

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Os efeitos da mudança climática e dos microplásticos na
fisiologia dos animais de cultivo

Andressa Cristina Ramaglia da Mota

Jaboticabal,
São Paulo 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Os efeitos da mudança climática e dos microplásticos na fisiologia
dos animais de cultivo

Andressa Cristina Ramaglia da Mota

Orientadora: Alessandra da Silva Augusto

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Aquicultura do Centro de
Aquicultura da UNESP- CAUNESP,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal,
São Paulo 2023

M917e

Mota, Andressa Cristina Ramaglia da

O efeito das mudanças climáticas e dos microplásticos na fisiologia de invertebrados marinhos de interesse econômico/ Andressa Cristina Ramaglia da Mota. -- Jaboticabal, 2023

100 p.: il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2023

Orientadora: Alessanda da Silva Augusto

Banca examinadora: Denis Moledode Souza Abessa, Mariana Velloso Capparelli, Tânia Marcia Costa, Viviane Prodócimo

Bibliografia

1. Fisiologia. 2. Mudança Climática. 3. Microplástico. 4. *Penaeus vannamei*. 5. Invertebrados. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.043

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: O efeito das mudanças climáticas e dos microplásticos na fisiologia de invertebrados marinhos de interesse econômico

AUTORA: ANDRESSA CRISTINA RAMAGLIA DA MOTA

ORIENTADORA: ALESSANDRA DA SILVA AUGUSTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



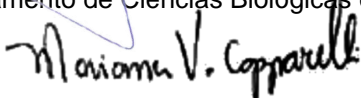
Profa. Dra. ALESSANDRA DA SILVA AUGUSTO (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / IB/Unesp, São Vicente-SP



Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / IB/Unesp, São Vicente-SP



Profa. Dra. TÂNIA MARCIA COSTA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / IB/Unesp, São Vicente-SP



Profa. Dra. MARIANA VELLOSA CAPPARELLI (Participação Virtual)
Estación de Investigaciones Marinas El Carmen / Instituto De Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México



Profa. Dra. VIVIANE PRODOCIMO (Participação Virtual)
Setor de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba-PR

Jaboticabal, 01 de setembro de 2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Armando Isaias Ferreira da Mota e Ana Teresa Francisca Ramaglia da Mota. Aos meus irmãos, André Vinícius Ramaglia da Mota e Ana Júlia Ramaglia da Mota. Às minhas avós Thereza Silva Ramaglia e Isabel Maria Mota Ferreira (in memorian).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a nossa Senhora que me acompanharam passo a passo desta minha trajetória, estando comigo diante todas as dificuldades e desafios encontrados nesse projeto.

Aos meus pais Ana Teresa Francisca Ramaglia da Mota e Armando Isaias Ferreira da Mota que são os responsáveis por me tornar o que sou hoje em dia, sempre me ensinando a ser uma mulher forte, digna e muito honrosa. Aos meus irmãos por fazeres parte de mim e sempre estarem juntos.

Agradeço a todos os meus professores e mestres que passaram em minha vida, e me mostraram os caminhos que devia seguir. Em especial a professora Alessandra Augusto que acompanhou minha caminhada acadêmica desde a minha iniciação científica, e pelos imensuráveis ensinamentos sobre ciências, fisiologia, divulgação e redação científica, mas também sobre responsabilidade e comprometimento.

Agradeço aos meus amigos e parceiros do Laboratório de Aquicultura Sustentável que me acompanharam nessa árdua jornada, me apoiando e ajudando em todas as etapas e processos. Ana Carolina Louzã, Caterina do Valle Trota, Douglas Tenório, Emanuelle Pereira Borges, Helen Siqueira Leite, Juliana Rodrigues da Costa, Lucilly Santos e Matheus Araújo.

Agradeço ao Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista, por esses 12 anos de caminhada e acolhimento, sempre me sentindo muito querida. Agradeço a todos os funcionários que sempre foram muito solícitos durante esses anos, em especial as técnicas de laboratório Claudia, Luciana, Márcia e Wagner; aos funcionários que me auxiliavam no agendamento das coletas, Allan e Átila; as queridas e amadas tias da limpeza Nice, Maria e Nena; ao seu Itamar que me ajudava no conserto dos materiais, a Conceição que sempre fazia das idas à biblioteca uma grande alegria. Agradeço também ao Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal (Labecom) (em especial: Alexandre Avirgo, Caio Myai,

Fernando deGrande), e a professora Tânia Márcia Costa, por me ajudarem e emprestarem equipamentos e conhecimentos sempre que precisava.

Agradeço ao Laboratório de Carcinicultura do Caunesp, e todos os seus integrantes pela colaboração, pela amizade e acolhida todas as vezes que precisei ir ao setor e aos professores Wagner Cotroni Valente e Patrícia Valente que foram fundamentais para que hoje eu conseguisse entregar essa tese. Agradeço também ao Laboratório do professor John Mcnamara, na USP-ribeirão pela colaboração nas leituras de osmolalidade.

Agradeço ao funcionarios da Nautica Cortamar, ao Ricardo e seu Yu.

Por fim agradeço imensamente aos meus amigos, que muitas vezes são a base para que possamos aguentar firme todos os nossos desafios. Caroline Fabri, Cecilia Camargo, Fernanda Custódio, Júlia Gonçalves, Ligia Modenesi, Michelle Batista, Nicholas Kriegler.

