

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Óleo de soja como diluente e veículo da 17 $\alpha$ -metiltestosterona na  
dieta para masculinização da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em  
sistemas de bioflocos e de água clara**

Franklin Fernando Batista da Costa

Belo Horizonte  
2022

**Franklin Fernando Batista da Costa**

**Óleo de soja como diluente e veículo da 17 $\alpha$ -metiltestosterona na dieta para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no processo de masculinização em sistemas de água clara e bioflocos**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal/Aquacultura

Prof. Orientador: Edgar de Alencar Teixeira

Prof. Co-orientador: Eduardo Maldonado Turra

Belo Horizonte  
2022

C837o Costa, Franklin Fernando Batista da, 1986-  
Óleo de soja como diluente e veículo da 17 $\beta$ -metiltestosterona na dieta para masculinização da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistemas de bioflocos e de água clara / Franklin Fernando Batista da Costa. – 2022.  
61 f.: il.

Orientador: Edgar de Alencar Teixeira  
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor.  
Bibliografia: f. 42 a 50

1. Tilápia – Peixe - Teses - 2. Peixe – Alimentação e rações - Teses - 3. Nutrição animal – Teses - I. Teixeira, Edgar de Alencar - II. Universidade Federal de Minas Gerais – III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG  
TELEFONE (31)-3409-2173

[www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao](http://www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao)  
E-mail [cpzootec@vet.ufmg.br](mailto:cpzootec@vet.ufmg.br)

## ATA DE DEFESA DE TESE DO ALUNO FRANKLIN FERNANDO BATISTA DA COSTA

Às 14:00 horas do dia 11 de abril de 2022, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo colegiado no dia 17/03/2022, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada: Óleo de soja como diluente e veículo da 17 $\alpha$ -metiltestosterona na dieta para masculinização da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistemas de bioflocos e de água clara, como requisito final para a obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia, área de concentração Produção Animal - Aquacultura**

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Edgar de Alencar Teixeira, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovado	Reprovado
Prof./Dr. Thiago Bernardes Fernandes Jorge	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof./Dr. Marcos Antônio da Silva	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof./Dr. Marcelo Rezende Luz	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a) /Dr.(a) Érika Ramos de Alvarenga	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof./Dr. Edgar de Alencar Teixeira	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o candidato foi considerado:

Aprovado

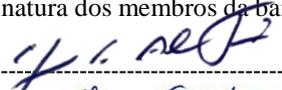
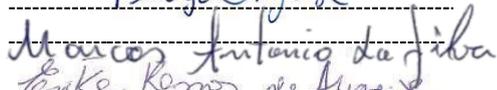
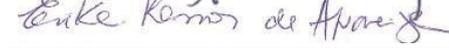
Reprovado

Para concluir o Doutorado, o candidato deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

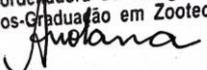
O resultado final, foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 11 de abril de 2022.

Assinatura dos membros da banca:

  
-----  
Thiago B.F. Jorge  
  
-----  
Marcos Antonio da Silva  
  
-----

  
-----

Prof.ª Ângela Maria Quintão Lana  
Coordenadora do Colegiado de  
Pos-Graduação em Zootecnia  


**DEDICATÓRIA** à minha família

## Agradecimentos

Agradeço:

A Deus, por tudo;

À Lívia, aos meus pais, Francisco e Neusa, meus irmãos, a toda a família e amigos pelo apoio e incentivo antes, durante e ao final do curso de doutorado;

À Universidade Federal de Minas Gerais, à Escola de Veterinária e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia por me proporcionar uma formação de qualidade;

À CAPES pela bolsa de doutorado, à FAPEMIG e ao CNPQ pelo financiamento e apoio ao projeto;

Aos professores Edgar de Alencar Teixeira e Eduardo Maldonado Turra pela orientação e coorientação durante o curso;

À Doutora Érika Ramos de Alvarenga pelo suporte técnico fundamental em todas as etapas do projeto, do planejamento à conclusão, bem como pela contribuição para a minha formação acadêmica;

Aos professores do Programa de Zootecnia e a todos os professores da Escola de Veterinária pela transferência de conhecimento;

A todos os servidores e funcionários dos diferentes setores da Escola por contribuírem para que as atividades de ensino e pesquisa sejam realizadas;

Aos colegas, pós graduandos e alunos de Iniciação Científica, por toda a ajuda na elaboração, execução e conclusão deste projeto. E ainda pelos bons momentos de descontração;

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Thiago Bernardes Fernandes Jorge, Dr. Marcos Antônio da Silva, Prof. Marcelo Rezende Luz e Dr<sup>a</sup> Érika Ramos de Alvarenga pelo aceite para participarem da minha defesa de tese e pelas valorosas contribuições para o presente trabalho.

## RESUMO

A tilapicultura vem se consolidando como um dos principais seguimentos da aquicultura mundial. Em grande parte, isso se deve ao desenvolvimento e aplicação de tecnologias como as que possibilitaram a produção de lotes masculinizados de tilápias por meio do uso do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT). Embora eficaz, a técnica tem um custo importante na larvicultura de tilápias, representado principalmente pelo uso do álcool etílico como diluente e veículo para o hormônio na ração. Diante disso, tivemos como principal objetivo testar a hipótese de que o uso do óleo de soja como diluente e veículo para a MT na ração ofertada para tilápias do Nilo é eficaz no processo de masculinização. Para tanto, seis mil larvas de tilápias do Nilo foram distribuídas em 20 unidades experimentais, para compor quatro tratamentos, os quais foram caracterizados da seguinte forma: uso de 2% de óleo de soja por kg de ração para a dispersão da MT na ração em sistema de água clara (*HO/CW*); uso de 2% de óleo de soja por kg de ração para a dispersão da MT na ração em sistema de bioflocos (*HO/BFT*); uso de álcool para dispersar a MT na ração mais a adição posterior de 2% de óleo na ração em sistema de bioflocos (*HA+O/BFT*) e uso do álcool para dispersar a MT na ração em sistema de bioflocos (*HA/BFT*). A taxa de masculinização foi avaliada em dois períodos de oferta do hormônio, durante 21 e 28 dias. Além da masculinização, qualidade de água, desempenho zootécnico, sobrevivência e composição corporal foram avaliados durante e ao final do experimento. Os resultados de masculinização do período de 28 dias foram de 100% para os tratamentos *HO/CW*, *HO/BFT*, *HA/BFT* e de 94% para o tratamento *HA+O/BFT*. Para o período de 21 dias os resultados foram 89,44; 86,74; 80,94 e 93,60% para os tratamentos *HO/CW*, *HO/BFT*, *HA+O/BFT*, *HA/BFT*, respectivamente. Os indicadores de qualidade de água, em geral, ficaram dentro da faixa recomendada para a espécie. Os resultados de desempenho, sobrevivência e composição corporal não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos. Ao final do ensaio foi possível concluir que o óleo de soja é eficaz como veículo para a distribuição do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona pela ração, proporcionando resultados satisfatórios com relação a taxa de masculinização. Adicionalmente, constatou-se que o período de 28 dias de aplicação da MT resulta em maior quantidade de peixes masculinizados em comparação a 21 dias. Destacamos que é a primeira vez que esta comparação é feita em sistema de bioflocos.

**Palavras-chave:** controle sexual, metiltestosterona, peixe, tilapicultura

## **ABSTRACT**

Tilapiculture has been consolidating itself as one of the main segments of world aquaculture. In large part, this is due to the development and application of technologies such as those that made it possible to produce masculine batches of tilapia through the use of the hormone 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT). Although effective, the technique has an important cost in tilapia larviculture, represented mainly by the use of ethyl alcohol as a diluent and vehicle for the hormone in the feed. Therefore, our main objective was to test the hypothesis that the use of soybean oil as a diluent and vehicle for TM in the ration offered to Nile tilapia is effective in the masculinization process. For that, six thousand Nile tilapia larvae were distributed in 20 experimental units, to compose four treatments, which were characterized as follows: use of 2% soybean oil per kg of ration for the dispersion of MT in the ration in clear water system (HO/CW); use of 2% soybean oil per kg of feed for the dispersion of MT in the feed in a biofloc system (HO/BFT); use of alcohol to disperse MT in the feed plus the subsequent addition of 2% oil in the feed in a biofloc system (HA+O/BFT) and use of alcohol to disperse MT in the feed in a biofloc system (HA/BFT) . The masculinization rate was evaluated in two periods of hormone supply, during 21 and 28 days. In addition to masculinization, water quality, zootechnical performance, survival and body composition were evaluated during and at the end of the experiment. The masculinization results for the 28-day period were 100% for the HO/CW, HO/BFT, HA/BFT treatments and 94% for the HA+O/BFT treatment. For the period of 21 days the results were 89.44; 86.74; 80.94 and 93.60% for treatments HO/CW, HO/BFT, HA+O/BFT, HA/BFT, respectively. The water quality indicators, in general, were within the recommended range for the species. The results of performance, survival and body composition showed no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the different treatments. At the end of the trial, it was possible to conclude that soybean oil is effective as a vehicle for the distribution of the hormone 17 $\alpha$ -methyltestosterone in the diet, providing satisfactory results in relation to the masculinization rate. Additionally, it was found that the period of 28 days of TM application results in a greater amount of male fish compared to 21 days. We emphasize that this is the first time that this comparison has been made in a biofloc system.

**Keywords:** sexual control, methyltestosterone, fish, tilapia

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. RESUMO ESQUEMÁTICO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... 27
- FIGURA 2. MASCULINIZAÇÃO DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM HORMÔNIO MASCULINIZANTE 17A-METILTESTOSTERONA VIA DIETA DURANTE 21 E 28 DIAS.....54

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. VARIÁVEIS DE QUALIDADE DA ÁGUA NOS SISTEMAS DE BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA DURANTE A APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE MANEJO PARA MASCULINIZAÇÃO DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO EM DIFERENTES PERÍODOS DE AVALIAÇÃO. ....47
- TABELA 2. VARIÁVEIS DE QUALIDADE DA ÁGUA NOS SISTEMAS DE BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA DURANTE A APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE MANEJO PARA MASCULINIZAÇÃO DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO E O PERÍODO DE AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ATÉ A FASE DE JUVENIS.....48
- TABELA 3. SOBREVIVÊNCIA (FS), DENSIDADE DE ESTOCAGEM (SD), PESO FINAL (FW), COMPRIMENTO E GANHO DE PESO FINAL (FWG) APÓS APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE MANEJO PARA A MASCULINIZAÇÃO DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO E O PERÍODO DE AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ATÉ A FASE DE JUVENIS.....49
- TABELA 4. COMPOSIÇÃO CORPORAL DE LARVAS E JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO APÓS APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE MANEJO PARA MASCULINIZAÇÃO EM DIFERENTES PERÍODOS DE AVALIAÇÃO.. .....50
- TABELA 5. PROPORÇÃO DE TILÁPIAS DO NILO MASCULINIZADAS APÓS APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE MANEJO PARA MASCULINIZAÇÃO DURANTE 21 E 28 DIAS. 51
- TABELA 6. RESULTADOS DE MASCULINIZAÇÃO DE LARVAS DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM HORMÔNIO MASCULINIZANTE 17A-METILTESTOSTERONA VIA DIETA. ....57

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1.	A tilápia do Nilo e sua larvicultura.....	11
2.2.	Utilização de lotes monossexos machos na tilapicultura.....	12
2.3.	Masculinização por hibridização interespécies.....	12
2.4.	Masculinização por indução térmica.....	13
2.5.	Masculinização induzida por hormônios.....	14
2.6.	Óleo de soja na aquicultura.....	15
2.7.	Bioflocos.....	16
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
4.	ARTIGO.....	27
4.1.	Introdução.....	29
4.2.	Material e Métodos.....	31
4.2.1.	Local e delineamento experimental.....	31
4.2.2.	Indicadores de qualidade de água.....	34
4.2.3.	Análise de masculinização.....	35
4.2.4.	Análise de desempenho e sobrevivência.....	35
4.2.5.	Análise de composição corporal.....	36
4.2.6.	Análise estatística.....	36
4.3.	Resultados e discussão.....	36
4.4.	Agradecimentos.....	42
4.5.	Referências.....	43

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial chegará a 9,7 bilhões de pessoas em 2050 (FAO, 2018), com aumento da demanda por fontes alternativas de alimento, especialmente proteicas, e a aquicultura poderá assumir um papel importante no atendimento a essa questão iminente. As principais espécies de peixes produzidas pela aquicultura mundial são de cultivos em água doce e seu montante gira em torno de 47,1 milhões de toneladas. Dentre as espécies de água doce mais cultivadas no mundo encontra-se a tilápia, cuja produção no ano de 2016 foi de 4,2 milhões de toneladas, ocupando a segunda posição entre os peixes mais produzidos (FAO, 2018).

As tilápias são conhecidas por sua elevada rusticidade e capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. Esses peixes apresentam tolerância a baixa concentração de oxigênio dissolvido, ampla faixa de temperatura e salinidade, além de concentrações relativamente altas de compostos nitrogenados. Seu rápido crescimento e características atrativas de sua carne como, ausência de espinhas intramusculares e sabor agradável, ajudaram a impulsionar o mercado desse peixe no Brasil e no mundo. No entanto, embora as tilapiculturas nacional e mundial estejam em franca expansão, os custos de produção ainda permanecem elevados, com impacto nos diferentes setores da cadeia produtiva da tilápia, incluindo a larvicultura.

Como as tilápias são peixes que apresentam precocidade sexual e elevada prolificidade, sua larvicultura é uma das etapas da cadeia produtiva que mais requerem atenção. Para evitar que os peixes se reproduzam durante a fase de recria e engorda, a maior parte das pisciculturas trabalham com lotes monossexo machos, uma vez que estes apresentam melhor desempenho zootécnico do que as fêmeas (El-Sayed, 2006; Baroiller e D'Cotta, 2018). O método mais empregado atualmente para a produção de lotes machos é a masculinização de larvas recém eclodidas pela alimentação com dieta enriquecida com o hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT), distribuído após sua diluição em álcool etílico, o qual representa um custo importante na larvicultura de tilápias, além de risco à saúde dos trabalhadores responsáveis por esse manejo. É possível que esse manejo seja otimizado a partir da substituição do álcool como diluente e veículo da MT, sendo o óleo de soja um potencial candidato para substituí-lo.

O óleo de soja já é muito empregado na aquicultura, inclusive como diluente e veículo para substâncias que se deseja administrar aos peixes por meio da alimentação, como medicamentos e probióticos (Nakandakare, 2013). Logo, é possível que o óleo de soja também seja eficiente para diluir e veicular a MT pela dieta no processo de masculinização de tilápias, porém essa hipótese não foi confirmada cientificamente, embora alguns autores indiquem a possibilidade dessa aplicação (Popma e Green, 1990; Galvez, 1995; Phelps e Popma, 2000).

O manejo de masculinização com MT geralmente ocorre em sistema de tanques escavados. Essa prática pode representar riscos ambientais relacionados aos metabólitos da metiltestosterona, liberados na água pela excreção dos peixes e sobras de ração (Fitzpatrick, 2000; Contreras-Sánchez et al., 2001; Baroiller e D'Cotta, 2018). Além disso, o sistema mencionado faz uso de grandes volumes de água. Uma das alternativas para mitigação dos impactos ambientais provocados pela aquicultura tem sido proposta a partir do uso do sistema de bioflocos.

O referido sistema, também conhecido pela sigla BFT (biofloc technology) é baseado na reciclagem de nutrientes oriundos das excretas dos peixes e de sobras de alimento. Os nutrientes produzidos sustentam comunidades de bactérias e algas, as quais metabolizam compostos nitrogenados potencialmente tóxicos para os peixes e contribuem, desta forma, para uma menor necessidade de troca de água do sistema (Avnimelech, 2009; Crab et al., 2012). Além disso, os micros e macroorganismos que se desenvolvem no BFT são uma fonte adicional para a alimentação das tilápias na larvicultura (Avnimelech, 2009; Crab et al., 2012).

