerio* to -196 degrees C. **Cryobiology**, 1983; 20(4): 440-447.

Harvey B, Carolsfeld J. Induced breeding in tropical fish culture. IDRC, Ottawa. 1993. 144p.

HORTON HF, OTT AG. Criopreservation of fish spermatozoa and ova. **J Fisher Res Board of Canada**, 1976; 33: 995-1000.

JOBLING M. Environmental biology of fishes. **London, Chapman & Hall**; 1995, 455p.

KOGER, C.S.; TEH, S.J.; HINTON, D.E. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 beta-estradiol or testosterone. **Marine Environmental Research**, v.50, n.1-5, p.201- 206, 2000.

KOMEN, J.; RICHTER, C.J. Sex control in carp In: MUIR, J.F.; ROBERTS, R.J. (Eds.) **Recent advances in aquaculture IV**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.78-86.

KRISFALUSI, M.; NAGLER, J.J. Induction of gonadal intersex in genotypic male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos following immersion in estradiol – 17beta. **Molecular Reproduction and Development**, v.56, n.4, p.495-501, 2000.

LAHNSTEINER F, URBANYI, B, HORVATH A, WEISMANN T. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. **Aquaculture**, 2001; 195: 331-352.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; LIMA, R. L.; PEDRON, F. A.; LOSEKANN, M. Efeito da frequência de arraçamento e da troca do tamanho de partícula alimentar no desenvolvimento de pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista Brasileira de**

Agrociência, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 231–234, 2004.

LEGENDRE M, LINHART R, BILLARD R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resources** 1996; 9(Hors série):59-80.

LETHIMONIER C, MADIGOU T, MUÑOZ-CUETO JA, LAREYRE JJ, KAH O. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleosts fish. **Gen Comp Endocrinol** 2004; 135:1-16.

LIMA CM, GOULDING M. Os frutos do tambaqui. **Tefé, Sociedade Civil Mamirauá**; 1998. 186p.

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

MÉLARD, C. Production of a high percentage of male offspring with 17 α ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I – Estrogen Sex-reversal and production of F2 pseudofemales. **Aquaculture**, v.130, p.25-34, 1995.

MELLITO DA SILVEIRA, M.P: Y.A. TABATA E M.G. RIGOLINO. 1995. Análise macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss* esterilizadas ou masculinizadas pela 17- α metiltestosterona. **Boletim do Instituto de Pesca** 22(1):93-102.

PIAIA, R. et al. Alimentação de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* com dietas artificiais. **Revista Ciência e Natura**, v. 19 p. 119-131, 1997

PIFFER, F. and E.M. DONALDSON. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, 1988, 77:251-63.

PIFFER, F.. Endocrine sex control strategies for feminilization of teleost fish. **Aquaculture**, 2001, 197:229-281.

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

POPMA, T. J. LOUSHIN, L. **Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia**, International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Auburn, Alabam, Research and Development. Series n. 41,23p, 1996.

SALHI,M et al. Growth feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing dts protein and energy levels. **Aquaculture**, v.231, p. 435-444, 2004

SCOTT, A.G.; PENMAN, D.J.; BEARDMORE, J.A. et al. The 'YY' supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. **Aquaculture**, v.78, p. 237-251, 1989.

SILVA, L.V.F. Incubação e larvicultura de júndia. In. BALDISSEROTTO, B. e RADÜNZ NETO, J. **Criação de Júndia**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. pág. 95 a 106.

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

STRUSSMANN, C.A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, v.139, p.31-45, 1996.

ZALL, D. M., FISHER, M. D.; GARNER, Q. M. Photometric determination of chlorides in

water. **Analytical Chemistry**, 1956, v. 28, p. 1665-1678.

YAMAZAKI, F. Application of hormones in fish celulare.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.) Fish physiology. New York: **Academic Press**, v.3. 1969. p.117-175.