Muito obrigada, a todos! Sem vocês eu não estaria aqui hoje.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

E com o apoio do Projeto Horizon H2020

Sumário

DEDICATÓRIA -----	iii
AGRADECIMENTOS -----	iv
APOIO FINANCEIRO -----	vi
ABSTRACT -----	16
INTRODUÇÃO-----	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	22
CAPÍTULO 2 -----	28
O balanço energético como uma ferramenta para avaliar os efeitos combinados entre a acidificação oceânica e a variação de salinidade em <i>Penaeus vannamei</i> , o camarão-branco-do-pacífico-----	28
RESUMO-----	30
ABSTRACT-----	30
1. INTRODUÇÃO-----	31
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	33
2.1 OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS NO LABORATÓRIO-----	33
2.2 EXPOSIÇÃO DE ANIMAIS A DIFERENTES pHs E SALINIDADES --	34
2.3 AVALIAÇÃO DO ORÇAMENTO ENERGÉTICO -----	35
2.3.1 Ingestão (C) e taxa de egestão (F)-----	35
2.3.2 Crescimento (P) -----	36
2.3.3 Exuvia (E) -----	36
2.3.4 Metabolismo (R), excreção de amônia (U) e relação O: N-----	36

2.4	AVALIAÇÃO DO ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (HSI)-----	37
2.5	AVALIAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO -----	38
2.6	AVALIAÇÃO DA OSMOLALIDADE E CAPACIDADE OSMORREGULATÓRIA DA HEMOLINFA -----	38
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	38
3.	RESULTADOS -----	39
3.1	CONTEÚDO ENERGÉTICO DA RAÇÃO ANIMAL, CORPO E FEZES 39	
3.2	INGESTÃO, EGESTÃO, CRESCIMENTO, ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO, O: N-----	41
3.3	CONSUMO DE OXIGÊNIO, EXCREÇÃO DE AMÔNIA, SUBSTRATO ENERGÉTICO E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO -----	44
3.4	CAPACIDADE OSMORREGULATÓRIA -----	46
3.5	BALANÇO ENERGÉTICO-----	46
4.	DISCUSSÃO -----	47
	A interação entre variação de salinidade e acidificação oceânica na taxa de ingestão-----	48
	Os Efeitos da salinidade na fisiologia de <i>P. vannamei</i> -----	48
	Os Efeitos da acidificação oceânica na fisiologia de <i>P. vannamei</i> -----	51
	ACKNOWLEDGEMENTS-----	53
	FUNDING -----	53
	DECLARATIONS -----	53
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA -----	53

CAPÍTULO 3 -----	61
Os efeitos dos microplásticos na fisiologia de invertebrados mantidos em diferentes salinidades-----	61
RESUMO-----	63
ABSTRACT-----	64
5. INTRODUÇÃO-----	65
2. MATÉRIAS E MÉTODOS -----	71
2.1 COLETAS DOS ANIMAIS -----	71
2.2 EXPOSIÇÃO AO MICROPLÁSTICO-----	73
2.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO, EXCREÇÃO DE AMÔNIA ESUBSTRATO ENERGÉTICO OXIDADO (O: N)-----	75
2.4 AVALIAÇÃO DA OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA -----	77
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS-----	77
3. RESULTADOS -----	77
3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA E CAPACIDADE OSMORREGULADORA (CO)-----	77
3.2 CONSUMO DE OXIGÊNIO -----	80
3.3 EXCREÇÃO DE AMÔNIA -----	83
3.4 TIPO DE SUBSTRATO ENERGÉTICO OXIDADO-----	86
4. DISCUSSÃO-----	88
EXCREÇÃO DE AMÔNIA -----	91
5. CONCLUSÃO -----	94
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	94

CAPÍTULO 1-

INTRODUÇÃO GERAL

Os efeitos da mudança climática e dos microplásticos na fisiologia dos animais de cultivo

RESUMO

A aquicultura é altamente dependente do clima e, portanto, a mudança climática é uma ameaça para a produção global de alimentos. Simultaneamente à mudança climática as zonas costeiras sofrem outras pressões antrópicas como poluição, construção de portos, industrialização, atividades recreativas, dentre outras atividades. Nesse contexto, os plásticos representam cerca de 90% do lixo marinho. A mudança climática e a poluição por microplásticos são uma ameaça ambiental global e podem gerar danos e prejuízos à biodiversidade e à aquicultura. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar por meio de duas abordagens uma malha de processos fisiológicos de crustáceos e moluscos de interesse econômico, expostos à acidificação oceânica e alterações de salinidade previstas pelo IPCC, bem como ao microplástico, um contaminante emergente. Na primeira abordagem utilizamos do balanço energético como uma ferramenta para avaliar os efeitos da acidificação oceânica e das variações de salinidade em *Penaeus vannamei*. O balanço energético descreve como a energia ingerida é canalizada para os processos fisiológicos e se mostrou uma boa ferramenta para a compreensão do fluxo de energia em espécies sujeitas a alterações climáticas. A segunda abordagem foi investigar os efeitos do microplástico na fisiologia de moluscos e crustáceos marinhos e/ou estuarinos mantidos nas salinidades em que são encontrados na natureza. Em geral, nossos resultados mostram que a combinação dos fatores causa alterações importantes nos parâmetros fisiológicos, como metabolismo, excreção de amônia, osmorregulação, entre outros avaliados e nos atenta ainda mais a necessidade de medidas mitigatórias para que os organismos e a sociedade consigam se adaptar a esses novos desafios

Palavras-chaves: acidificação oceânica, salinidade, aquicultura, microplástico, balanço energético, metabolismo, osmorregulação.

ABSTRACT

Aquaculture is highly dependent on the climate and, therefore, climate change is a threat to global food production. Simultaneously with climate change, coastal zones suffer from other anthropogenic pressures such as pollution, construction of ports, industrialization, recreational activities. In this context, plastics account for about 90% of marine litter. Thus, climate change and microplastic pollution are a global environmental threat and can cause damage to biodiversity and aquaculture. Thus, the present study aims to evaluate, through two approaches, a mesh of physiological processes of crustaceans and molluscs of economic interest, exposed to ocean acidification and changes in salinity predicted by the IPCC, as well as to microplastics, an emerging contaminant. In the first approach we used the energy balance as a tool to evaluate the effects of ocean acidification and salinity variations in *Penaeus vannamei*. The energy balance describes how ingested energy is channeled to physiological processes and has proved to be a good tool for understanding the flow of energy in species subject to climate change. The second approach was to investigate the effects of microplastic on the physiology of marine or estuarine molluscs and crustaceans kept at the salinities in which they are found in nature. In general, our results show that the synergy of the factors causes important changes in the evaluated physiological parameters and highlights the need for mitigation measures so that organisms and society can adapt to these new challenges.