Considerando a importância econômica da tilápia na aquicultura e a necessidade de se otimizar os processos na sua cadeia produtiva observa-se que sua larvicultura apresenta pontos críticos que devem ser sanados. Diante disso, o presente estudo buscou avaliar a masculinização de larvas de tilápias do Nilo alimentadas com dieta enriquecida com MT utilizando óleo de soja como diluente e veículo do hormônio, comparado ao álcool, por um período de 21 e 28 dias, em sistemas de BFT e água clara.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A tilápia do Nilo e sua larvicultura

Pertencentes à família Cichlidae (Perciformes), as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) são peixes de água doce oriundos da África, que foram introduzidos em muitas regiões tropicais, subtropicais e temperadas ao longo da segunda metade do século 20 (Pillay, 1990), visando seu cultivo comercial. Sua larvicultura, assim como da maioria dos peixes, é uma das fases mais delicadas e importantes na cadeia produtiva, pois está relacionada à oferta contínua para as etapas seguintes (Andrade e Yasui, 2003).

Embora a tilápia do Nilo seja conhecida por sua elevada prolificidade, e não apresentar canibalismo como as espécies carnívoras, sua larvicultura também exige muita atenção, pois é fundamental que haja regularidade na produção de larvas, que estas tenham potencial genético que favoreça a velocidade do crescimento, além da necessidade de indivíduos saudáveis e com tamanho padronizado.

Após a fecundação, a tilápia nilótica incuba os ovos na boca até a eclosão das larvas e absorção do saco vitelino, período que pode durar de 7 a 8 dias, dependendo da temperatura (El-Sayed, 2006). As estratégias utilizadas na maioria das larviculturas são baseadas na coleta de “nuvens” de larvas nos sistemas de reprodução, assim que termina a incubação ou coleta de ovos na boca das fêmeas (Kubitza, 2011), os quais são transferidos para sistemas de incubação artificial.

A larvicultura da tilápia do Nilo tem sido objeto de muitas pesquisas, que tem por objetivo otimizar a produção de larvas. São exemplos os estudos relacionados à nutrição (Deng *et al.*, 2022; Shourbela *et al.*, 2021), manejo alimentar (Alves *et al.*, 2020), qualidade de água (Alvarenga *et al.*, 2018; Ekasari *et al.*, 2019) e melhoramento genético (Turra *et al.*, 2016, Alvarenga *et al.*, 2020). Dentre os avanços que foram logrados após anos de estudos, pode-se citar aqueles alcançados na produção de lotes machos, em detrimento aos lotes mistos com machos e fêmeas (El-Sayed, 2006; Baroiller e D'Cotta, 2018).

## 2.2. Utilização de lotes monossexos machos na tilapicultura

Paradoxalmente, as características positivas da tilápia para produção podem se transformar em problemas graves nos cultivos comerciais. Com cerca de 20 a 30 gramas, as tilápias já são capazes de se reproduzir, e embora sua fecundidade seja baixa, isso é compensado pela característica de desova assíncrona e alta sobrevivência de sua prole, o que pode culminar no superpovoamento dos tanques em pouco tempo (Guerrero, 1975). A elevação inesperada do número de indivíduos desencadeia a competição entre os peixes por espaço, alimento e oxigênio disponível, além de aumento na produção de compostos nitrogenados tóxicos (Shelton *et al.*, 1981; Popma e Green, 1990). Outro aspecto importante é o fato de que as tilápias fêmeas possuem crescimento significativamente inferior ao dos machos (Tachibana *et al.*, 2004), devido a mobilização de energia para o desenvolvimento gonadal e reprodução, além de não se alimentar no período de incubação oral dos ovos e das larvas (Gale *et al.*, 1999; Beardmore *et al.*, 2001). Essas peculiaridades das tilápias fêmeas impedem a formação de um lote padronizado e uniforme, resultando em menor valor comercial (Cnaani e Levavi-Sivan, 2009; Turra *et al.*, 2010).

Para tentar solucionar essas questões, grande parte das pisciculturas no Brasil e no mundo começaram a produzir populações monossexo macho por meio de seleção de machos e fêmeas submetidas a exame macroscópico da papila urogenital, uma vez que a espécie possui dimorfismo sexual. A técnica é baseada na identificação a olho nu da papila urogenital e, ao se determinar o sexo da tilápia, descarta-se se for fêmea. No entanto, esta técnica não é totalmente eficaz, uma vez que pode haver erros quanto a identificação do sexo pela papila, além de promover estresse dos animais (Popma e Lovshin, 1996; Beardmore *et al.*, 2001) e o descarte de grande quantidade de peixes. Diante das desvantagens desta técnica, ela caiu em desuso nos cultivos comerciais de tilápia (Desprez *et al.*, 2003), à medida que métodos mais eficientes surgiram.

## 2.3. Masculinização por hibridização interespecies

A técnica de hibridização de tilápias, iniciada nos anos 60, foi uma esperança para a produção de lotes 100% machos. Contudo, apesar do sucesso da hibridização para diferentes propósitos, como para produzir linhagens de tilápias resistentes ao frio (Hulata *et al.*, 1993), não se obteve êxito na aplicação da técnica para lotes masculinizados. Várias pesquisas buscaram sucesso a partir de diversos cruzamentos, mas a variação nas

proporções de machos a partir dessa técnica é muito ampla (Beardmore, 2001; Hulata, 2001), o que inviabiliza sua aplicação em cultivos comerciais de grande escala. O insucesso da produção de lotes 100% machos por meio da hibridização pode estar atrelado a uma combinação de fatores: dificuldade de manutenção de estoques de reprodutores puros desta espécie; possível existência de genes autossômicos epistáticos envolvidos na determinação sexual (Mair *et al.*, 1991) e a influência de fatores ambientais (Herbst, 2002).

#### **2.4. Masculinização por indução térmica**

Posteriormente, buscando mais eficiência na produção de machos, pesquisadores descobriram que altas temperaturas poderiam induzir a masculinização de *Oreochromis* spp, anulando a determinação genética do sexo fenotípico, desde que o tratamento fosse iniciado a partir da abertura da janela temporal de sensibilidade das gônadas (Baroiller *et al.*, 1995a, 1995b). A partir de então diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de identificar a faixa de temperatura que fosse capaz de induzir a maior proporção de indivíduos ao sexo fenotípico masculino.

No entanto, logo foi constatado que a temperatura capaz de induzir a masculinização fenotípica estava em torno de 37°C (Baroiller *et al.*, 1996) e o sucesso de masculinização de 99 a 100% não seria possível em temperaturas inferiores a 39°C, considerada letal para tilápias (Baras, 2001). A exposição das larvas de tilápias do Nilo a temperaturas “masculinizantes”, além de prejudicar a sobrevivência, prejudica também o crescimento, comparado aos animais cultivados na faixa de temperatura ideal (27 a 28°C) (Baroiller *et al.* 1995, Abucay *et al.*; 1999; Baras, 2001).

Outro aspecto ainda mais complexo é o fato de a sensibilidade à masculinização pela temperatura estar associado a um efeito parental (Baroiller e D'Cotta, 2001; Tessema *et al.*, 2006), tanto que essa sensibilidade pode ser selecionada como uma característica quantitativa com herdabilidade de 0,69 (Wessels e Hörstgen-Schwark, 2007). Logo, protocolos de masculinização baseados na indução por temperatura, em tese, não poderiam ser elaborados sem antes haver um programa de “melhoramento genético” baseado na seleção de reprodutores que produzissem prole sensível à masculinização pela temperatura.

## 2.5. Masculinização induzida por hormônios

Em tilápias do Nilo, o sexo fenotípico pode ser diferente do sexo genotípico, sendo que sua determinação está ligada a eventos bioquímicos influenciados pelo ambiente (Chan e Yeung, 1983). Durante a fase inicial do desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais são similares nos dois sexos (Fostier et al., 1983) e permanecem indiferenciadas e indeterminadas até que o estímulo de hormônios esteróides determinem o desenvolvimento para ovogônias ou espermatogônias, que vão dar origem aos ovários ou testículos, respectivamente. O fator chave para a diferenciação das gônadas está ligado ao papel da enzima aromatase, produzida pelas células granulosas dos folículos ovarianos. Produto do gene CYP19, a aromatase realiza a clivagem de testosterona em estradiol (Li et al., 2014). Desta forma, em níveis baixos há uma menor biossíntese de estrogênio e consequente indução do desenvolvimento de testículo em fêmeas de tilápias genotípicas, ao passo que o aumento de estrogênio induz a formação de ovário em tilápias genotipicamente machos (Baroiller e D'Cotta, 2018).

Essa susceptibilidade das células germinativas primordiais aos esteróides permite a indução do sexo fenotípico. Uma possibilidade para induzir o sexo fenotípico é a partir da aplicação de andrógenos, quando se pretende masculinizar os peixes (Hunter & Donaldson, 1983), e estrógenos quando se pretende induzir à feminização (Desprez et al., 1995).

A masculinização de tilápias pode se dar através de esteróides masculinizantes administrados a larvas recém eclodidas para que o tecido gonadal indiferenciado de fêmeas genéticas se desenvolva em testículos, produzindo indivíduos que crescem e funcionam reprodutivamente como machos (Popma & Lovshin, 1996). Dentre os hormônios avaliados para tanto, além da  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT), mais comum (Pandian e Varadaraj, 1990), avaliou-se, por exemplo, a eficácia da  $17\alpha$ -etiltestosterona (Shelton et al., 1981) com *O. aureus*;  $17\alpha$ -metilandroestendiol (Varadaraj e Pandian, 1987) com *O. mossambicus*; miboleron (Torrans et al., 1988) com *O. aureus*; acetato de noretisterona (Pandian e Varadaraj, 1990) com *O. mossambicus*; fluoximesterona com *O. niloticus* (Phelps et al., 1992) e acetato de trembolona com *O. aureus* (Galvez et al., 1996) para promover a reversão sexual de tilápias.

A estratégia de reversão por meio da administração da  $17\alpha$ -metiltestosterona na dieta permite a prática em larga escala e proporciona a diminuição ou eliminação da

reprodução das tilápias (MacIntosh e Little, 1995). Dessa forma, as fêmeas não são descartadas como ocorre em cultivos monossexo que lançam mão da sexagem, e há aumento da produção, ocasionado pelo maior crescimento dos machos (Guerrero, 1975).

A dosagem que proporciona maior sucesso na taxa de masculinização de tilápias foi avaliada em diversos estudos. Vera-Cruz e Mair (1994) obtiveram 99% de machos com 60 mg MT/kg de dieta alimentados com 20% do peso corporal durante 25 dias. Romerio *et al.* (2000) obtiveram 98% de masculinização com 60 mg de 17 $\alpha$ -metiltestosterona/kg de dieta. Smith e Phelps (2001), relataram 99-100% de machos de tilápia do Nilo quando receberam 60 mg/kg de 17 $\alpha$ -metiltestosterona no alimento durante 28 dias. O uso do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona passou então a ser recomendado a partir do primeiro dia de alimentação exógena até 21 ou 28 dias, na dosagem de 60 mg/kg (Popma e Green, 1990; Kubitz, 2000), logrando-se 95,7 a 100% de machos (Hiott e Phelps, 1993).

## **2.6. Óleo de soja na aquicultura**

O óleo de soja é produzido através de um complexo processo industrial que se divide em duas etapas básicas: a produção do óleo bruto a partir dos grãos de soja, e o seu refino (Embrapa, 2005). Os diferentes usos do óleo de soja se estendem desde a alimentação humana e animal até a produção de combustível, como o biodiesel (Ferrari, 2004). Na aquicultura, o óleo de soja também tem sido utilizado para uma gama de propósitos no manejo alimentar de peixes, sendo sua inclusão nas dietas, como fonte de energia, a aplicação mais frequente e importante (Izquierdo *et al.*, 2003). Determinados níveis de inclusão podem proporcionar melhor crescimento e desempenho em tilápias, além de contribuir para a melhora de seus níveis nutricionais (Godoy *et al.*, 2019), rendimento de carcaça e filé (Boscolo *et al.*, 2004). O óleo de soja tem sido utilizado, ainda, para conferir palatabilidade aos péletes de ração, deixando o alimento mais atrativo para os peixes (Moreira *et al.*, 2015). No manejo alimentar de reprodutores de tilápia, a inclusão de óleo de soja é capaz de melhorar os índices das fêmeas desovantes, bem como a sobrevivência das larvas (El-Sayed, 2006; Bombardelli *et al.*, 2009).

Para além das aplicações citadas, o óleo de soja é muito útil como diluente e veículo para substâncias que se deseje ministrar aos peixes por meio da alimentação, como medicamentos e probióticos (Nakandakare, 2013). Também é possível que o óleo

de soja seja eficiente para diluir e veicular a metiltestosterona pela dieta no processo de masculinização de tilápias, porém essa hipótese ainda não foi confirmada por relatos científicos. No passado, óleo de peixe ou de origem vegetal foram sugeridos como alternativa ao álcool como diluente e veículo para hormônios masculinizantes (Popma e Green, 1990; Galvez, 1995; Phelps e Popma, 2000). Contudo, o risco de rancificação da dieta ocasionado pelo óleo (Clemante e Cahoon, 2009) pode ter impedido seu uso nas pisciculturas (Popma e Green, 1990; Phelps e Popma, 2000) devido aos longos períodos que as rações preparadas com hormônio ficavam estocadas até serem totalmente consumidas. Porém, o consumo de dieta atualmente nas larviculturas é elevado, com curto tempo de armazenamento de rações preparadas para o manejo de reversão sexual. As observações de campo corroboram essa ideia, pois muitas fazendas de tilápia já fazem uso do óleo de soja como diluente e veículo da metiltestosterona na dieta.

No manejo de inversão sexual, há décadas o álcool etílico é a substância mais empregada como veículo para os hormônios masculinizantes ou feminilizantes na dieta ofertada às larvas de peixes (Baroiller e D'Cotta, 2018). No entanto, seu uso para esse fim tem sido questionado, devido ao custo envolvido e aos potenciais riscos à saúde dos profissionais que preparam a dieta e manipulam o álcool (Grant *et al.*, 2004; Falk *et al.*, 2006). Diante dessas questões, a utilização do óleo de soja para este manejo, como diluente e veículo para o hormônio, volta a ser cogitada.

## 2.7. Bioflocos

Ao longo do desenvolvimento da aquicultura, os cultivos de organismos aquáticos tiveram como principal solução para remoção de compostos tóxicos aos animais confinados a troca parcial ou total de água dos tanques de criação. Embora eficiente, sob a perspectiva ambiental a prática se tornou preocupante, devido aos grandes volumes de água utilizados e ao efluente produzido, com elevado potencial poluidor, além da escassez de água de determinadas regiões.

Neste contexto, as atenções se voltaram para um sistema de produção denominado de tecnologia de bioflocos (BFT, das siglas em inglês *biofloc technology*). O conceito do sistema de bioflocos, inicialmente também conhecido como *Active Suspension Pond* (Chamberlain e Hopkins, 1994; Avnimelech, 2006), começou a ser difundido por meio de publicações científicas a partir da década de 80 e 90 nos Estados Unidos (Hopkins *et*

*al.*, 1993; Chamberlain e Hopkins, 1994) e Israel (Avnimelech, 1993; Avnimelech *et al.*, 1994), e tinham o camarão marinho e a tilápia como organismos de interesse para os estudos.

Se no primeiro momento, o efluente rico em nutrientes representava um problema, nos sistemas de bioflocos ele é a base do sistema. O carbono e nitrogênio provenientes das dietas e da excreção dos organismos aquáticos sustentam uma comunidade microbiana que formam agregados denominados flocos, daí o nome bioflocos (Crab *et al.*, 2007, 2012; Liu *et al.*, 2018a). O nitrogênio oriundo da quebra das proteínas e aminoácidos resulta em amônia, que pode ser utilizada no início da formação do sistema por bactérias fotoautotróficas e heterotróficas na sua composição celular e crescimento (Avnimelech, 1999, 2006; Green *et al.*, 2019a) e/ou por bactérias quimioautotróficas, também conhecidas como nitrificantes, as quais oxidam a amônia (NH<sub>3</sub>) a nitrito (NO<sub>2</sub>) e este a nitrato (NO<sub>3</sub>), sendo a última forma nitrogenada menos tóxica para os peixes (Ebeling *et al.*, 2006). A presença e proliferação das bactérias heterotróficas e nitrificantes está atrelado à relação carbono/nitrogênio, e com o tipo de carbono (Avnimelech, 1999, 2009; Crab *et al.*, 2010). Enquanto as bactérias heterotróficas se multiplicam na presença de carbono orgânico, as nitrificantes, que são autotróficas, utilizam carbono inorgânico (Avnimelech, 2009).

Inicialmente acreditava-se que a reciclagem dos nutrientes permitiria manter a mesma água dos tanques, sem trocas, mesmo que parciais, o que levou o sistema a ser denominado de “troca zero” (McNeil, 2000; Chamberlain *et al.*, 2001). No entanto, posteriormente, estudos mostraram que o acúmulo de sólidos resultantes da proliferação bacteriana, especialmente heterotróficas (Azim e Little, 2008; Liu *et al.*, 2018a;) prejudica o desempenho dos organismos cultivados (Hargreaves, 2006; Luo *et al.*, 2014; Ludson *et al.*, 2020), assim como o acúmulo de nitrato que, embora menos tóxico, em elevadas concentrações, pode ocasionar queda no desempenho e até mesmo morte dos peixes (Luo *et al.*, 2020; Manduca *et al.*, 2021). Contudo, o sistema não deixou de ser interessante pois, mesmo com a necessidade de drenagem e reposição do volume, a quantidade de água requerida é muito menor quando comparado aos sistemas de “água clara”.

Dentre as principais vantagens do sistema de bioflocos está a possibilidade da sua utilização como fonte adicional de nutrientes para os organismos cultivados, especialmente filtradores, como a tilápia (Azim e Little, 2008; Luo *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2017). Mas, além disso, a biossegurança, tanto com relação a se evitar a entrada de

patógenos no sistema, como a liberação de substâncias que podem ser prejudiciais ao meio ambiente (Avnimelech, 2012; Crab *et al.*, 2012), bem como a economia de água, se tornaram fatores relevantes que fomentam as iniciativas em pesquisas e aplicação da tecnologia de bioflocos.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCAY, J.S.; MAIR, G.C.; DE SKIBINSKI, D.; BEARDMORE, J.A. Environmental sex determination: The effect of temperature and salinity on sex ratio in *O. niloticus*. *Aquaculture*, v.173, p.219-234, 1999.

AHMAD, I.; RANI, A.M.B.; VERMA, A.K.; MAQSOOD, M. Biofloc technology: An emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquac. Int.*, v.25, p.1215-1226, 2017.

ALI, H. The use of sex hormone in sex reversal of *O. niloticus*. *Mar. Biol.*, v.2, p.1-7, 2019.

ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R.J. Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish Fish.*, v.4, p.147-190, 2003.

ALVARENGA, É.R.; FERNANDES, A.F.A.; LOPES, L.R.; SOARES, T.S.; ALVES, G.F.O.; COSTA, F.F.B.; SALES, S.C.M.; LIMA, G.K.; TURRA, E.M. Attempt to produce a Nile tilapia tetraploid line by heat shock induction. *Aquaculture*. v.529, 2020.

ALVARENGA, É.R.; ALVES, G.F.O.; FERNANDES, A.F.A.; COSTA, G.R.; SILVA, M.A.; TEIXEIRA, E.A.; TURRA, E.M. Moderate salinities enhance growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in the biofloc system. *Aquac. Res.* v.49, p.2919–2926. 2018.

ALVES, A.P.D.C.; PAULINO, R.R.; PEREIRA, R.T.; COSTA, D.V.; ROSA, P.V. Nile tilapia fed insect meal: Growth and innate immune response in different times under lipopolysaccharide challenge. *Aquac. Res.*, v.00, p.1–12, 2020.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S.O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Anim. Reprod.*, v.27, p.166-172, 2003.

AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. *Aquacult. Eng.*, v.34, p.172-178, 2006.

AVNIMELECH, Y.; KOCHVA, M.; DIAB, S. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Israel J. Aquaculture* Bamidgah, v. 46, p.119–131, 1994.

AVNIMELECH, Y. *Biofloc Technology - A Practical Guide Book*. Baton Rouge, Louisiana: The World Aquaculture Society, 2009. 182p.

AVNIMELECH, Y. *Biofloc Technology: A Practical Guide Book*. Baton Rouge, Louisiana, 2<sup>a</sup> Edition. The World Aquaculture Society, 2012, 271p.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, v.176, p.227-235, 1999.

AVNIMELECH, Y.; KOCHBA, M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using <sup>15</sup>N tracing. *Aquaculture*, v.287, p.163-168, 2009.

AZIM, M.E.; LITTLE, D.C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.283, p.29-35, 2008.

AZIM, M.E.; LITTLE, D.C.; BRON, J.E. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresour. Technol.*, v.99, p.3590-3599, 2008.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effects of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX – XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.192, p.187-199, 2001.

BAROILLER, J.F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern the sex ratios of the mouth breeding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp Zool.*, v.273, p.216-223, 1995.

BAROILLER, J. F., D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* v.130, 399-409, 2001.

BAROILLER, J.-F.; D'COTTA, H. Sex Control in Aquaculture IN Sex Determination and Control in Cichlidae 189, Volume I, First Edition, p. 189-234, 2018.

BAROILLER, J.F.; FOSTIER, A.; CAUTY, C.; XAVIER, R.; JALABERT, B. Effects of high rearing temperatures on the sex ratio of progeny from sex reversed males of *Oreochromis niloticus*. *The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. p.41, 1996.

BEARDMORE, J.A.; MAIR, G.C.; LEWIS, R.I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, v.197, p. 283-301, 2001.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; FEIDEN, A.; MEURER, F.; WOLFF, L. Desempenho e características de carcaça de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de gordura. Acta Sci. - Anim. Sci., v.26, p. 443-447, 2004.

BOMBARDELLI, R.A.; HAYASHI, C.; NATALI, M.R.M.; SANCHES, E.A.; PIANA, P.A. Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia do Nilo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. Rev. Bras. de Zootec., v.38, p.1391-1399, 2009.

CHABERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; MCINTOSH, R.P.; VELASCO, M. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - I: Nutrient transformation and water quality benefits. Glob. aquacult. advocate, p.53-56, 2001.

CHAMBERLAIN, G.W.; HOPKINS, S.J. Reducing water use and feed cost in intensive ponds. World Aquaculture, v.25, p.29-32, 1994.

CHAN, S.T.H.; YEUNG, W.S.B. Sex control and reversal in fish under natural conditions. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Ed. Fish physiology: IX. San Diego, CA: Academic Press, p.171-220, 1983.

CLEMENTE, T.E., CAHOON, E.B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. Plant Physiol. v.151, p.1030-1040, 2009.

CNAANI, A.; LEVAVI-SIVAN, B. Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. Sexual Development in Aquaculture, Department of Poultry and Aquaculture Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization Bet-Dagan 50250 (Israel), v.3, p.164-175, 2009.

CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETEA, W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture, v.270, p.1-14, 2007.

CRAB, R.; CHIELENS, B.; WILLE, M.; BOSSIER, P.; VERSTRAETEA, W. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. Aquac. Res., v.41, p.559-567, 2010.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture, v.356-357, p.351-356, 2012.

CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M.; FITZPATRICK, M.S. Fate of methyltestosterone in the pond environment: Detection of MT in pond soil from a CRSP site. In: A. Gupta, K., McElwee, D., Burke, J., Burrigh, X., Cummings, and H. Egna

(Editors). Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/ Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, p.79-82. 2001.

DENG, Y.; VERDEGEM, M.C.J.; EDING, E.P.; KOKOU, F. Effect of rearing systems and dietary probiotic supplementation on the growth and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae. *Aquaculture*, v.546, 2022.

DESPREZ, D.; EDDY, G.; MARIE, C.H.; MÉLARD, C.; PIERRE, B.; BAROILLER, J.F. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11- hydroxyandrostenedione in Florida red tilapia. *Aquaculture*, v.216, p.55-65, 2003.

DESPREZ, D.; MÉLARD, C.; PHILIPPART, J. C. Production of high percentage of male offspring with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. II. Comparative reproductive biology of females and F2 pseudofemales and large-scale production of male progeny. *Aquaculture*, v. 130, p. 35-41, 1995.

EBELING, J.M.; TIMMONS, M.B.; BISOGNI, J.J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, v.257, p.346-358, 2006.

EL-SAYED, A.-F.M. Tilapia Culture. CABI Publications, Wallingford, UK, 275, 2006.

EKASARI, J.; SETIAWATI, R.; RITONGA, F.R.; SETIAWATI, M. Growth and health performance of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) juvenile fed with graded levels of biofloc meal. *Aquac. Res.*, v.50, p.1802-1811, 2019.

FALK, D.E.; Yi, H.-Y.; HILLER-STURMHÖFEL, S. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders: findings from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Alcohol Res. Health.* v.29, p.162-171, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Contributing to food security and nutrition for all. Rome, Italy, 200pp, 2018.

FERRARI, R.A. Biodiesel de Soja - Taxa de Conversão em Ésteres Etílicos, Caracterização Físico Química e Consumo em Gerador de Energia. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

FITZPATRICK, M.S.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M.; SCHRECK, C.B. Fate of methyltestosterone in the pond environment: Detection of MT in soil after treatment with MT food. In: McElwee, K., Burke, D., Niles, M., Cummings, X., Egna, H. (eds.),

Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, p.109–112. 2000.

FOSTIER, A.; JALABERT, R.; BILLARD, R.; BRETON, B.; ZOHAR, Y.; The gonadal steroids. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Ed.). Fish physiology: IX. San Diego, CA: Academic Press, p.277-371, 1983.

GALE, L.W.; FITZPATRICK, M.S; LUCERO, M.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M.; SCHRECK, C.B. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. Aquaculture. v.178, 349–357, 1999.

GALVEZ, J.I.; MAZIK, P.M.; PHELPS, R.P.; MULVANEY, D.R. Masculinization of channel catfish *Ictalurus punctatus* by oral administration of trenbolone acetate. J World Aquac Soc v.26, p.378-383, 1995.

GODOY, A.C.; SANTOS, O.O.; OXFORD, J.H.; MELO, I.W.A.; RODRIGUES, R.B.; NEU, D.; NUNES, R.V.; BOSCOLO, W.R. Soybean oil for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in finishing diets: Economic, zootechnical and nutritional meat improvements. Aquaculture. v.512, p. 1-10, 2019.

GRANT, B.F.; STINSON, F.S.; DAWSON, D.A.; CHOU, S.P.; DUFOUR, M.C.; COMPTON, W.; PICKERING, R.P.; KAPLAN, K. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Arch Gen Psychiatry, v.61, p.807-816, 2004.

GREEN, B.W.; RAWLES, S.D.; SCHRADER, K.K.; GAYLORD, T.G.; MCENTIRE, M.E. Effects of dietary protein content on hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*) performance, common microbial off-flavor compounds, and water quality dynamics in an outdoor biofloc technology production system. Aquaculture 503, 571–582. 2019<sup>a</sup>.

GUERRERO, R.D. Use of androgens for production of all-male *Tilapia aurea* (Steindachner). Trans. Am. Fish. Soc., v.104, p. 342-348, 1975.

HARGREAVES, J.A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacult. Eng., v.34, p.344-363, 2006.

HERBST, E.C. Induction of tetraploidy in zebrafish *Danio rerio* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. 127 f. Thesis (MSc) - University of North Carolina at Charlotte, 2002.

HIOTT, A.E.; PHELPS, R.P. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone. *Aquaculture*, v.112, p.301-308, 1993.

HOPKINS, J.S.; HAMILTON, R.D.L.; SANDIFERS, P.A. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J World Aquac Soc*, v.24, p.304-320, 1993.

HULATA G. Genetic manipulations in aquaculture, a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, v.111, p.155-173, 2001.

HULATA G.; WOHLFARTH G.W.; KARPLUS, I.; SCHROEDER, G.L.; HARPAZ, S.; HALEVY, A.; ROTHBARD', S.; COHEN, S.; ISRAEL, I.; KAVESSA, M. Evaluation of *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* hybrid progeny of different geographical isolates, reared under varying management regimes. *Aquaculture*, v.115, p.253-271, 1993.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M (Ed.). *Fish Physiology Reproduction, Behavior and Fertility Control*, V. IX-B. New York: Academic Press, p. 23-303, 1993.

IZQUIERDO, M.; OBACH, A.; ARANTZAMENDI, L.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; Rosenlund, G. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquac. Nutr.*, v.9, p.397-407, 2003.

KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. 1ª ed. Jundiaí: F. Kubitza, 287pp., 2000.

KUBITZA, F. *Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial*. 2ª ed. Jundiaí: F. Kubitza, 316pp, 2011.

LI, M.H.; YANG, H.H.; ZHOU, J. Efficient and Heritable Gene Targeting in Tilapia by CRISPR/Cas9. *Genetics*, v.197, p. 591–599, 2014.

LIU, W.; LUO, G.; CHEN, W.; TAN, H. Effect of no carbohydrate addition on water quality, growth performance and microbial community in water-reusing biofloc systems for tilapia production under high-density cultivation. *Aquac. Res.*, v.49, p.2446-2454, 2018.

LUO, G.; GAO, Q.; WANG, C.; LIU, W. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*, v.422-423, p.1-7, 2014.

LUO, G.; XU, J.; MENG, H. Nitrate accumulation in biofloc aquaculture systems. *Aquaculture*, v.520, p.1-10, 2020.

MACINTOSH, D.J.; LITTLE, D.C. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Eds.) Broodstock management and egg and larval quality. London: Blackwell Science Ltda, p.277-320, 1995.

MAIR G.C.; SCOTT A.G.; PENMAN D.J.; BEARDMORE J.A.; SKIBINSKI D.O. Sex determination in the genus *Oreochromis* - 1. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.). *Theoret. Appl. Gen.* v.82, p.144-152, 1991.

MANDUCA, L.G.; SILVA, M.A.; ALVARENGA, É.R.; ALVES, G.F.O.; FERNANDES, A. F. A.; ASSUMPCÃO, A. F.; CARDOSO, C.C.; SALES, S.C.M.; TEIXEIRA, E.A.; SILVA, M. A.; TURRA, E.M. Effects of zero exchange biofloc system on growth performance and health of Nile tilapia in different stocking density. *Aquaculture*, v.521, p.1-38, 2020.

MCNEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. *Global Aquacult. dvocate*, p.76, 2000.

MEURER, F. Fontes proteicas suplementadas com aminoácidos e minerais para a tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *R. Bras. Zootec.*, v.34, p.1-6, 2005.

MOREIRA, P.O.; SILVA, T.C.; BITTENCOURT, F.; NEU, D.H.; BOSCOLO, W.R. Tilápia do Nilo Soybean Oil Used On Pre And Post Processing Of Diets For Nile Tilapia. *Bol. Inst. Pesca*, v.41, p.547-555, 2015.