Key words: ocean acidification, salinity, aquaculture, pollution, energy balance, metabolism, osmoregulation.

INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte de um projeto da União Europeia, denominado Horizon 2020/Aquavita. Trata-se de um programa de pesquisa e inovação para investigar novas espécies, processos e produtos que contribuam para aumentar a produção e melhorar a sustentabilidade da aquicultura no Atlântico. Nesse sentido, um dos objetivos do Horizon/2020 é avaliar os efeitos ações antrópicas, como mudança climática e poluição, na biologia das espécies com potencial para a aquicultura no Atlântico. Nessa tese foi avaliada uma malha de processos fisiológicos (balanço energético, osmorregulação, metabolismo, excreção nitrogenada e tipo de substrato energético oxidado) de crustáceos e moluscos de interesse econômico no Brasil e/ou no mundo expostos em laboratório à acidificação oceânica e alterações de salinidade previstas pelo IPCC (2018), bem como ao microplástico, um contaminante emergente.

Desde 1990 a produção a aquicultura vem crescendo de forma exponencial, tornando-se o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo (Ahmed et al., 2019; FAO, 2020) e sendo frequentemente elencada como uma solução para atender às crescentes demandas por alimentos deste século (Béné et al., 2016). Segundo dados da FAO (2022), a participação da aquicultura na produção global de pescados passará dos atuais 49% para 53% em 2030. No Brasil a produção de pescado oriundo da aquicultura se equiparou com o da pesca em 2018 (Valente et al., 2021). Apesar desse crescimento, existe o desafio de fornecer proteína de qualidade para cerca de oito bilhões de pessoas em um planeta em processos de mudança climática e com elevados níveis de poluição.

A aquicultura é altamente dependente do clima e, portanto, a mudança climática é uma ameaça para a produção global de alimentos (Myers et al., 2017; Ahmed et al., 2019). A partir dessa perspectiva, a aquicultura ganha atenção acadêmica significativa, sendo incluída nos últimos relatórios do IPCC (IPCC, 2018; 2022) e o relatório de terras do IPCC (IPCC, 2022). Tais relatórios indicam que o aquecimento, a acidificação dos oceanos, alterações na precipitação, elevação do nível do mar e aumento na frequência de eventos extremos

causarão efeitos adversos na produção de alimentos da aquicultura e pesca, colocando em risco a segurança alimentar global (IPCC 2022).

As mudanças climáticas estão relacionadas ao aumento da liberação de gases de efeito estufa (GEE), como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O) na atmosfera, associado à queima de combustíveis fósseis e outras causas antropogênicas (Hall- Spencer and Harvey, 2019; Mikhaylov et al., 2020). Como consequência o ambiente marinho tem experimentado várias mudanças, incluindo acidificação, aumentos dos extremos de temperatura, aumento do nível do mar, aumento das inundações, intrusão de água salgada em regiões de água doce e salobra, perda da cobertura de geleiras e um aumento na gravidade e frequência de tempestades (Chance, 2019; Cesana et al., 2021; IPCC, 2022). Espera-se que os efeitos das mudanças climáticas na produção aquícola sejam diretos ou indiretos (Reid et al., 2019; Maulu et al., 2021). Os efeitos diretos influenciam a física, a fisiologia e o comportamento dos estoques de peixes, moluscos e crustáceos nos sistemas de produção (Reid et al., 2019; Froehlich et al., 2022). Já os efeitos indiretos podem ser desde alterações da produtividade primária e secundária e/ou da estrutura dos ecossistemas, até diminuição nos suprimentos e insumos essenciais para o cultivo como: farinha e óleo de peixe (Adhikari et al., 2018; Khatri-Chhetri et al., 2020 Maulu et al., 2021). Essas alterações podem aumentar os custos da produção e dos serviços necessários aos produtores.

Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado os efeitos da mudança climática na biologia de espécies aquáticas (Ramaglia et al., 2018; Strefezza, et al., 2019; Vianna et al., 2019; Spencer and Harvey, 2019; Vargas et al., 2022). Na base de dados da Web of Science é possível encontrar mais de 5000 artigos relacionados ao tema. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que avaliam a combinação dos efeitos dos estressores climáticos, de acordo com as alterações previstas pelos relatórios do IPCC. Essa avaliação é fundamental porque a exposição simultânea pode produzir respostas mais reais e totalmente diferentes devido a interações entre os estressores (Tripp et al., 2022).

Dentre essas alterações a acidificação oceânica e as variações de salinidade merecem destaque. A escala de pH é definida como logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio. Isso faz com que pequenas

mudanças no pH signifiquem grandes mudanças na acidez. Desde o início da era industrial, o pH médio global da água do mar diminuiu de 8,2 para 8,1, correspondendo a um aumento de 30% na acidez (Caldeira and Wickett, 2003; Jiang et al., 2019; Kwiatkowski et al., 2020). Estima-se que a redução do pH oceânico diminua 0,4 unidades até 2100 e até 0,77 unidades até 2300, isso corresponderia a um aumento de mais de 150% na acidez da água do mar (Newton et al., 2015; Hartin et al., 2016; Findlay and Turley, 2021). O oceano absorve cerca de um terço do CO₂ atmosférico, o que resulta em alterações na química da água, e diminuição do pH e redução na disponibilidade de carbonato de cálcio para os organismos marinhos (IPCC, 2022). Os efeitos da acidificação oceânica geram respostas variadas nos organismos. Enquanto algumas espécies parecem se adaptar bem, outras apresentam aumento da mortalidade, alterações no crescimento, metabolismo, processos osmorregulatórios, comportamento, imunidade, entre outros (Ramaglia et al., 2018; Long et al., 2019; Gravinese et al., 2019a; Ross and Behringer, 2019). A salinidade é um dos principais fatores ambientais que influenciam a distribuição das espécies na natureza (Whitehead et al., 2011; Uyhelji et al., 2016). Um estudo no manguezal de Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM), uma das áreas de maior mortalidade de manguezais do mundo, comprovou que a diminuição da salinidade (1993 a 2015), foi a responsável pela melhora na recuperação da área e aumento da biodiversidade (Jaramillo et al., 2018). A mudança climática pode alterar a salinidade pelo aumento das precipitações, do nível do mar, dos períodos de estiagem, da intensidade e frequência de eventos extremos, entre outros (Frölicher et al., 2018, IPCC, 2022). Por exemplo, no sul asiático (Bangladesh) e no baixo delta do Ganges já estão sendo observadas alterações na salinidade, devido à invasão do mar nessas áreas (Banerjee et al., 2017; Chen and Mueller, 2018). O pH e a concentração de íons nos organismos aquáticos, como crustáceos e moluscos são controladas por processos fisiológicos localizados principalmente nas brânquias. Trata-se de órgãos multifuncionais envolvidos também com a excreção nitrogenada e a respiração e alterações de uma dessas funções podem reverberar sobre as demais (Freire et al., 2008; McNamara et al., 2015).