NAKANDAKARE, I.B.; IWASHITA, M.K.P.; DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M.T.; ROMAGOSA, E.; Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias do Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol. Inst. Pesca*, v.39, p.121-135, 2013.

PANDIAN T.J., VARADARAJ K. Techniques to produce 100% male Tilapia. *NAGA, The ICLARM Q.* v. 7, p.3-5, 1990.

PHELPS, R.P.; COLE, W.; KATZ, T. Effect of fluoxymesterone on sex ratio and growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.* v.23, p.405-410, 1992.

PHELPS, R.P.; POPMA, T.J. Sex reversal of tilapia. Pages 34–59 in B.A. Costa-Pierce; J.E. Rakocy, eds. *Tilapia Aquaculture in the Americas*, vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 2000.

PILLAY, T.V.R. *Aquaculture, principles and practices*. Cambridge: Fishing News Books, 575 p,1990.

POPMA, T.J.; GREEN, B.W. Sex reversal of tilapia in earthen ponds: Aquacultural Production Manual. Auburn: Auburn University, Alabama. R & D. Series nº 35, 15p.,1990.

POPMA, T.J.; LOVSHIN, L. Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Auburn: Auburn University. (Research and development, 41), 1996.

ROMERIO, M.P. Masculinization of Nile tilapia, *O. niloticus*, using different diets and different doses of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. R. Bras. Zootec., v.29, p.654-659, 2000.

SHELTON, W.L.; GUERRERO, D.R.; MACIAS, J.L. Factors affecting androgen sex reversal of tilapia aurea. Aquaculture, v.25, p.59-65, 1981.

SHOURBELA, RM.; EL-HAWARRYA, W.N.; ELFADADNY, M.R.; DAWOODC, M.A.O. Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. Aquaculture, v.542, 2021.

SINGH, E.; SAINI, V.P.; SHARMA, O.P. Sex reversal in red tilapia (*Oreochromis* spp) fry by immersion technique. Int. j. fauna biol. Stud., v.5, p. 34-36, 2018.

SMITH, E.S; PHELPS, E.R.P. Impact of feed storage conditions on growth and efficiency of sex reversal of Nile tilapia. North American J. Aquacult., v.63, p.242-245, 2001.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; VALLE, J.B.; SIQUEIRA, M.R. Desempenho de diferentes linhagens de tilapia do Nilo (*O. niloticus*) na fase de reversão sexual. Acta Scientiarum, v.26, p.305 -311, 2004.

TESSEMA, M.; BELECKE, A.M.; SCHWARK, G.H. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. Aquaculture. v.258, p.270-277, 2006.

TORRANS, L.; MERIWETHER, F.; LOWELL, F.; WYATT, B.; GWINUP, P.D. Sex reversal of *Oreochromis aureus* by immersion in mibolerone, a synthetic steroid. J. World Aquacult. Soc., v.19, p.97-102, 1988.

TURRA, E.M.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, E.A.; LUZ, R.K.; PRADO, S.A.; MELO, D.C.; FARIA, P.M.C.; SOUSA, A.B. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. Anim. Reprod., v.34, p.21-28, 2010.

TURRA, E.M.; Toral, F.L.B; ALVARENGA, É.R. Genotype × environment interaction for growth traits of Nile tilapia in biofloc technology, recirculating water and Cage systems. *Aquaculture*, v.460, p.98-104, 2016.

VARADARAJ, K.; PANDIAN, T.J. Masculinization of *Oreochromis mossambicus* by administration of 17 $\alpha$ -methyl-5-androsten-3 $\beta$ -17 $\beta$ - diol through rearing water. *Curr. Sci.*, v.56, p.412-413, 1987.

VERA CRUZ, E.M.; MAIR, G.C. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. v.122. p.237-248, 1994.

WASSERMANN, G.J.; AFONSO, L.O.B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) by androgen immersion. *Aquac. Res.* v.34, p. 65-71, 2003.

WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture*. v.272, p.80-87, 2007.

WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. The influence of rearing temperature and spawner's temperature responsiveness on progeny sex ratios in matings with Nile Tilapia YY males. Proceedings of the 32 nd Annual Larval Fish Conference, Kiel, Germany, 2008.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. *Fish Physiol.*, Academic Press, New York, v.3, 485p., 1969.

#### 4. ARTIGO

**Título:**

**Óleo de soja como diluente e veículo da 17 $\alpha$ -metiltestosterona na masculinização da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistemas de água clara e BFT**

**Autores:** Franklin Fernando Batista da Costa <sup>(1)</sup>, Érika Ramos de Alvarenga <sup>(1)</sup>, Marcos Antônio da Silva <sup>(1)</sup>, Ludson Guimarães Manduca <sup>(1)</sup>, Namíbia Rizzari Leite <sup>(1)</sup>, Vinícius Monteiro Bezerra <sup>(1)</sup>, Stefani Grace da Silva Moraes <sup>(1)</sup>, Lara Quintanilha Goulart <sup>(1)</sup>, Williane Ferreira Menezes <sup>(1)</sup>, Arthur Cavatti Neto <sup>(1)</sup>, Thaiza da Silva Campideli <sup>(1)</sup>, Eduardo Maldonado Turra <sup>(1)</sup> e Edgar de Alencar Teixeira\*<sup>(1)</sup>

(1) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 567, Campus Pampulha, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil.

\* **autor correspondente:**

Telefone: 55 31 3409 2190

E-mail: edgarvet@hotmail.com (Edgar de Alencar Teixeira)

## Resumo

A produção de lotes masculinizados de tilápias por meio do uso do hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) é eficaz, entretanto, a técnica ainda tem um custo importante na fase de larvicultura, representado principalmente pelo uso do álcool etílico como diluente e veículo para o hormônio na dieta. Diante disso, tivemos como principal objetivo testar a hipótese de que o uso do óleo de soja como diluente e veículo para a MT na dieta, ofertada para larvas de tilápias do Nilo é eficaz no processo de masculinização. Para tanto, um quantitativo de seis mil larvas de tilápias do Nilo foi dividido em 20 unidades experimentais, para compor 4 tratamentos, os quais foram assim caracterizados: uso de 2% de óleo de soja por kg de dieta para a dispersão da MT na dieta em sistema de água clara (*HO/CW*); uso de 2% de óleo de soja por kg de dieta para a dispersão da MT na dieta em sistema de bioflocos (*HO/BFT*); uso de álcool para dispersar a MT na dieta mais a adição posterior de 2% de óleo na dieta em sistema de bioflocos (*HA+O/BFT*) e uso do álcool para dispersar a MT na dieta em sistema de bioflocos (*HA/BFT*). A taxa de masculinização foi avaliada em dois períodos de aplicação do hormônio, durante 28 e 21 dias. Além da masculinização, qualidade de água, desempenho, sobrevivência e composição corporal foram avaliados. Os resultados de masculinização do período de 28 dias foram de 100% para os tratamentos *HO/CW*, *HO/BFT*, *HA/BFT* e de 94% para o tratamento *HA+O/BFT*. Para o período de 21 dias, os resultados foram 89,44, 86,74, 80,94 e 93,60% para os tratamentos *HO/CW*, *HO/BFT*, *HA+O/BFT*, *HA/BFT*, respectivamente. Em geral, os parâmetros ficaram dentro da faixa recomendada para a espécie. Os resultados de desempenho zootécnico, sobrevivência e composição corporal não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos. Ao final do ensaio foi possível concluir que o óleo de soja é eficaz como veículo para a distribuição do hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona pela dieta, proporcionando resultados satisfatórios com relação a taxa de masculinização. Constatou-se que o período de aplicação do hormônio que resulta em maior quantidade de peixes masculinizados é de 28 dias, comparado aos resultados de 21 dias. É a primeira vez que esta comparação é feita em sistema de bioflocos.

**Palavras-chave:** controle sexual, metiltestosterona, peixe, tilapicultura

#### 4.1. Introdução

O sucesso na produção de tilápias se deve ao desenvolvimento tecnológico da sua cadeia produtiva. Dentre os avanços alcançados, destaca-se a técnica para a produção de lotes masculinizados, que permite explorar vantagens do cultivo monossexo, como a uniformidade do tamanho entre os animais, a inibição da reprodução indesejada e o melhor desempenho dos machos (Baroiller e D'Cotta, 2018; Silva et al., 2022). Várias técnicas foram propostas para a produção de lotes 100% machos, como a masculinização por hibridização interespecíes (Beardmore, 2001; Hulata, 2001), indução térmica (Baroiller et al., 1996) e a masculinização induzida por hormônios (Pandian e Varadaraj, 1990; Singh, 2018; Silva et al., 2022). Sendo a última a que promoveu melhores resultados a partir da aplicação do hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) na dieta ofertada às larvas no início da alimentação exógena, pelo período de 21 a 28 dias (Hiott e Phelps, 1993; Guerrero e Guerrero, 1988; Silva et al., 2022).

A masculinização induzida pela MT é a técnica mais empregada na tilapicultura (El-Sayed, 2006; Baroiller e Cotta, 2018). No entanto, o álcool etílico utilizado como diluente e veículo para o hormônio na dieta impacta significativamente os custos com o manejo, além de ser um possível problema para a saúde dos trabalhadores que fazem o preparo das rações com MT, devido aos vapores de álcool produzidos durante o processo (Grant et al., 2004; Falk et al., 2006).

O óleo de soja já é utilizado na aquicultura para diluir e veicular substâncias como medicamentos e probióticos por meio da dieta para os peixes (Nakandakare, 2013). Logo, é possível que esta aplicação também seja efetiva com a metiltestosterona no processo de masculinização de tilápias. Porém, essa hipótese, ao que conseguimos constatar, ainda não havia sido confirmada por relatos científicos. No passado, óleos de peixes ou de origem vegetal foram sugeridos como alternativa ao álcool como diluente e veículo para hormônios masculinizantes (Popma e Green, 1990; Galvez, 1995; Phelps e Popma, 2000). Contudo, o risco de rancificação da dieta ocasionado pelo óleo (Clemante e Cahoon, 2009) pode ter impedido seu uso nas pisciculturas (Popma e Green, 1990; Phelps e Popma, 2000) devido aos longos períodos que as rações preparadas com hormônio ficavam estocadas até serem totalmente consumidas. Porém, atualmente, o consumo de dieta nas larviculturas é elevado, com curto tempo de armazenamento de rações preparadas para o manejo de masculinização. Diante disso, a utilização do óleo de soja para esse manejo pode ser novamente cogitada.

O manejo de masculinização com MT geralmente ocorre em sistema de tanques escavados. Essa prática pode representar riscos ambientais relacionados aos metabólitos da metiltestosterona, liberados na água pela excreção dos peixes e sobras de alimento (Fitzpatrick, 2000; Contreras-Sánchez et al., 2001; Baroiller e D'Cotta, 2018). Além disso, o sistema de tanques escavados faz uso de grandes volumes de água. Uma das alternativas para mitigação dos impactos ambientais provocados pela aquicultura tem sido proposta a partir do uso do sistema de bioflocos (BFT).

O BFT começou a ser desenvolvido na década de 70, visando a produção de organismos aquáticos (Avnimelech, 2009; Browdy et al., 2012; Crab et al., 2012; Ahmad et al., 2017). Contudo, houve nos últimos anos uma intensificação nos estudos relacionados ao sistema. Isso se deve, principalmente, às questões ambientais que impulsionam cada vez mais a busca pela produção sustentável de alimentos. O BFT tem como principal atrativo a economia de água, já que microrganismos, base do sistema, removem a amônia e o nitrito, tóxicos para a maioria dos peixes e crustáceos e, desta forma, dispensa a necessidade de renovação de grandes volumes de água (Avnimelech, 2009; Crab et al., 2012).

O sistema já foi explorado em diversos contextos, apresentando resultados satisfatórios, como aqueles relacionados ao desempenho zootécnico de tilápia do Nilo cultivada em BFT (Rakocy et al., 2004; Green et al., 2019a; Manduca et al., 2021) e redução do tempo de cultivo e conversão alimentar de tilápias do Nilo (Cavatti Neto et al., dados não publicados) oriundas de programa de melhoramento em BFT (Turra et al., 2012a ; Turra et al., 2012b ; Fernandes et al., 2015 ; Turra et al., 2016 ; Turra et al., 2018). No entanto, poucos estudos abordaram a masculinização por metiltestosterona no sistema de BFT, sendo possível citar os trabalhos de David-Ruales et al. (2019) que compararam os resultados de masculinização de tilápias (*Oreochromis* sp.) obtidos em bioflocos e sistema de recirculação, Silva et al. (2022) que avaliaram a masculinização de tilápias do Nilo em diferentes níveis de metiltestosterona em BFT e duas frequências de alimentação, e o trabalho de Valle et al. (Dados não publicados) que avaliaram diferentes salinidades durante a masculinização de tilápias do Nilo em sistema de bioflocos.

Diante dessas questões, tivemos como objetivo testar a hipótese de que o uso do óleo de soja como diluente e veículo para a MT na dieta ofertada para larvas de tilápias do Nilo é eficaz no processo de masculinização em BFT. Além de avaliar o crescimento e desempenho zootécnico das larvas de tilápia após o período de administração do hormônio até a fase de recria; avaliar o sucesso da masculinização com 21 e 28 dias de

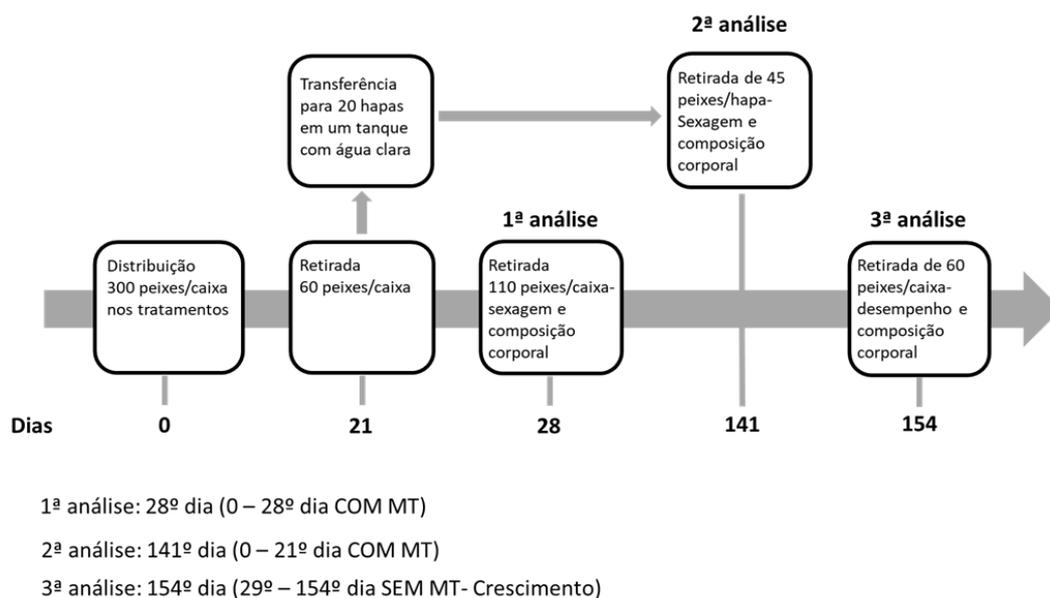
fornecimento de 17 $\alpha$ -metil testosterona e avaliar dois sistemas de produção, água clara e bioflocos, sobre a taxa de masculinização das larvas de tilápia.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Local e delineamento experimental

O presente experimento foi realizado em estufas agrícolas, localizadas no Laboratório de Aquacultura (LAQUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, Brasil. Todos os procedimentos foram revisados e aprovados anteriormente pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de número 225/2020.

O experimento contou com três momentos de análises, sendo a *primeira análise* referente ao período de 28 dias de alimentação com MT, a *segunda análise* referente ao período de 21 dias de alimentação com MT, mas realizada após um período de 120 dias, e a *terceira análise* foi realizada após o período entre o fim da administração do hormônio aos 28 dias até 154 dias de cultivo, para verificar o desempenho e a composição corporal dos peixes dos diferentes tratamentos (Figura 1).



**Figura 1-** Resumo esquemático dos procedimentos experimentais. No dia 0 ocorreu a distribuição dos peixes nas 20 unidades experimentais dos quatro tratamentos (HO/CW, HO/BFT, HA+O/BFT, HA/BFT); Aos 21 dias foi feita a retirada de 60 peixes/ caixa da alimentação com MT e transferência para 20 hapas em tanque com água clara, onde permaneceram até a sexagem e análise de composição corporal no 141º dia de alimentação sem MT; Após 28 dias de alimentação com MT foi feita a retirada de 110 peixes para sexagem e análise de composição corporal; No 154º dia após 126 dias de alimentação sem MT foi feita a retirada de 60 peixes para análises de desempenho e composição corporal. BFT- Tecnologia de bioflocos, CW- Água Clara, HO – hormônio diluído em óleo, HA+O – hormônio diluído em álcool e subsequente adição de óleo, HA – hormônio diluído em álcool. MT- metiltestosterona.

Para a realização do experimento, foi utilizado um *pool* de 6.000 larvas de tilápias do Nilo com sete dias pós-eclosão, nascidas na mesma semana, com peso médio inicial de 0,011 g. As larvas foram oriundas de desovas contemporâneas, provenientes de 10 fêmeas, visando controlar possíveis efeitos de família sobre os tratamentos. O esquema de reprodução que deu origem às larvas, contou com 30 fêmeas e 10 machos, alocados em tanques que comportaram 3 fêmeas e 1 macho, cada. As matrizes da linhagem Chitralada (peso médio de 600 g) utilizadas para a produção das larvas do experimento foram obtidas do biotério NGT-Aqua (Nutrição, Genética e Tecnologia para Aquicultura) pertencente ao Laboratório de Aquicultura da UFMG.

As larvas foram distribuídas em 20 tanques retangulares de polipropileno de 180 L, preenchidos com 150 L de água de bioflocos previamente maturado no laboratório ou água clara proveniente de poço artesiano. As unidades experimentais foram equipadas com aquecedores termostatos de 300 Watts, de modo a manter a temperatura constante e dentro da faixa de conforto térmico dos animais. A aeração foi mantida por sopradores radiais conectados a mangueiras microporosas instaladas em cada tanque para manter os níveis adequados de oxigênio para a espécie.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso com quatro tratamentos, com cinco repetições. Totalizando 20 unidades experimentais, cada uma comportando 300 larvas (2 larvas/L), as quais foram submetidas aos tratamentos a partir do primeiro dia de alimentação após absorção do saco vitelínico. Cada tratamento foi caracterizado pela inclusão da MT na dieta utilizando óleo de soja como veículo na proporção de 2% em sistema de água clara (HO/CW); inclusão da MT na dieta utilizando óleo de soja como veículo na proporção de 2% em sistema de bioflocos (HO/BFT); inclusão da MT na dieta utilizando álcool etílico como veículo mais adição posterior de 2% de óleo de soja em sistema de bioflocos (HA+O/BFT); e inclusão da MT na dieta utilizando álcool etílico como veículo em sistema de bioflocos (HA/BFT). As rações com hormônio foram ofertadas aos animais diariamente, cinco vezes ao dia (8, 10, 12, 14 e 16h), seguindo uma taxa de arraçoamento de 30, 25, 20, e 15%, na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana, respectivamente. Durante o período de masculinização, a porcentagem de dieta foi corrigida para níveis mais baixos semanalmente, como descrito por Luthada e Jerling (2013), Daudpota et al. (2016), e recomendações de Phelps e Popma (2000) e El-Sayed (2006). O cálculo de dieta para as larvas de todos os tratamentos a cada semana foi feito com base em resultados de experimentos anteriores, considerando o peso médio individual de 0,01 g na primeira semana, 0,15 g na segunda semana, 0,4 g na terceira

semana e 0,8 g na quarta semana, considerando uma mortalidade de 2% de uma semana para outra. Desta forma, na primeira semana foram ofertados 3 mg de dieta / dia, contendo 180 ng de MT (1.260 ng na primeira semana) para cada larva; na segunda semana foram ofertados 37,5 mg de dieta / dia, contendo 2.250 ng de MT (15.750 ng na segunda semana); na terceira semana foram ofertados 80 mg de dieta / dia, contendo 4.800 ng de MT (33.600 ng para a terceira semana), e na quarta semana, 120 mg de dieta / dia, contendo 7.200 ng de MT (50.400 ng para a quarta semana) foram ofertados para cada larva.

As dietas com hormônio de cada tratamento foram preparadas com dieta extrusada comercial farelada (Ração Propescado-Nutriave) contendo 12% de umidade, 55% de proteína bruta, 10% de extrato etéreo e 15% de material mineral. A concentração de MT utilizada nas rações de cada tratamento foi de 60 mg/kg de dieta (Guerrero, 1975; Tayamen e Shelton, 1978; Baroiller e D'Cotta, 2018). Os tratamentos HO/CW e HO/BFT receberam o hormônio masculinizante MT utilizando como veículo 2% de óleo de soja por kg de dieta, enquanto no tratamento HA+O/BFT o hormônio foi distribuído usando álcool etílico absoluto P.A. 99,5% como veículo (200 mL/kg de dieta) e, após a secagem, foram adicionados 2% de óleo de soja por kg de dieta. Já a dieta do tratamento HA/BFT recebeu a MT na dieta unicamente por meio do álcool etílico absoluto P.A. como veículo (200 mL/kg de dieta). A distribuição da solução com a MT pela dieta foi feita por um borrifador de 500 mL de volume seguida por homogeneização. Após um período de dois dias de secagem do álcool ao abrigo da luz, as rações foram armazenadas em potes escuros em freezer a -20 °C, de forma a preservar a metiltestosterona. Ao final da terceira semana, 21 dias de tratamento com hormônio, foram retiradas 60 larvas de cada unidade experimental para a *segunda análise* após período de crescimento. Estas foram pesadas e transferidas para um tanque suspenso de geomembrana PEAD de 4 m<sup>3</sup> com água clara (troca diária de 20%) instalado em estufa agrícola. Sendo acondicionadas em 20 hapas de polipropileno de malha de 5 mm (0,15 m<sup>3</sup>), de modo a preservar a referência da unidade experimental de origem, bem como o tratamento. As unidades experimentais foram equipadas com sistema de aeração por meio de sopradores radiais conectados a mangueiras microporosas para o provimento de oxigênio para os animais. Estas larvas foram alimentadas com dieta sem hormônio durante 120 dias. Ao final do período, 45 peixes de cada hapa foram coletados para verificar a taxa de masculinização de peixes alimentados com dieta com hormônio por 21 dias e a composição corporal.

Para as larvas que permaneceram nos tanques, ao final da quarta semana de experimento, 28 dias de tratamento com MT, a oferta de dieta com hormônio foi cessada em todos os grupos experimentais. Os animais de todos os tratamentos foram pesados e amostras de 110 animais por unidade experimental foram coletadas para a realização da *segunda análise*, para verificar a taxa de masculinização (50 animais) e composição corporal (60 animais).

Após 28 dias, foram mantidos vivos 60 animais nas unidades experimentais de cada tratamento, durante mais 126 dias, para a *terceira análise* experimental. Os animais foram alimentados com dieta extrusada comercial farelada (55% PB) livre de hormônio ou óleo adicional e posteriormente alimentadas com dieta extrusada comercial (0,8 mm com 45% PB; 1,5 mm com 40% PB e 2-4 mm com 36% PB) de acordo com a fase de crescimento. Nesta etapa, foram avaliados possíveis efeitos dos tratamentos sobre o desempenho zootécnico e composição corporal dos animais após o período de masculinização.

#### 4.2.2. Indicadores de qualidade de água

Durante os três períodos até cada análise experimental, os parâmetros de oxigênio dissolvido, pH, salinidade e temperatura foram mensurados duas vezes ao dia (8:00 e 16:00h) com sonda multiparâmetros AKSO modelo AK88 (AKSO, RS, Brasil). A alcalinidade e o volume de sólidos sedimentáveis (SS) foram medidos duas vezes por semana, de acordo com as metodologias propostas por APHA (1998) e Avnimelech (2009), respectivamente. O oxigênio permaneceu acima de 5 mg/L. O pH foi mantido em torno de 6,5 e a alcalinidade acima de 50 mg/L de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , para isso foi utilizado calcário agrícola ( $\text{CaCO}_3$ ) na água dos tanques dos tratamentos em bioflocos, efetuando correções sempre que necessário de  $\text{CaCO}_3$  (Avnimelech, 2009).

Os compostos nitrogenados, nitrogênio amoniacal total (N-AT) e nitrogênio nítrico ( $\text{N-NO}_2^-$ ) foram mensurados duas vezes por semana de acordo com as metodologias estabelecidas pela UNESCO (1983) e Bendschneider e Robinson (1952), respectivamente. Foi adotado como procedimento padrão de adição de carbono orgânico proveniente de açúcar de cana pela manhã sempre que as concentrações de N-AT atingiam valores superiores a 1 mg/L, mantendo sempre uma proporção de carbono/nitrogênio (C/N) de 6/1 (Ebeling et al., 2006). Para prevenir possíveis efeitos da

toxicidade do nitrito a salinidade foi mantida entre 2 e 3 g/L (Alvarenga et al., 2018) do início ao fim do experimento, com uso de sal agrícola (NaCl).

Durante o período *até a primeira análise* experimental houve troca diária de 50% do volume de água no tratamento água clara (HO/CW), por água previamente aquecida. E nos tratamentos com bioflocos, a água era repostada somente para compensar a evaporação. Durante o período até a *segunda análise* experimental, um volume de 20% era renovado de modo a manter a boa qualidade da água. No período até a *terceira análise* experimental foi estabelecido uma taxa de renovação de 17,5% de água duas vezes por semana nos tanques de bioflocos, com o intuito de prevenir o acúmulo excessivo de sólidos sedimentáveis e nitrato.

#### 4.2.3. Análise de masculinização

Os animais destinados à *primeira* e à *segunda análise* experimental foram submetidos à eutanásia por meio de overdose induzida por eugenol (180 mg/L) (Vidal et al., 2008). Os animais foram fixados em líquido de Bouin por 24 horas e conservados em álcool etílico 70%. Posteriormente suas gônadas foram retiradas e analisadas em microscópio ótico por meio da técnica de aceto-carmim (Guerrero e Shelton, 1974).

#### 4.2.4. Análise de desempenho e sobrevivência

O desempenho zootécnico, densidade de estocagem e a sobrevivência foram determinados da seguinte forma:

- a) Densidade de estocagem final = biomassa final (kg) / volume útil do tanque (m<sup>3</sup>);
- b) Peso médio final (PF) = peso total de peixe em cada tanque (g)/ número de peixes em cada tanque;
- c) Ganho de peso final = peso médio final (g) – peso médio inicial (g);
- d) Sobrevivência até a *primeira análise* =  $[(N_f + N_{21}) / N_0] \times 100$ , e sobrevivência no período até a *terceira análise* =  $(N_f / N_{28}) \times 100$ , onde  $N_f$  representa o número final de peixes por tanque,  $N_{21}$  representa o número de peixes retirado aos 21 dias do tanque,  $N_{28}$  representa o número inicial de peixes por tanque aos 28 dias e  $N_0$  representa o número inicial de larvas no começo de todo o experimento.

#### 4.2.5. Análise de composição corporal

No momento da *primeira, segunda e terceira análise* foram coletados respectivamente 60, 2 e 2 animais de cada unidade experimental e congelados em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  para análise da composição da carcaça. Posteriormente as carcaças foram colocadas em estufa ventilada a  $55^{\circ}\text{C}$  por 72h para retirada de umidade das amostras. Em seguida, foram moídas em peneira de 1 mm. A composição da carcaça (matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas) foi determinada de acordo com a metodologia padrão da AOAC (2005).

#### 4.2.6. Análise estatística

As variáveis relacionadas à qualidade de água, desempenho zootécnico e taxa de masculinização foram submetidas aos testes de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett). As variáveis que apresentaram resíduos com distribuição normal e homocedasticidade foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de médias. O teste de médias foi escolhido conforme o coeficiente de variação (CV) da variável de interesse, sendo aplicados os testes de Tukey (CV < 10%), teste Student-Newman-Keuls (SNK) (CV de 10 a 15%) ou teste de Duncan (CV > 15%). As variáveis não-paramétricas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis. A comparação entre as taxas de masculinização de 21 e 28 dias foi feita pelo teste de Wilcoxon. Todas as análises estatísticas consideraram um nível de significância de 5% e foram realizadas com o auxílio do programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2015) e do software R (R Core Team, 2016).

### 4.3. Resultados e discussão

A masculinização de tilápias do Nilo por meio do uso do hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona tem se consolidado cada vez mais nas pisciculturas (Baroiller e D'Cotta, 2018). O sucesso de produção de machos tem sido satisfatório, superando na maioria dos casos 95% de eficiência (Marjani, 2009; Beaven e Muposhi, 2012; Khanal, 2014; Silva et al., 2022). Em geral, este estudo apresentou taxa de masculinização mínima de 94% no tratamento que teve pior resultado e de 100% nos demais, com fornecimento de dieta com

hormônio durante 28 dias, e tivemos resultados razoáveis até mesmo nos tratamentos que receberam hormônio durante 21 dias. Utilizamos 60 mg de MT na dieta, como recomendado pelos melhores protocolos de masculinização de tilápias (Guerrero, 1975; Tayamen e Shelton, 1978; Baroiller e D'Cotta, 2018, Silva et al., 2022). No que se refere ao veículo para a distribuição do hormônio, utilizamos um protocolo tradicional com álcool etílico (Baroiller e D'Cotta, 2018) e um protocolo alternativo com óleo de soja. Ao que conseguimos constatar, este é o primeiro trabalho a avaliar o óleo de soja como veículo para a dispersão da metiltestosterona em dieta para larvas de tilápia no manejo de masculinização em BFT.

Os dados relacionados aos parâmetros de qualidade de água estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Em geral, as variáveis de qualidade de água ficaram dentro da faixa recomendada para a espécie (Wedemeyer, 1996; El-Sayed, 2006; Avnimelech, 2009; Monsses et al., 2017). Nós não observamos diferença significativa para as médias de oxigênio dissolvido e temperatura entre os diferentes tratamentos em nenhum dos períodos analisados. A tendência de acidificação do pH e consumo de alcalinidade, percebida no presente trabalho, são comportamentos esperados em sistemas BFT, assim como o aumento de sólidos em suspensão (Azim e Little, 2008; Long et al., 2015; Liu et al., 2018a; Green et al., 2019a; Kim et al., 2020). No caso do pH, a acidificação se deve principalmente à produção de dióxido de carbono pelas comunidades microbianas presentes no sistema devido ao processo de respiração aeróbia (Ebeling et al., 2006). Já a redução na alcalinidade está relacionada ao consumo de carbonatos, principalmente por bactérias quimioautotróficas. Enquanto o aumento de sólidos suspensos é resultante da proliferação da comunidade de bactérias presentes no sistema BFT, mas, especialmente de bactérias heterotróficas (Ebeling et al., 2006; Avnimelech, 2009). Não houve diferença significativa para N-AT entre os tratamentos. Os valores de N-AT durante o período até a *terceira análise* experimental ficaram acima de 1 mg/L. No entanto, a concentração de amônia tóxica ficou abaixo de 0,05 mg/L, como recomendado para a espécie (El-Sayed, 2006). Com relação ao nitrito, durante o período até a *primeira análise*, foram verificados valores mais altos nos tratamentos com bioflocos, devido ao processo de estabilização do floco (Ebeling et al., 2006). No período até a *terceira análise* não houve diferença significativa entre os tratamentos, e a concentração de nitrito permaneceu estável, uma vez que as bactérias quimioautotróficas já se encontravam estáveis. Pequenas oscilações de nitrogenados costumam ser comuns em sistema de bioflocos, principalmente nas primeiras semanas de produção (Silva et al., 2018). Por isso, estudos com larvas podem

não ter tempo suficiente para estabilização do sistema. Não houve diferença significativa para os parâmetros de sobrevivência, densidade de estocagem, peso final, comprimento e ganho de peso final entre os diferentes tratamentos (Tabela 3).