Simultaneamente às mudanças climáticas, as zonas costeiras marinhas sofrem outras pressões antrópicas como poluição, construção de portos, industrialização, atividades recreativas, resíduos urbanos, derrames de águas residuais e até mesmo a aquicultura praticada de forma não sustentável (Galappaththi et al, 2020). Nesse contexto, os plásticos merecem destaque dentre os contaminantes emergentes, pois representam cerca de 90% do lixo marinho sendo encontrados desde a superfície até o fundo do mar (Ruiz- Orejón et al., 2019; Behringer and Duermit-Moreau, 2021). A produção global de plástico atingiu 370 milhões de toneladas/ano em 2019 e metade dessa produção foi destinada para uso único, tendo um aumento em sua demanda durante a pandemia da COVID 19 (Borrelle et al., 2020; Torres e De-la-Torre, 2021). Os plásticos que vão parar no ambiente acabam sofrendo com processos de degradação e são fragmentados em partículas menores devido às condições naturais dos ecossistemas marinhos, como a dinâmica das correntes oceânicas, radiação solar, abrasão e interações com embarcações e organismos. Essas partículas menores são comumente conhecidas como microplásticos (1 a 5000 μm) e nanoplásticos (partículas menores que 1 μm) (Frias and Nash, 2019). Trata-se de partículas sólidas sintéticas ou matrizes poliméricas com formas regulares ou irregulares de origem primária ou secundária e insolúvel em água (Frias and Nash, 2019). Em 2020 foi estimado um total de 24,4 trilhões de microplásticos pesando entre 82.000 e 578.000 toneladas flutuando no oceano (Isobe et al., 2021).

Estudos sobre a poluição por micro- e nanoplásticos ainda são recentes, mas já foram encontrados em todos os ecossistemas, até mesmo em lugares não habitados como a região da Antártica (Galloway et al., 2017; Waller, et al., 2017; Rochman and Hoellein, 2020). Micro- e nanoplásticos são encontrados com frequência no sistema gastrointestinal e nas brânquias de animais marinhos, sendo associado à diminuição da alimentação e subsequentes deficiências nutricionais, como na lagosta da Noruega *Nephrops norvegicus* e no caranguejo *Carcinus maenas* (Welden e Cowie, 2016a, 2016b), a alterações genéticas e moleculares no robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), a danos histológicos nos tecidos brânquias e gastrointestinais do camarão *Penaeus vannamei* e na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, dentre outros (Brennecke, et

al.,2015; Granby et al., 2018; Yu et al. 2018; Hu et al., 2021; Karbalaei et al., 2021).

A mudança climática e a poluição por plásticos podem gerar danos e prejuízos à biodiversidade e à aquicultura, mas estudos que mostrem os efeitos de tais perturbadores sobre a biologia dos organismos podem gerar dados para o desenvolvimento de estratégias capazes de reduzir tais danos e/ou permitirem uma adaptação a tais alterações no meio ambiente. No Capítulo 2 desta tese utilizamos do balanço energético como uma ferramenta para avaliar os efeitos da acidificação oceânica e das variações de salinidade em *P. vannamei*, o camarão mais cultivado no mundo. O balanço energético descreve como a energia ingerida é canalizada para os processos fisiológicos. Ele pode ser alterado em função de variações na demanda energética para mecanismos ativos e se mostrou uma boa ferramenta para a compreensão do fluxo de energia em espécies sujeitas a alterações climáticas. Esta ferramenta tem sido muito aplicada em estudos nutricionais refinando assim as técnicas de produção, otimizando a dieta, a taxa de alimentação e o manejo. Aqui nós expusemos os animais durante 30 dias aos pHs 8.0 (controle) ou 7.3 (reduzido) e a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40). Os resultados obtidos mostram que a salinidade foi um fator importante para a canalização de energia para as diferentes funções fisiológica e que em nenhuma das situações avaliadas ocorreu o crescimento foi afetado. O camarão *P. vannamei* se mostrou um organismo com grande resiliência e adaptabilidade às alterações ambientais, utilizando-se estratégias como o aumento do metabolismo, para a manutenção da sua homeostase.

No Capítulo 3 nós investigamos os efeitos do microplástico do tipo PET (poliestileno) na fisiologia de moluscos e crustáceos marinhos ou estuarinos (*Perna perna*, *Crassostrea brasiliana*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *P. vannamei*) mantidos nas salinidades em que são encontrados na natureza. De forma geral, nós queríamos entender se o efeito do microplástico na fisiologia dos invertebrados é alterado devido à salinidade em que o animal se encontra. Isso é especialmente importante porque muitas das espécies estudadas são encontradas em salinidades variadas e também porque a mudança climática e fenômenos como o El Nino podem mudar a salinidade da água devido aos aumentos do nível do mar, aumento ou redução do regime de chuvas e

evaporação da água das poças de maré (Jaramillo et al., 2018). Nossos resultados mostram que quando os animais são expostos a diferentes salinidades e ao microplástico a combinação dos dois fatores causa alterações importantes no consumo de oxigênio, e alterações pontuais na osmorregulação, excreção nitrogenada e no tipo de substrato energético oxidado. Dentre os animais expostos ao contaminante, a ostra *C. brasiliensis* foi o organismo que teve menor alteração fisiológica, provavelmente devido a estratégias de alimentação seletiva. Já no caranguejo *L. thayeri* foi observado a maior quantidade de alterações devido a exposição de microplástico.