Sabe-se que os óleos vegetais, incluindo o óleo de soja, desempenham importantes funções relacionadas ao crescimento, eficiência alimentar, salubridade, função renal e branquial, desenvolvimento neural e visual, reprodução e qualidade dos filés quando implementados a dietas de peixes, incluindo a tilápia do Nilo (Wilson, 1998; Hayashi et al., 2000; Lim e Webster, 2001; Godoy et al., 2019). No entanto, limites de inclusão de lipídeos na dieta são recomendados para que se evite problemas como redução no consumo da dieta, crescimento e deposições indesejáveis de gordura visceral (Chou e Shiau, 1996). Em nosso experimento, nos tratamentos em que o óleo de soja foi o veículo para a MT, utilizamos 2% por kg de dieta, com base na quantidade normalmente aplicada para inclusão de medicamentos (Nakandakare, 2013), coincidindo também, com níveis descritos como ideais para melhor ganho de peso de juvenis de tilápias, ao redor de 12% de lipídeos na dieta (Chou e Shiau, 1996). Embora diversos trabalhos apontem diferenças significativas relacionadas ao desempenho entre grupos tratados com diferentes níveis de inclusão de óleo (Stickney, 1983; Stickney e Wurtz, 1986; Silva, 1991; Chou e Shiau, 1996; Xie, 2017), nós não observamos esta diferença entre os tratamentos com 2% a mais de inclusão de óleo de soja. Além disso, nós não verificamos diferença significativa na composição corporal entre os tratamentos (Tabela 4). Provavelmente a quantidade de lipídeos presente na dieta esteja dentro da exigência mínima para a espécie. Corroborando com este estudo, Huang et al. (2001) não verificaram aumento na deposição de gordura na carcaça de *Zacco barbata* alimentados com diferentes níveis de óleo. Por outro lado, Chou e Shiau, (1996) e Meurer et al. (2002) apontaram aumento no teor de gordura corporal de juvenis de tilápia com o aumento da inclusão de óleo nas rações. Com relação a deposição de proteína, os resultados de Justi et al. (2003) divergem dos nossos, apontando diferenças significativas ao trabalhar com tilápias alimentadas com dieta enriquecida com ácidos graxos. Os nossos resultados referentes a umidade e cinzas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, tal como no trabalho de Godoy et al. (2019), no qual se avaliou diferentes níveis de inclusão de óleo de soja em dietas para tilápias do Nilo.

A masculinização de tilápias por meio da metiltestosterona fornecida aos peixes via alimentação têm sido orientada pela aplicação do tratamento por pelo menos 21 dias com aproximadamente 50 mg de hormônio/kg de dieta a partir do início da alimentação

exógena, sendo 28 dias o mais indicado (Baroiller e D'Cotta, 2018). Nossos resultados confirmam isso, uma vez que a administração da MT durante 21 dias resultou em taxa de masculinização significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) à estratégia de administração durante 28 dias em todos os tratamentos com diferentes métodos de diluição do hormônio e sistemas de cultivo (Figura 2). Corroborando com o presente estudo, Jensi (2016) obteve 93,3% de masculinização com metodologia semelhante à do nosso trabalho, utilizando metiltestosterona (60 mg/kg de dieta) na alimentação de larvas de três dias de vida em sistema de água clara durante 21 dias. As diferentes estratégias de diluição da MT não diferiram significativamente entre si durante 21 dias de administração de dieta com metiltestosterona para as larvas de tilápia com relação ao sucesso de masculinização, independentemente do sistema de produção (Tabela 5).

Os nossos resultados confirmam os protocolos atuais com relação ao tempo de administração durante 28 dias e a dosagem de MT de 60 mg/kg de dieta (Guerrero, 1975; Tayamen e Shelton, 1978; Baroiller e D'Cotta, 2018; Silva et al., 2022). Observamos que os nossos resultados de masculinização, com exceção do tratamento HA+O/BFT, estão entre os melhores relatados na literatura comparados a trabalhos similares (Tabela 6). É notório que existe uma variação nos resultados de masculinização entre diferentes trabalhos, mesmo seguindo protocolos parecidos, como tempo de administração e concentração do hormônio masculinizante. Essas diferenças podem ser atribuídas a outros fenômenos que também influenciam a determinação do sexo fenotípico, como a herança genética mais susceptível à reversão promovida pela temperatura (Baroiller, 2009) e/ou o tamanho do animal (Hiott, 1993), que tem relação com a susceptibilidade das gônadas à diferenciação fenotípica (Pandiam e Koteeswaran, 1999). Nós procuramos aplicar os protocolos recomendados quanto ao sucesso de masculinização de forma a tentar isolar variáveis que pudessem confundir os nossos resultados.

Na aplicação do hormônio masculinizante por 28 dias houve diferença significativa entre o tratamento HA+O/BFT e os tratamentos HO/CW e HO/BFT, com uma taxa de sucesso de masculinização maior nos dois últimos, mas não se diferenciou significativamente do tratamento HA/BFT, embora este também não tenha apresentado diferença significativa em relação a HO/CW e HO/BFT (Tabela 5). O tratamento HA+O/BFT foi proposto para evidenciar possível efeito do óleo na diferenciação gonadal ao serem seus resultados de masculinização comparados aos demais tratamentos, de forma que se pudesse distingui-lo do seu papel como veículo para o hormônio, exclusivamente, uma vez que os lipídios têm influência no desenvolvimento das gônadas

(Santiago e Reyes, 1993; Bahurmiz e Ng, 2007, Ng e Wang, 2011). Diante disso, não era esperado que o tratamento HA+O/BFT apresentasse resultado de masculinização inferior aos tratamentos HO/CW e HO/BFT, especialmente porque não foi identificada diferença significativa em termos de desempenho zootécnico. Não conseguimos encontrar na literatura respostas para o ocorrido, mas imaginamos que a aplicação posterior do óleo pode ter causado uma lixiviação do hormônio masculinizante e diminuído sua concentração na dieta, resultando em uma taxa de masculinização inferior, fato esse que necessita de mais estudos para elucidação.

A tecnologia de bioflocos tem se tornado uma interessante alternativa na cadeia produtiva de tilápias, em especial na fase de larvicultura e recria (Ekasari et al., 2015; Alvarenga et al., 2018). Apesar disso, o manejo de masculinização tem sido pouco explorado nesse sistema, sendo o nosso estudo, ao que conseguimos constatar, um dos primeiros a avaliar o BFT no processo de produção de machos por meio da indução hormonal com a  $17\alpha$ -metiltestosterona (David-Ruales et al., 2019; Silva et al., 2022). Os nossos resultados relacionados à masculinização nos sistemas de água clara e bioflocos apontaram ausência de diferença entre os dois ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Contudo, tilápias tratadas com  $17\alpha$ -metiltestosterona em recirculação apresentaram maior taxa de indivíduos machos do que em BFT (Ruales et al., 2019). Esses autores inferem que a oferta alternativa de alimento natural no BFT pode ter prejudicado o consumo da dieta com hormônio e refletido no processo de masculinização. No entanto, no referido trabalho, a taxa de alimentação inicial foi de 10%, enquanto em nosso estudo os peixes começaram a ser alimentados na primeira semana a uma taxa de alimentação de 30%. Assim como no estudo realizado por Silva et al. (2022), ao trabalharem com diferentes concentrações de  $17\alpha$ -metiltestosterona para larvas de tilápia do Nilo em BFT obtiveram resultados de masculinização aos 28 dias de aplicação da MT semelhantes aos nossos. Logo, isso pode ter sido a causa da diferença entre os dois resultados, já que o consumo do hormônio masculinizante está relacionado ao consumo de dieta. Acreditamos que o sistema de bioflocos favorece a interação das larvas com o hormônio masculinizante por mais tempo, seja pela ingestão da dieta retida no tanque de cultivo ou pelo contato tegumentar do peixe com a água (Gale, 1999), uma vez que parte do hormônio acaba sendo lixiviado (Mair, 1997) e permanece em contato com o animal devido à reduzida troca de água nesse sistema, o que contribuiria adicionalmente para a masculinização das larvas.

Alguns estudos sugerem que a MT pode não ser prejudicial ao meio ambiente (Contreras-Sánchez et al., 2001; Contreras-Sánchez et al., 2002; Green e Teichert-Coddington, 2007). Contudo, o debate permanece aberto, com trabalhos que indicam o contrário (Murray, 2016, 2016, 2017), mostrando que o descarte de água dos sistemas tradicionais pode ser danoso para a fauna do ambiente natural. A reduzida troca de água no BFT (Crab et al., 2007; De Schryver e Verstraete, 2009; Ray et al., 2010a; Crab et al., 2012; Hargreaves, 2013; Pérez-Fuentes et al., 2016; Liu et al., 2018a) pode favorecer a retenção de grande parte dos metabólitos da MT nos tanques de masculinização, de forma a prevenir potenciais prejuízos ambientais eventualmente causados pela metiltestosterona.

O sucesso na utilização do óleo de soja como veículo para a MT na dieta ofertada a larvas de tilápia do Nilo evidenciado pelos resultados de masculinização fornece mais uma opção de diluente para esse hormônio. No entanto, no cenário produtivo, o parâmetro econômico é fundamental para apoiar a tomada de decisão entre um e outro produto. O volume de óleo de soja necessário para dispersar a MT na dieta é muito inferior ao do álcool, 20 e 200 mL, respectivamente, e o primeiro possui um valor médio no mercado de 33,7% do valor do segundo. Neste contexto, o óleo de soja se torna mais viável que o álcool etílico, conferindo uma economia de 96,6% no custo referente ao veículo para a dispersão da MT na dieta.

Outro aspecto importante do manejo de masculinização baseado na utilização da MT está relacionado à segurança dos trabalhadores que fazem o preparo da dieta para as larvas. A aplicação do álcool com hormônio na dieta produz vapores que podem trazer problemas à saúde do aplicador. Pesquisas com roedores expostos a vapores de álcool apontaram lesões hepáticas, no tecido pulmonar e alterações cardiovasculares nesses animais (Mouton et al., 2016), o que pode indicar risco a seres humanos. Outros trabalhos concluíram que a inalação constante de vapores de álcool pode desencadear a dependência da substância e ainda predispor o indivíduo à dependência da nicotina (Grant et al., 2004; Falk et al., 2006). É possível que a substituição do álcool pelo óleo de soja elimine este risco ao trabalhador que se expõe por longos períodos e com frequência nas pisciculturas.

A elevada taxa de masculinização obtida tanto nos tratamentos com óleo de soja quanto com álcool permite que a escolha do diluente/veículo da MT seja tomada com base em outros benefícios, como econômicos e segurança dos trabalhadores que fazem a aplicação da solução na dieta. Além disso, foi possível concluir que o sistema de bioflocos

pode ser cogitado para o manejo de masculinização de larvas de tilápias do Nilo com uso da  $17\alpha$ -metiltestosterona na dieta, uma vez que sua aplicação não trouxe prejuízos à reversão sexual dos peixes e dado seu benefício ligado a economia de água e possibilidade de retenção dos metabólitos produzidos pelo hormônio em questão. A aplicação da metiltestosterona por 28 dias promove maior taxa de larvas masculinizadas do que a aplicação durante 21 dias, portanto, a primeira estratégia deve ser preconizada. Com relação ao desempenho, 2% de óleo de soja adicionados à dieta não promove nenhuma diferença comparada ao álcool, não configurando vantagem nesse sentido. Considerando a efetividade do óleo de soja sob vários aspectos no manejo de masculinização de larvas de tilápia, podemos recomendar o seu uso para este fim.

#### **4.4. Agradecimentos**

Agradecemos o apoio da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) para a realização desta pesquisa.

#### 4.5. Referências

Ahmad, I., Rani, B.A.M., Verma, A.K., Maqsood, M., 2017. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquac. Int.* 25, 1215–1226. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0108-8>.

Alvarenga, É.R., Alves, G.F.O., Fernandes, A.F.A., Costa, G.R., Silva, M.A., Teixeira, E.A., Turra, E.M., 2018. Moderate salinities enhance growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in the biofloc system. *Aquac. Res.* 49, 2919–2926. <https://doi.org/10.1111/are.13728>.

AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington: Association Official Analytical Chemists, 18<sup>a</sup> ed.

APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC.

Avnimelech, Y., 2009. *Biofloc Technology: A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. <https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402>.

Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>.

Bahurmiz, O.M., NG, W.K., 2007. Effects of dietary palm oil source on growth, tissue fatty acid composition and nutrient digestibility of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., raised from stocking to marketable size. *Aquaculture* 262, 382-392.

Baroiller, J.F., Fostier, A., Cauty, C., Xavier, R., Jalabert, b., 1996. Effects of high rearing temperatures on the sex ratio of progeny from sex reversed males of *Oreochromis niloticus*. *The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, p. 41.

Baroiller, J.F., Cotta, H.D., 2018. Sex control in tilapias. In: Wang, H.-P., Piferrer, F., Chen, S.-L. (Eds.), *Sex Control in Aquaculture*. John Wiley & Sons Ltd., pp. 191–234.

Baroiller, J.F., Cotta, H.D., Bezault, E., Wessels, S., Hoerstgen-Schwark, G., 2009. Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. A* 153, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>.

Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I., 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197, 283–301. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00590-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00590-7).

Beaven, U., Muposhi, V., 2012. Aspects of a monosex population of *Oreochromis niloticus* fingerlings produced using 17- $\alpha$  methyl testosterone hormone. *Aquaculture Research & Development* 3, 132. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000132>.

Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11, 87–96.

Browdy, C.L., Ray, A.J., Leffler, J.W., Avnimelech, Y., 2012. Biofloc based aquaculture systems. In: Tidwell, J.H. (Ed.), *Aquaculture Production Systems*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 278–307.

Chou, B.S., Shiau, S.Y. 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 143, 185-195.

Contreras-Sánchez, W.M., Couturier, G.M., Schreck, C.B., 2002. Fate of Methyltestosterone in the Pond Environment: Use of MT in Earthen Ponds with No Record of Hormone Usage. In: K. McElwee, K.Lewis, K., Nidiffer, M., Buitrago, P., (Editors), *Nineteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP*, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 104-106.

Contreras-Sánchez, W.M., Fitzpatrick, M.S., 2001. Fate of methyltestosterone in the pond environment: Detection of MT in pond soil from a CRSP site. In: A. Gupta, K., McElwee, D., Burke, J., Burrignt, X., Cummings, and H. Eгна (Editors). *Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/ Aquaculture CRSP*, Oregon State University, Corvallis, Oregon, p.79-82.

Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, V., 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356-357, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. *Aquaculture* 270, p.1-14.

Daudpota, A.M., Abbas, G., Kalhor, I.B., Shah, S.S.A., Kalhor, H., Hafeez-UR-Rehman, M., Ghaffar, A., 2016. Effect of feeding frequency on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) reared in low salinity water. *Pak. J. Zool.* 48, 1–16.

David-Ruales, C.A., Betancur-Gonzalez, E.M., Valbuena-Villareal, R.D., 2019. Sexual reversal with 17 $\alpha$ -Methyltestosterone in *Oreochromis* sp.: comparison between

recirculation aquaculture system (RAS) and Biofloc technology (BFT). *J. Agr. Sci. Tech-Iran* 9, 131–139. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2019.02.007>.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125-137.

De Schryver, P., Verstraete, W., 2009 Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.*, 100, 1162-1167.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2015. InfoStat Version 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.

Ekasari, J., Rivandi, D.R., Firdausi, A.P., Surawidjaja, E.H., Zairin Jr, M. Bossier, P., De Schryver, P., 2015. Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. *Aquaculture* 44, 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.019>.

El-Sayed, A.-F.M., 2006. *Tilapia Culture*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire. <https://doi.org/10.1079/9780851990149.0000>.

Falk, D.E., Yi, H.-Y., Hiller-Sturmhöfel, S., 2006. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders: findings from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Alcohol Res Health*. 29, 162-171.

Fernandes, A.F.A., Silva, M.A., Alvarenga, E.R., Teixeira, E.A., Silva Junior, A.F., Alves, G.F.O., Turra, E.M., 2015. Morphometric traits as selection criteria for carcass yield and body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) at five ages. *Aquaculture* 446, 303–309.

Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sánchez, W.M., Schreck, C.B., 2000. Fate of methyltestosterone in the pond environment: Detection of MT in soil after treatment with MT food. In: McElwee, K., Burke, D., Niles, M., Cummings, X., Egna, H. (eds.), *Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP*, Oregon State University, Corvallis, Oregon, p.109–112.

Galvez, J.I., Mazik, P.M., Phelps, R.P., Mulvaney, D.R., 1995. Masculinization of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* by Oral Administration of Trenbolone Acetate. *Journal Of The World Aquaculture Society* 26, 378 - 383. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1995.tb00832.x>

Gale, L.W., Fitzpatrick, M.S, Lucero, M., Contreras-Sánchez, W.M., Schreck, C.B., 1999. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. *Aquaculture* 178, 349-357.

Godoy, A.C., Santos, O.O., Oxford, J.H., Melo, I.W. A., Rodrigues, R.B., Neu, D., Nunes, R.V., Boscolo, W.R., 2019. Soybean oil for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in finishing diets: Economic, zootechnical and nutritional meat improvements. *Aquaculture* 512, 734324.

Grant, B.F., Stinson, F.S., Dawson, D.A., Chou, S.P., Dufour, M.C., Compton, W., Pickering, R. P., Kaplan, K., 2004. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry* 61, 807–816.

Green, B.W., Rawles, S.D., Schrader, K.K., Gaylord, T.G., McEntire, M.E., 2019a. Effects of dietary protein content on hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*) performance, common microbial off-flavor compounds, and water quality dynamics in an outdoor biofloc technology production system. *Aquaculture* 503, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.034>.

Green, B.W., Teichert-Coddington, D. R.2007. Human food safety and environmental assessment of the use of 17 $\alpha$ -methyltestosterone to produce male tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society* 31, 337–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00885.x>.

Guerrero, R.D., Guerrero, L.A., 1988. Feasibility of commercial production of Nile tilapia fingerlings in Philippines. *Proceedings of the 2 nd Symposium on Tilapia in Aquaculture*, March 16-20, 1987, International Center for Living Aquatic Resource Management, Manila, Philippines, p.183-186.

Guerrero, R.D., 1975. Use of androgens for the production of all-male *Tilapia aurea* (Steindachner). *Trans. Am. Fish. Soc.* 104, 342–348. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1975\)104<342:UOAFTP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1975)104<342:UOAFTP>2.0.CO;2).

Guerrero, R.D., Shelton, W.L., 1974. An aceto-carmines squash method for sexing juvenile fishes. *Progress. Fish Cult.* 36, 56. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1974\)36\[56:AASMFS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1974)36[56:AASMFS]2.0.CO;2).

Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc production systems for aquaculture. *SRAC* 4503, 1–12. Hines, G.A., Watts, S.A., 1995. Non-steroidal chemical sex manipulation of *Tilapia*. *J. World Aquacult. Soc.* 26, 98–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1995.tb00216.x>.

Hayashi, C., 2000. Uso de diferentes óleos vegetais em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.), na fase inicial. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia 37, 566-573. 2000.

Hiott, A.E., Phelps, R.P. 1993. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone. *Aquaculture* 112, 301- 308.

Huang, C.H., 2001. Dietary lipid supplementation affects the body fatty acid composition but not the growth of juvenile river chub, *Zacco barbata* (Regon). *Aquaculture research* 32, 1005-1010.

Hulata, G., 2001. Genetic manipulations in aquaculture, a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111, 155-173.

Jensi, A., Marx, K.K., Rajkumar, M., Shakila, R.J., Chidambaram, P., 2016. Effect of 17 $\alpha$ -methyl testosterone on sex reversal and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L., 1758). *Eco. Env. & Cons.* 22, 1493-1498.

Justi, K.C., 2003. The influence of feed supple time on the fatty acid profile of Nile tilapia. (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. *Food Chem.* 80, 489-493. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00317-5).

Khanal, N.B., Shrestha, M.K., Rai, S., Bhujel, R.C., 2014. Agriculture and Forestry University, Nepal, Asian Institute of Technology, Thailand.

Kim, K., Hur, J.W., Kim, S., Jung, J.Y., 2020. Biological wastewater treatment: Comparison of heterotrophs (BFT) with autotrophs (ABFT) in aquaculture systems. *Bioresour. Technol.* 296, 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122293>

Lim C., Webster C.D., 2001. Nutrition and Fish Health Food Products Press, New York.

Liu, W., Luo, G., Chen, W., Tan, H., 2018. Effect of no carbohydrate addition on water quality, growth performance and microbial community in water-reusing biofloc systems for tilapia production under high-density cultivation. *Aquaculture research* 49, 2446–2454. <https://doi.org/10.1111/are.13704>.

Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 448, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.017>.

Luthada, R.W., Jerling, H.L., 2013. Effect of feeding frequency and feeding rate on growth of *Oreochromis mossambicus* (Teleostei: Cichlidae) fry. *Afr. J. Aquat. Sci.* 38, 273–278. <https://doi.org/10.2989/16085914.2013.779567>

Mair, G.C., 1997. Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquaculture Research* 28, 841-845.

Manduca, L.G., Silva, M.A., Alvarenga, E.R., Alves, G.F.O., Ferreira, N.H., Teixeira, E.A., Turra, E.M., 2021. Effects of different stocking densities on Nile tilapia performance and profitability of a biofloc system with a minimum water exchange. *Aquaculture* 530, 735814. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735814>

Marjani, M., Jamili, S., Mostafavi, P.G., Ramin, M., Mashinchian, A., 2009. Influence of 17-Alpha Methyl Testosterone on Masculinization and Growth in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Fish. Aquat. Sci.*,71–74. DOI: 10.3923/jfas.2009.71.74.

Meurer, F., Hayashi, C., Rogério, W., Claudemir, B., Soares, M., 1993. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Rev. Bras. Zootec.*33, 566-573.

NRC, 2011. National Research Council. Nutrient requirements of fishes. Washington: National Academy Press.

Mouton A.J., Maxi J.K., Souza-Smith, F., Bagby, G.J., Gilpin N.W., Molina P.E., Gardner, J.D., 2016. Alcohol vapor inhalation as a model of alcohol-induced organ disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 1671–1678. <https://doi.org/10.1111/acer.13133>.

Murray, C.M., Merchant, M., Easter, M., Padilla, S., Garrigos, D.B., Marin, M.S., Guyer, C., 2017. Detection of a synthetic sex steroid in the American crocodile (*Crocodylus acutus*): Evidence for a novel environmental androgen. *Chemosphere* 180, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.020>.

Murray, C.M., Easter, M., Padilla, S., Marin, M.S., Guyer, C., 2016a. Regional warming and the thermal regimes of American crocodile nests in the Tempisque basin, Costa Rica. *Journal of Thermal Biology* 60, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.06.004>.

Murray, C.M., Easter, M., Merchant, M., Rheubert, J.L., Wilson, K.A., Cooper, A., Mendonça, M., Wibbels, T., Marin, M.S., Guyer, C., 2016a. Methyltestosterone alters sex

determination in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *General Comparative Endocrinology* 236, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.007>.

Nakandakare, I.B., Iwashita, M.K.P., Dias, D.C., Tachibana, L., Ranzani-Paiva, M.T., Romagosa, E., 2013. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias do Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol. Inst. Pesca* 39, 121-135.

Ng, W., Wang, Y., 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to brood fish fed diets with added fish oil or lin seed oil. *Aquaculture* 314, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.034>.

Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1999. Lability of sex differentiation in fish. *Currents Science* 76, 580–583.

Pandian, T.J., Varadaraj, K., 1990. Techniques to produce 100% male Tilapia. *NAGA, The ICLARM Q.* 7, 3 -5.

Pérez-Fuentes, J.A., Hernández-Vergara, M.P., Pérez-Rostro, C.I., Forgel, I., 2016. C:N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture* 452, 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.010>.

Phelps, P.R., Popma, J.T., 2000. Sex reversal of tilapia. *Tilapia Aquaculture in the Americas. J. World Aquacult. Soc.* 2, 34 - 59.

Popma, T.J., Green, B.W., 1990. Sex Reversal of Tilapia in Earthen Ponds: *Aquacultural Production Manual. Research and Development Series No. 35*, Auburn University, Auburn, AL, USA, 15 pp.

Rakocy, J.E., Bailey, D.S., Thoman, E.S., Shultz, R.C., 2004. Intensive tank culture of tilapia with a suspended, bacterial-based, treatment process. New dimensions on farmed tilapia. In: Bolivar, R., Mair, G., Fitzsimmons, K. (Eds.), *Proceedings of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Manila, Philippines, pp. 584 -598.

Ray, A. J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C. L., 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*, 310, 130–138,. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019>.

Ruales, C.A.D., Gonzalez, E.M.B., Villareal, R.D.V., 2019. Sexual Reversal with 17 $\alpha$ -Methyltestosterone in *Oreochromis* sp.: Comparison between Recirculation

Aquaculture System (RAS) and Biofloc Technology (BFT). *Journal of Agricultural Science and Technology A* 9, 131–139. DOI: 10.17265/2161-6256/2019.02.007

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. URL <https://www.R-project.org/>.

Santiago, C.B., Reyes, O.S., 1993. Effects of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. *J. Appl. Ichthyol.*, 9, 33–40. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1993.tb00385.x>

Silva, M.A., Alvarenga, É.R., Costa, F.F.B., Turra, E.M., Alves, G.F.O. Manduca, L.G., Sales, S.C.M., Leite, N.R., Bezerra, V.M., Moraes, S.G.S., Teixeira, E.A., 2019. Feeding management strategies to optimize the use of suspended feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in bioflocs. *Aquaculture Research*. 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/are.14408>.

Silva, R.Z.C., Alvarenga, É.R., Matta, S.V., Alves, G.F.O., Manduca, L.G., Silva, M.A., Yoshinaga, T.T., Fernandes, A.F.A., Turra, E.M., 2022. Masculinization protocol for Nile tilapia (*O. niloticus*) in Biofloc technology using 17 $\alpha$ -methyltestosterone in the diet. *Aquaculture* 547, 737470. Erro! A referência de hiperlink não é válida.

Silva, S.S., Gunasekera, R.M., Shim, K.F., 1991. Interactions of varying dietary protein and lipid levels in young red tilapia: Evidence of protein sparing. *Aquaculture* 95, 305-318. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90096-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90096-P).

Singh, E., Saini, V.P., Sharma, O.P., 2018. Sex Reversal In Red Tilapia (*Oreochromis Spp.*) Fry By Immersion Technique. *International Journal Of Fauna And Biological Studies* 5, 34-36.

Stickney, R.R., Wurtz, W.A., 1986. Growth response of blue tilapias to selected levels of dietary menhaden and catfish oils. *The Progressive Fish-Culturist* 48, 107–109. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1986\)48<107:GROBTT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1986)48<107:GROBTT>2.0.CO;2).

Stickney, R.R., Mcgeachin, R.B. Effects of dietary lipid quality on growth and food conversion of tilápia. 1983. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Fish Wildl. Agencies*, Washington, DC., 37, 352–357.

Tachibana, L., Castagnolli, N., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Valle, J.B., Siqueira, M.R., 2004. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*O.niloticus*) na fase de reversão sexual., *Acta Scientiarum* 26, 305–311.

Tayamen, M.M., Shelton, W.L., 1978. Inducement of sex reversal in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture* 14, 349–354. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90017-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90017-0).

Turra, E.M., Fernandes, A.F.A., Alvarenga, E.R., Alves, G.F.O., Manduca, L.G., Teixeira, E.A., Silva, M.A., 2018. Longitudinal analyses of correlated response efficiencies of fillet traits in Nile tilapia. *Animal* 12, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001768>.

Turra, E.M., Oliveira, D.A.A., Valente, B.D., Teixeira, E.A., Prado, S.A., Melo, D.C., Silva, M.A., 2012a. Estimation of genetic parameters for body weights of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using random regression models. *Aquaculture* 354, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.035>.

Turra, E.M., Oliveira, D.A.A., Valente, B.D., Teixeira, E.A., Prado, S.A., Alvarenga, E.R., Silva, M.A., 2012b. Longitudinal genetic analyses of fillet traits in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 356–357, 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.039>.

Turra, E.M., Toral, F.B., Alvarenga, E.R., Raidan, F.S.S., Fernandes, A.F.A., Alves, G.F.O., Silva, M.A., 2016. Genotype×Environment Interaction For Growth Traits Of Nile Tilapia In Biofloc Technology, Recirculating Water And Cage Systems. *Aquaculture* 460, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.020>.

UNESCO., 1983. Chemical Methods for use in Marine Environmental Monitoring. Manual and Guides 12. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission. 56p.

Vidal, L.V.O., Albinati, R.C.B., Albinati, A.C.L., Lira, A.D., Almeida, T.R., Santos, G.B., 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-Nilo. *Pesq. agropec. Bras* 43, 1069–1074.

Wedemeyer, G., 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. New York: Springer, Chapman & Hall, p.249.

Wilson, R.P., 1998. State of art of warm water fish nutrition. In: AQUICULTURA BRASIL'98, 1, 1998, Recife. Anais... Recife: SIMBRAQ, 1998, p.375–380.

Xie D., Liping Y., Ruomeng Y., Fang C., Ronghua L., Chaobin Q., Guoxing N., 2017. Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 479, 696-703, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.01>.

**Tabela 1.** Variáveis de qualidade da água (média ou mediana) e seu coeficiente de variação (CV) ou máximo ou mínimo de sistema de bioflocos e água clara durante a aplicação de diferentes estratégias de manejo para masculinização de larvas de tilápia do Nilo em diferentes períodos de avaliação. Os animais de todos os tratamentos destinados à segunda análise ficaram em tanque com água clara. BFT- Tecnologia de bioflocos, CW- Água Clara, HO – hormônio diluído em óleo, HA+O – hormônio diluído em álcool e subsequente adição de óleo, HA – hormônio diluído em álcool.