Em geral, nossa hipótese é que tanto acidificação oceânica assim como o microplástico terão efeitos combinados com a variação da salinidade, influenciando diretamente nos processos fisiológicos dos organismos avaliados. Isso corrobora com o nosso objetivo de estudar esses estressores em conjunto, uma vez que eles estão ocorrendo simultaneamente. Além disso, o balanço energético também se mostrou mais uma ferramenta para auxiliar nos estudos dos efeitos de alterações ambientais na distribuição de energia dos organismos. As informações obtidas nos nossos capítulos podem auxiliar no gerenciamento de riscos e na criação de medidas de mitigação para que as agências de tomada de decisão possam formular políticas de mitigação para enfrentar essas ameaças

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari S., Keshav C.A., Barlaya G., Rathod R., Mandal R.N., Ikmail S., Sundaray J.K. 2018. Adaptation and mitigation strategies of climate change impact in freshwater aquaculture in some states of India. *J. Fish. Sci.*, 12(1), 16-21.
- Ahmed N., Thompson S., Glaser M. 2019. Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability. *Environ. Manag.*, 63, 159-172.
- Banerjee K., Gatti, R.C. Mitra, A. 2017. Climate change-induced salinity variation impacts on a stenoeuhaline mangrove species in the Indian Sundarbans. *Ambio.*, 46(4), 492-499.
- Behringer D.C., Duermit-Moreau E. 2021. Crustaceans, one health and the changing ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, 186, 107500.

- Béné C., Arthur R., Norbury H., Allison E.H., Beveridge M., Bush S, Williams M. 2016. Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. *World Development*, 79, 177-196.
- Brennecke D., Ferreira E. C., Costa T.M., Appel D., da Gama B.A., Lenz M. 2015. Ingested microplastics (> 100 µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Mar. Pollut. Bull.*, 96(1-2), 491-495.
- Borrelle S.B., Ringma J., Law K.L., Monnahan C.C., Lebreton L., McGivern A., Rochman C.M. 2020. Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. *Science*, 369(6510), 1515-1518.
- Caldeira, K., Wickett, M.E. 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), 365-365.
- Change, C., 2019. The Future of Our Pasts: Engaging Cultural Heritage in Climate Action Outline of Climate Change and Cultural Heritage. International Council on Monuments and Sites-ICOMOS.
- Chen, J., Mueller, V. 2018. Coastal climate change, soil salinity and human migration in Bangladesh. *Nat. Clim. Change.*, 8(11), 981-985.
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.
- Freeman E., Woodruff S.D., Worley S.J., Lubker S.J., Kent E.C., Angel W.E., Smith S.R. 2017. ICOADS Release 3.0: a major update to the historical marine climate record. *Int. J. Climatol.*, 37(5), 2211-2232.
- Frias J.P., Nash R., 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Mar.Pollut. Bull.*, 138, 145-147.
- Froehlich H.E., Koehn J.Z., Holsman K.K., Halpern B.S. 2022. Emerging trends in science and news of climate change threats to and adaptation of aquaculture. *Aquaculture*, 549, 737812.
- Galappaththi E.K., Ichien S.T., Hyman A.A., Aubrac C.J., Ford J.D. 2020. Climate change adaptation in aquaculture. *Rev Aquac.*, 12(4), 2160-2176.
- Galloway T.S., Cole M., Lewis C. 2017. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nat. Ecol. Evol.*, 1(5), 0116.

- Gattuso J.P., Magnan A., Billé R., Cheung W.W., Howes E.L., Joos F., Turley C. 2015. Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science*, 349(6243), aac4722.
- Granby K., Rainieri S., Rasmussen R.R., Kotterman M.J., Sloth J.J., Cederberg T.L., Larsen B.K. 2018. The influence of microplastics and halogenated contaminants in feed on toxicokinetics and gene expression in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Environ. Res.* 164, 430-443.
- Gravinese P.M., Enochs I.C., Manzello D.P., van Woesik R. 2019. Ocean acidification changes the vertical movement of stone crab larvae. *Biol. Lett.*, 15(12), 20190414.
- Hall-Spencer J.M., Harvey B.P. 2019. Ocean acidification impacts on coastal ecosystem services due to habitat degradation. *Emerg Top Life Sci.*, 3(2), 197-206.
- Hartin C.A., Bond-Lamberty B., Patel P., Mundra A. 2016. Ocean acidification over the next three centuries using a simple global climate carbon-cycle model: projections and sensitivities. *Biogeosciences*, 13(15), 4329-4342.
- Hsieh S.L., Wu Y.C., Xu R.Q., Chen Y.T., Chen C.W., Singhania, R.R., Dong, C.D. 2021. Effect of polyethylene microplastics on oxidative stress and histopathology damages in *Litopenaeus vannamei*. *Environ. Pollut.*, 288, 117800.
- IPCC. 2022. *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3056 pp., doi:10.1017/9781009325844.
- Isobe A., Azuma T., Cordova M.R., Cózar A., Galgani F., Hagita R., Zhang W. 2021. A multilevel dataset of microplastic abundance in the world's upper ocean and the Laurentian Great Lakes. *Microplastics and Nanoplastics*, 1, 1-14.
- Jiang L.Q., Carter B.R., Feely R.A., Lauvset S.K., Olsen A. 2019. Surface ocean pH and buffer capacity: past, present and future. *Sci. Rep.*, 9(1), 18624.