	1ª análise					2ª análise				3ª análise				CV		
	CW	BFT			CV	CW	BFT			CW	BFT					
	HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA	HO	HO	HA+O	HA			
<b>T (°C)</b>	27.2	27.1	27.2	26.9	ns*	1.23		28.4			28.4	28.8	28.8	28.6	ns*	0.7
<b>T (8 am)</b>	26.0	26.0	26.0	25.6	NS	1.60		28.1			28.0	28.4	28.4	28.2	NS	1.0
Min-max	25.7-26.3	25.6-26.4	25.7-26.3	24.3-26.0							27.7-28.5	28.2-28.8	28.2-28.8	27.9-28.7		
<b>T (4 pm)</b>	28.4	28.3	28.4	28.2	ns*	1.18		28.7			28.9	29.3	29.3	29.2	ns*	0.5
<b>DO (mg L<sup>-1</sup>)</b>	6.2	6.1	6.1	6.1	ns*	3.27		5.1			6.5	6.3	6.2	6.3	ns*	5.1
<b>DO (8m)</b>	6.6	6.4	6.4	6.4	ns*	2.63		5.2			6.3	6.1	6.2	6.1	NS	5.1
Min-max											5.8-6.6	5.2-6.3	5.2-6.3	5.4-6.4		
<b>DO (4 pm)</b>	5.9	5.8	5.7	5.8	ns*	4.09		5.0			6.1	5.7	5.7	5.8	ns*	5.3
<b>pH</b>	7.2 <sup>B</sup>	7.0 <sup>AB</sup>	7.0 <sup>A</sup>	7.0 <sup>A</sup>		1.22		6.8			6.3	6.3	6.2	6.3	NS	7.5
Min-max											5.8-7.0	5.8-7.0	5.7-7.0	5.7-7.0		
<b>pH (8 am)*</b>	7.2 <sup>b</sup>	7.0 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>		1.00		6.6			6.2	6.2	6.2	6.2	NS	5.3
Min-max											5.9-7.1	5.9-7.1	5.8-7.1	5.8-7.1		
<b>pH (4 pm)</b>	7.3 <sup>B</sup>	7.0 <sup>A</sup>	7.0 <sup>A</sup>	7.0 <sup>A</sup>		1.44		6.8			6.4	6.4	6.3	6.3	NS	8.6
Min-max											5.6-7.1	5.6-7.1	5.6-7.0	5.5-7.0		

**Valores de referência:** T (°C): 27-32 (El-Sayed, 2006); OD: > 4 and pH: 6-9 (Wedemeyer, 1996)

Valores são médias ou medianas de cinco repetições para cada tratamento. Medianas com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey (\*)  $p < 0.05$ . Medianas seguidas por NS no final da linha não diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ). Médias com ns\* no final da linha não diferem pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey  $p > 0.05$ . T- Temperatura, DO - oxigênio dissolvido.

**Tabela 2.** Variáveis de qualidade (média ou mediana) e seu coeficiente de variação (CV) ou máximo ou mínimo de sistema de bioflocos e água clara durante a aplicação de diferentes estratégias de manejo para masculinização de larvas de tilápia do Nilo em diferentes períodos de avaliação. Os animais de todos os tratamentos destinados à segunda análise ficaram em tanque com água clara. BFT- Tecnologia de bioflocos, CW- Água Clara, HO - Hormônio diluído em óleo, HA + O - Hormônio diluído em álcool e posterior adição de óleo, HA - Hormônio diluído em álcool.

	1ª análise					2ª análise				3ª análise				CV	
	CW	BFT			CV	CW	BFT			CW	BFT				
	HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA	HO	HO	HA+O	HA		
<b>ALC (mg of CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)**</b> Min-max	101.9 <sup>b</sup>	58.7 <sup>a</sup>	54.1 <sup>a</sup>	69.1 <sup>a</sup>	14.8		-			19.3	24.5	21.1	18.4	NS	49.2
										14.0-24.4	13.8-38.8	10.6-46.3	13.1-32.5		
<b>SS (ml L<sup>-1</sup>)***</b> Min-max	0.8 <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup>	2.8 <sup>b</sup>	45.4		-			22.9	23.0	27.4	25.0	NS	86.0
										4.4-52	4.6-47	5.4-59	6.2-63		
<b>Sal. (g L<sup>-1</sup>)</b> Min-max	2.2	2.4	2.4	2.4	NS	3.1		0.87		1.7	1.8	1.8	1.8	NS	60.6
	2.2-2.4	2.4-2.4	2.4-2.6	2.4-2.6						1.6-1.7	1.6-1.9	1.6-1.8	1.5-1.9		
<b>N-AT (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.73	0.72	0.68	0.68	ns***	20.4		0.94		1.4	1.3	1.3	1.5	ns***	46.8
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	1.74 <sup>A</sup>	7.06 <sup>B</sup>	7.02 <sup>B</sup>	6.82 <sup>B</sup>		51.0		0.73		0.4	0.68	0.44	0.47	ns***	62.9

**Ref.:** Alcalinidade: > 50<sup>III</sup>, Sólidos Suspensos: <100<sup>III</sup>, Salinidade:1-8<sup>IV</sup>, TAN:< 1<sup>I</sup>, NH<sub>3</sub>: < 100<sup>I</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: < 8<sup>I</sup>

<sup>I</sup>El-Sayed (2006). <sup>II</sup>Wedemeyer (1996). <sup>III</sup>Avnimelech (2009). <sup>IV</sup>Alvarenga et al. (2018)

Valores são médias ou medianas de cinco repetições para cada tratamento.

Medianas com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (p<0.05). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey (\*), Student-Newman-Keuls (\*\*\*) ou Duncan (\*\*\*), p<0.05. Medianas seguidas por NS no final da linha não diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (p>0.05). Médias com ns\*- ns\*\* ou ns\*\*\* no final da linha não diferem pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey, Student-Newman-Keuls ou Duncan, respectivamente, p>0.05. ALC - Alcalinidade, N- AT- Nitrogênio amoniacal total, SS- Sólidos sedimentáveis, NH<sub>3</sub> - Amônia não ionizada, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Nitrito.

**Tabela 3.** Variáveis de desempenho (média ou mediana) e seu coeficiente de variação (CV) ou máximo ou mínimo de tilápias do Nilo após aplicação de diferentes estratégias de manejo e período de masculinização. Os animais de todos os tratamentos destinados à segunda análise ficaram em tanque com água clara. BFT- Tecnologia de bioflocos, CW- Água Clara, HO - Hormônio diluído em óleo, HA + O - Hormônio diluído em álcool e posterior adição de óleo, HA - Hormônio diluído em álcool.

	1ª análise						2ª análise					3ª análise						
	CW	BFT			CV	CW	BFT			CV	CW	BFT			CV			
	HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA				
<b>FS (%)</b> Min-max	74.3	76.0	80.8	77.8	NS	26.6	51.6 16.7-76.7	62.0 58.3-66.7	63.0 51.7-75.0	69.3 63.3-73.3	NS	20.1	70.3	75.6	66.6	63.3	ns***	26.6
<b>SD (g L<sup>-1</sup>)</b>	2.10	2.18	2.06	1.54	ns***	27.1	13.22	16.26	16.60	16.90	ns***	19.2	9.69	9.64	9.12	8.78	ns*	21.8
<b>FW(g)</b> Min-max	1.06	0.90	0.99	0.71	NS	23.0	44.8 35.4-54.8	43.7 36.7-49.6	44.1 39.2-49.2	40.7 39.4-42.1	NS	11.6	37.1	32.2	34.7	35.6	ns***	20.4
<b>Length (cm)</b>	12.6	12.5	12.7	12.2	ns*	3.33	3.6	3.6	3.6	3.2	ns*	8.33						
<b>FWG (g)</b>	0.95	0.92	0.91	0.69	ns***	23.1	43.8	42.7	43.2	40.0	ns**	12.0	36.2	31.3	33.8	34.9	ns***	21.0

Valores são médias ou medianas de cinco repetições para cada tratamento.

Medianas seguidas por **NS** no final da linha não diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ). Médias com **ns\***- **ns\*\*** ou **ns\*\*\*** no final da linha não diferem pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey, Student-Newman-Keuls ou Duncan, respectivamente,  $p > 0.05$ .

Sobrevivência (FS), densidade de estocagem (SD), peso final (FW) e ganho de peso final (FWG)

**Tabela 4.** Composição corporal (média ou mediana) e seu coeficiente de variação (CV) ou máximo ou mínimo de larvas e juvenis de tilápias do Nilo após aplicação de diferentes estratégias de manejo e períodos masculinização. Os animais de todos os tratamentos destinados à segunda análise ficaram em tanque com água clara. BFT- Tecnologia de bioflocos, CW- Água Clara, HO - Hormônio diluído em óleo, HA + O - Hormônio diluído em álcool e posterior adição de óleo, HA - Hormônio diluído em álcool.

	1ª análise					2ª análise					3ª análise						
	CW	BFT			CV	CW	BFT			CV	CW	BFT			CV		
	HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA			
<b>MS(% )</b>	-	-	-	-	-	70.1	69.3	69.5	69.5	ns	1.8	70.60	70.7	70.2	70.1	ns	2.1
<b>PB(% Min-max</b>	56.7 52.2-58.7	55.7 54-56.7	57.6 56.4-58.8	58.4 53.9-61.5	NS 4.4	51.0 48.2-55	51.68 48.1-54.8	50.6 50.6-51.7	52.8 46.5-55.7	NS 5.3	51.07	53.4	52.5	51.2	ns	4.9	
<b>EE(% Min-max</b>	32.2	33.7	32.1	31.1	ns 4.5	35.3 34.6-36.4	35.2 33.1-36.3	36.1 32.5-39.9	34.6 33.6-35.7	NS 4.9	33.49 31.42-36.26	33.3 31.7-35.9	33.2 29.9-39.0	35.5 22.3-39.7	NS 7.6		
<b>Cinzas (%) Min-max</b>	16.3	16.0	16.3	16.7	ns 4.8	13.4 12.0-14.3	13.3 11.7-14.0	13.0 11.7-13.7	14.0 13.2-14.6	NS 6.5	14.19	13.8	13.3	13.1	ns 7.6		

Valores são médias ou medianas de cinco repetições para cada tratamento.

Médias com **ns** no final da linha não diferem de acordo com ANOVA e o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Medianas com **NS** no final da linha não diferem de acordo com o teste Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). MS - Matéria seca, PB - Proteína bruta, EE - extrato etéreo, Cinzas.

**Tabela 5.** Proporção de tilápias do Nilo masculinizadas após aplicação de diferentes estratégias de manejo e período de masculinização. BFT- Tecnologia de bioflocos, CW- Água Clara, HO - Hormônio diluído em óleo, HA + O - Hormônio diluído em álcool e posterior adição de óleo, HA - Hormônio diluído em álcool.

	21DIAS					28 DIAS				
	<u>CW</u>	<u>BFT</u>			CV	<u>CW</u>	<u>BFT</u>			CV
	HO	HO	HA+O	HA		HO	HO	HA+O	HA	
<b>Analísados</b>	140	167	166	200		251	243	251	251	
<b>Machos (%)</b>	89,44	86,74	80,94	93,60	NS 9,69	100	100	94	100	4.31
Min-Max						96-100 <sup>A</sup>	96-100 <sup>A</sup>	79-98 <sup>B</sup>	98-100 <sup>AB</sup>	
<b>Machos(n)</b>	122	145	137	187		249	239	231	249	
<b>Fêmeas(n)</b>	14	16	18	6		0	2	2	0	

Valores são médias ou medianas de cinco repetições para cada tratamento.

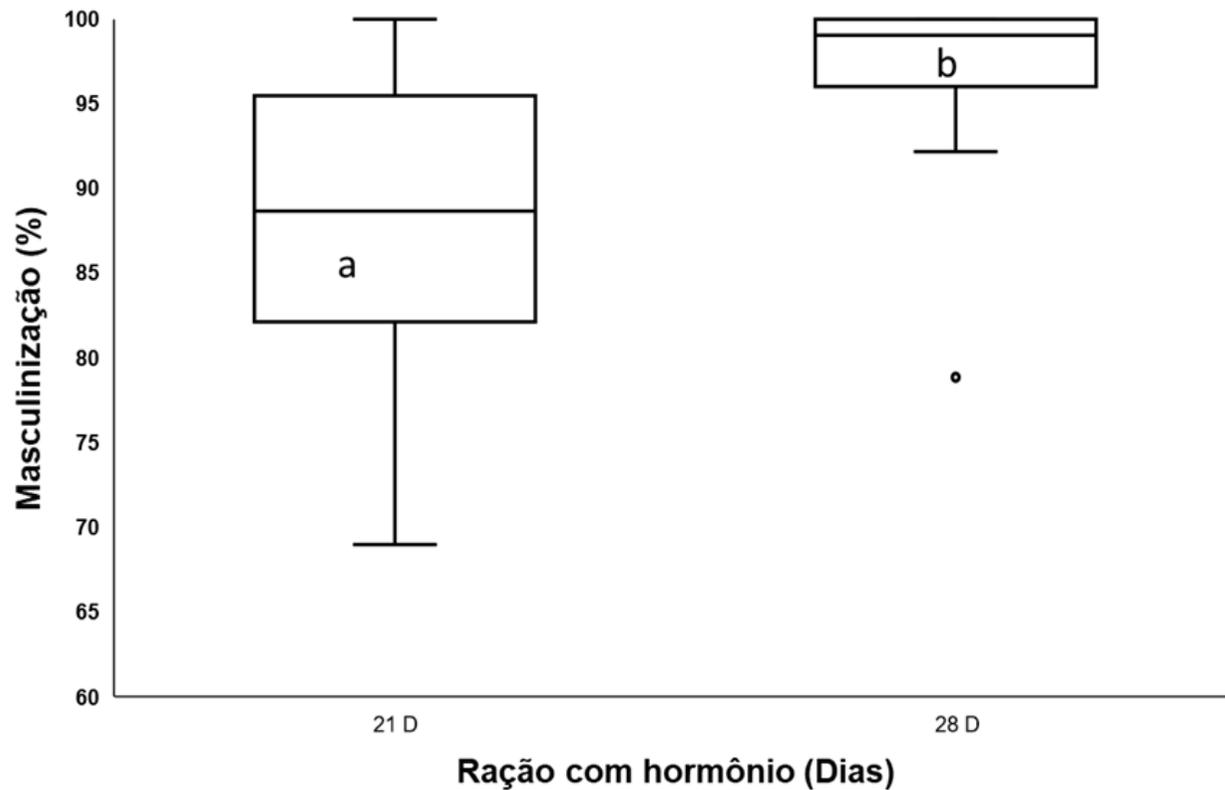
Médias seguidas por **ns** não diferem de acordo com ANOVA e o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Medianas com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 6.** Resultados de masculinização de larvas de tilápias alimentadas com hormônio masculinizante 17 $\alpha$ -metiltestosterona via dieta.

<b>Espécie</b>	<b>MT (mg kg<sup>-1</sup> de dieta)</b>	<b>TA (dias)</b>	<b>% machos</b>	<b>Refêrencia</b>
<i>Oreochromis</i> sp	60	112	90	Zaki (2021)
<i>Oreochromis niloticus</i>	60	28	94,28	Ferdous e Ali (2011)
<i>Sarotherodon niloticus</i>	60	28	100	Tayamen e Shelton (1978)
<i>Oreochromis niloticus</i>	60	28	95,7	Hiott e Phelps (1993)
<i>Oreochromis niloticus</i>	30	21	99	Guerrero e Guerrero (1988)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	60	18	98	Guerrero (1975)

MT (17 $\alpha$ -metiltestosterona); TA (Tempo de Aplicação)



**Figura 2.** Masculinização de larvas de tilápia do Nilo alimentadas com hormônio masculinizante  $17\alpha$ -metiltestosterona via ração durante 21 e 28 dias. O grupo alimentado 21 dias (21 D) apresentou pontos de mínimo e máximo de 69 e 100% de masculinização, respectivamente. Enquanto o grupo 28 dias (28 D) apresentou pontos de mínimo e máximo de 79 e 100% de masculinização, respectivamente. Medianas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