- Karbalaei S., Hanachi P., Rafiee G., Seifori P. 2021. Toxicity of polystyrene microplastics on juvenile *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) after individual and combined exposure with chlorpyrifos. *J. Hazard. Mater.* 403, 123980.
- Khatri-Chhetri A., Regmi P.P., Chanana N., Aggarwal P.K. 2020. Potential of climate-smart agriculture in reducing women farmers' drudgery in high climatic risk areas. *Climatic Change*, 158(1), 29-42
- Kwiatkowski L., Torres O., Bopp L., Aumont O., Chamberlain M., Christian J.R., Dunne J.P., Gehlen M., Ilyina T., John J.G., Lentin A., Li H., Lovenduski N.S., Orr J.C., Palmieri J., Santana-Falcón Y., Schwinger J., Séférian R., Stock C.A., Tagliabue A., Takano Y., Tjiputra J., Toyama K., Tsujino H., Watanabe M., Yamamoto A., Yool A., Ziehn T. 2020. Twenty-first century ocean warming, acidification, deoxygenation, and upper-ocean nutrient and primary production decline from CMIP6 model projections. *Biogeosciences*, 17(13), 3439-3470.
- Long W.C., Pruisner P., Swiney K.M., Foy R.J. 2019. Effects of ocean acidification on the respiration and feeding of juvenile red and blue king crabs (*Paralithodes camtschaticus* and *P. platypus*). *ICES Mar. Sci. Symp.*, 76(5), 1335-1343.
- Maulu S., Hasimuna O.J., Haambiya L.H., Monde C., Musuka C.G., Makorwa T.H., Munganga B.P., Phiri K.J., Nsekanabo J.D. 2021. Climate change effects on aquaculture production: sustainability implications, mitigation and adaptations. *Front. sustain. food syst.*, 5, 609097.
- Metian M. 2017. Aquaculture and Global Changes. Ocean and Climate Platform.
- Mikhaylov A., Moiseev N., Aleshin K., Burkhardt T. 2020. Global climate change and greenhouse effect. *Entrepreneurship Sustain. Issues.*, 7(4), 2897.
- Myers S.S., Smith M.R., Guth S., Golden C.D., Vaitla B., Mueller N.D., Huybers P. 2017. Climate change and global food systems: potential impacts on food security and undernutrition. *Annu. Rev. Public Health.*, 38, 259-277.
- Newton J.A., Feely R.A., Jewett E. B., Williamson P., Mathis J. 2015. Global ocean acidification observing network: requirements and governance plan.
- Ramaglia A.C., de Castro L.M., Augusto A. 2018. Effects of ocean acidification and salinity variations on the physiology of osmoregulating and osmoconforming crustaceans. *J. Comp. Physiol.*, 188, 729-738.

- Reid G.K., Gurney-Smith H.J., Marcogliese D.J., Knowler D., Benfey T., Garber A.F., Forster I., Chopin T., Brewer-Dalton K., Moccia R.D., Flaherty M., Smith C.T., De Silva S. 2019. Climate change and aquaculture: considering biological response and resources. *Aquac. Environ. interact.*, 11, 569-602.
- Rochman C.M., Hoellein T., 2020. The global odyssey of plastic pollution. *Science.*, 368(6496), 1184-1185.
- Ross E., Behringer D. 2019. Changes in temperature, pH, and salinity affect the sheltering responses of Caribbean spiny lobsters to chemosensory cues. *Sci. Rep.*, 9(1), 1-11.
- Ruiz-Orejón L.F., Mourre B., Sardá R., Tintoré J., Ramis-Pujol J. 2019. Quarterly variability of floating plastic debris in the marine protected area of the Menorca Channel (Spain). *Environ. Pollut.*, 252, 1742-1754.
- Sesana E., Gagnon A.S., Ciantelli C., Cassar J., Hughes J.J. 2021. Climate change impacts on cultural heritage: A literature review. *Wiley Interdiscip. Rev. Clim. Change.*, 12(4), e710.
- Strefezza T.F., De Andrade I.M., Augusto A. 2019. Reduced pH and elevated salinities affect the physiology of intertidal crab *Minuca mordax* (Crustacea, Decapoda). *Mar Freshw Behav Physiol.*, 52(5), 241-254.
- Torres F.G., De-la-Torre G.E. 2021. Facemask waste generation and management during the COVID-19 pandemic: An overview and the Peruvian case. *Sci. Total Environ*, 786, 147628.
- Tripp A., Allen G.J., Quijada-Rodriguez A.R., Yoon G.R., Weihrauch D. 2022. Effects of single and dual-stressor elevation of environmental temperature and PCO₂ on metabolism and acid-base regulation in the Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 266, 111151
- Vargas C.A., Cuevas L.A., Broitman B.R., San Martin V.A., Lagos N.A., Gaitán- Espitia J.D., Dupont S. 2022. Upper environmental p CO₂ drives sensitivity to ocean acidification in marine invertebrates. *Nat. Clim. Change.*, 12(2), 200- 207.
- Valenti W.C., Barros H.P., Moraes-Valenti P., Bueno G.W., Cavalli R.O. 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquac. Rep.*, 19, 100611.

- Waller C.L., Griffiths H.J., Waluda C.M., Thorpe S.E., Loaiza I., Moreno B., Hughes K.A. 2017. Microplastics in the Antarctic marine system: an emerging area of research. *Sci. Total Environ.*, 598, 220-227.
- Welden N.A., Cowie P.R. 2016. Environment and gut morphology influence microplastic retention in langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environ. Pollut.*, 214, 859-865.
- Welden N.A., Cowie P.R. 2016. Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environ. Pollut.*, 218, 895-900.
- Yu Q., Xie J., Huang M., Chen C., Qian D., Qin J.G., Li E. 2020. Growth and health response to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Rep.*, 16, 100280.

CAPÍTULO 2

O balanço energético como uma ferramenta para avaliar os efeitos combinados entre a acidificação oceânica e a variação de salinidade em *Penaeus vannamei*, o camarão-branco-do-pacífico

Revista de referencia: Journal Comparative Biochemistry and Physiology - B
Biochemistry and Molecular Biology

O balanço energético como uma ferramenta para avaliar os efeitos da sinergia entre a acidificação oceânica e a variação de salinidade em *Penaeus vannamei*, o camarão-branco-do-pacífico

Andressa Cristina Ramaglia¹, Caterina do Valle Trotta², Juliana Rodrigues²; Emanuelle Borges³, Ana Carolina Louzã³, Michelle Roberta dos Santos¹, Alessandra Augusto^{1; 2;3}.

¹Centro de Aquicultura da Unesp- UNESP - Universidade Estadual Paulista- Jaboticabal, SP, Brasil.

²Instituto de Biociências do Litoral Paulista–UNESP - Universidade Estadual Paulista - São Vicente, SP, Brasil.

³Instituto de Biociências de Botucatu, –UNESP - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo, Brasil.

Corresponding author: andressa.cr.mota@unesp.br (A. C. Ramaglia)

RESUMO

O balanço energético descreve como a energia ingerida é canalizada para os diferentes processos fisiológicos e pode ser alterado em função de variações na demanda energética dos organismos. Esta ferramenta tem sido pouco usada na avaliação dos impactos ambientais sobre a biologia dos animais aquáticos. Nosso objetivo foi usá-la para avaliar os efeitos da acidificação oceânica e salinidade na fisiologia de *Penaeus vannamei*, o camarão marinho mais cultivado no mundo. Os animais foram expostos durante 30 dias aos pHs 8.0 (controle) ou 7.3 (reduzido) e a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40). Além do balanço energético, avaliamos uma malha de processos fisiológicos (ingestão, defecação, crescimento, metabolismo, excreção, substrato energético, índice hepatossomático e osmorregulação). A salinidade possui efeito mais acentuado que o pH na fisiologia de *P. vannamei* porque alterou quase todos os parâmetros avaliados. Além disso, os efeitos do pH variaram em função da salinidade. Salinidades maiores que 20 são danosas à espécie porque causaram reduções nas taxas de ingestão e crescimento, além de aumento na taxa de defecação. Comparando-se os dois pHs, verificamos que a acidificação causou alterações pontuais nas salinidades avaliadas como o aumento na taxa de ingestão acompanhada por variações no crescimento. Além disso, em pH acidificado o consumo de oxigênio aumentou 60% em relação aos animais mantidos em pH controle, provavelmente devido ao maior gasto com os processos de regulação ácido-base. Observamos mudanças no balanço energético em função do pH em que os animais foram expostos. Nesse sentido, destacamos o aumento da energia canalizada para o metabolismo (salinidade 20: de 33 para 52%) em animais expostos ao pH acidificado. Concluímos que o balanço energético é uma boa ferramenta para avaliar os impactos da mudança climática na biologia dos animais e que em *P. vannamei* a salinidade possui um efeito mais acentuado na fisiologia que a acidificação oceânica prevista no IPCC.

Palavras chaves: energética, mudança climática, aquicultura, fisiologia, crustáceos.

ABSTRACT

The energy balance describes how the ingested energy is channeled to the different physiological processes and can be altered due to variations in the energy demand of the organisms. This tool has been little used

in the evaluation of environmental impacts on the biology of aquatic animals. Our objective was to use it to evaluate the effects of ocean acidification and salinity on the physiology of *Penaeus vannamei*, the most cultivated marine shrimp in the world. The animals were exposed for 30 days to pH 8.0 (control) or 7.3 (reduced) and different salinities (20, 25, 30, 35 or 40). In addition to energy balance, we evaluated a network of physiological processes (ingestion, defecation, growth, metabolism, excretion, energy substrate, hepatosomatic index and osmoregulation). Salinity has a more pronounced effect than pH on the physiology of *P. vannamei* because it altered almost all parameters evaluated. Furthermore, the effects of pH varied as a function of salinity. Salinities greater than 20 are harmful to the species because they cause reductions in ingestion and growth rates, in addition to an increase in the defecation rate. Comparing the two pHs, we found that acidification caused punctual changes such as an increase in the ingestion rate accompanied by variations in growth. In addition, at acidified pH, oxygen consumption increased by 60% in relation to animals kept at control pH, probably due to greater expenditure on acid-base regulation processes. We observed changes in energy balance as a function of the pH at which the animals were exposed. In this sense, we highlight the increase in energy channeled to metabolism (salinity 20: from 33 to 52%) in animals exposed to acidic pH. We conclude that the energy balance is a good tool to assess the impacts of climate change on animal biology and that in *P. vannamei* salinity has a more pronounced effect on physiology than ocean acidification predicted by the IPCC.

Keywords: Energetics, climate change, aquaculture, physiology, crustaceans.

1. INTRODUÇÃO

A energia é definida como a habilidade para produzir trabalho e calor (Letcher & Williamson, 2004). Os animais a obtêm por meio da alimentação e seu uso eficiente é um requisito essencial e limitante para a existência bem-sucedida das espécies (Coelho et al. 2019; Sokolova 2021). Nesse sentido, o balanço energético de uma espécie descreve a forma como os indivíduos obtêm energia dos alimentos e a utilizam para processos fisiológicos relacionados ao crescimento, metabolismo, excreção, fezes e no caso dos artrópodes, no processo de muda (Levine and Sulkin, 1979; Lemos and Phan, 2001; Mantoan et al.2021). O balanço energético dos organismos é uma ferramenta que tem sido muito aplicada às espécies cultivadas e, principalmente, em estudos nutricionais porque ele ajuda a entender como a dieta modula os mecanismos

fisiológicos refinando assim as técnicas de produção, a taxa de alimentação e o manejo (Du and Niu 2002; Zhang et al. 2011; Augusto et al. 2020; Donohue et al. 2021). Entretanto, vários outros fatores podem alterar a canalização da energia para as diferentes funções fisiológicas. Dentre esses fatores destacam-se a ontogênese, estágio reprodutivo, temperatura, salinidade, pH, dentre outros (Feng et al. 2008; Hu et al. 2011; Sui et al. 2016; Xue et al. 2021; Mantoan et al. 2021). Portanto, o balanço energético pode ser uma ferramenta importante para avaliar os efeitos de alterações do meio ambiente como mudança climática (Melzner et al. 2020; Becker and McCluney, 2021), fenômenos naturais como El Niño, contaminações por metais (Louis et al. 2019; Vlaeminck et al. 2021), microplásticos (Shang et al. 2021; Sui et al. 2022) e outros contaminantes (Verheyen and Stoks 2020) na biologia dos animais. Poucos autores têm usado o balanço energético nesse sentido e a maioria dos trabalhos publicados quantificou apenas uma parte dos sistemas fisiológicos que recebem a energia ingerida e inferem sobre os demais sistemas (Castaño-Sánchez et al. 2020; Vianna et al. 2020; Jiang and McGaw, 2023).

No que tange à mudança climática, uma das principais preocupações é entender como a acidificação oceânica afetará as espécies, populações e ecossistemas nas próximas décadas (Talbot et al. 2019; Hsieh et al. 2021). A acidificação oceânica se deve a uma maior absorção de CO₂ pelos oceanos o que causa redução do pH da água (Hall-Spencer and Harvey 2019; Figuerola et al. 2021). Somado a isso, o aquecimento da atmosfera e dos oceanos (IPCC 2022) está alterando os regimes de chuvas e o nível do mar o que pode influenciar a salinidade dos ambientes costeiros. Tais alterações de salinidade podem causar extremos hipo ou hiper salinos e impor aos organismos novos desafios osmóticos (Miller et al. 2014). De acordo com as previsões os mares mais próximos à linha do Equador terão um aumento na salinidade, enquanto que as regiões mais próximas aos Pólos à salinidade tende reduzir (Frankignoul et al. 2009). Tanto o pH quanto a salinidade podem afetar os mecanismos de regulação ácido-base (Shui et al. 2022), metabolismo energético (Feng et al. 2008; Furtado et al. 2017; Muralisankar et al. 2021), osmorregulação (Ramaglia et al. 2018; McNamara and Freire 2022; Podbielski et al. 2022), imunidade (He et al. 2022), comportamento (Prakash et al. 2022), expressão gênica (Jones et al. 2019; Porteus et al. 2021; Shui et al. 2022), dentre outros. Os impactos da acidificação oceânica e das variações da salinidade incluem a perda da biodiversidade marinha e estuarina e ameaças à população que utiliza recursos pesqueiros originários da pesca ou da aquicultura (Richards et al. 2015; Mangi et al. 2018).

Muitos camarões peneídeos como *Penaeus vannamei*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Litopenaeus schmitti* possuem importância comercial, sendo intensamente pescados e/ou

cultivados. Dentre eles o camarão-branco-do-pacífico, *Penaeus vannamei*, está entre os 20 principais produtos aquícolas, representando cerca de 50% dos crustáceos cultivados no mundo em 2020 e 90% das capturas de camarão no golfo da Califórnia (Frías-Espericueta et al. 2004; FAO 2022). É um importante recurso alimentar, com alto teor em propriedades nutricionais, além de ser um animal eurialino, de rápido crescimento e resilientes a situações de estresse (Abdelrahman et al. 2019; Muralisankar et al. 2021; Li et al. 2021). Os efeitos negativos consequentes da diminuição do pH na água já começaram a ser relatados para *P. vannamei*. Dentre estes destacam-se diminuições na sobrevivência, no crescimento, na taxa de ingestão, composição bioquímica e concentrações corporais de quitina e íons como sódio, potássio e cálcio (Luo et al. 2020; Muralisankar et al. 2021; Weerathunga et al. 2023). No entanto, ainda são poucos os trabalhos que avaliaram os efeitos sinérgicos de vários fatores abióticos como acidificação oceânica e variação da salinidade na biologia desse importante recurso pesqueiro e em várias outras espécies de interesse econômico.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a ferramenta do balanço energético, bem como uma malha de processos fisiológicos (taxas de ingestão, defecação e crescimento, metabolismo, excreção, substrato energético oxidado, índice hepatossomático, e osmorregulação), para avaliar os efeitos da acidificação oceânica e das variações de salinidade no camarão branco-do-pacífico *P. vannamei*. O pH reduzido (7,3) foi escolhido de acordo com as previsões de redução de até 0,77 até 2300 (IPCC 2018; Findlay and Turley, 2021), e todas as salinidades em que os animais foram expostos (20, 25, 30, 35 e 40) referem-se àquelas em que os animais são encontrados na natureza.

Com isso nos acreditamos que a utilização de ferramentas metodológicas, como o balanço de energia e a medição dos parâmetros fisiológicos dos animais irá ajudar a entender os efeitos da mudança climática principalmente dentro dos sistemas de produção, e auxiliarão nas tomadas de decisão para estratégias de cultivo e/ou nos processos de mitigação e adaptação mais eficazes e resilientes para a sustentabilidade da produção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS NO LABORATÓRIO

Juvenis de *P. vannamei* foram coletados com o auxílio de rede de tarrafas nos viveiros de fazendas de

camarão em Santa Catarina. O comprimento da carapaça de *P.vannamei* variou de 8 a 10,1 cm e o peso variou de 4,5 a 8 g. As variáveis da água no local de coleta, salinidade, pH e temperatura, foram verificadas, respectivamente, com refratômetro, pHmetro e termômetro. Os animais foram transportados em caixas de polipropileno contendo água do local de coleta com aeração constante até o Laboratório de Aquicultura Sustentável/UNESP em São Vicente, SP, Brasil (23°58'S 46°23'W) e foram aclimatados às condições de laboratório em aquários individuais contendo água com salinidade (30), pH (8,0) e temperatura (25°C) igual ao local de coleta, por quatro dias. Os camarões foram alimentados com ração comercial para camarões marinhos (Guabitech Active, 40% proteína bruta), correspondendo a 5% de sua biomassa total uma vez ao dia. Os experimentos foram realizados com dez animais por tratamento (N = 10) e os camarões utilizados estavam na fase de intermuda.

2.2 EXPOSIÇÃO DE ANIMAIS A DIFERENTES pHs E SALINIDADES

Após o período de aclimação às condições de laboratório, os animais foram transferidos para aquários individuais (20L) e expostos por 30 dias a diferentes pHs (8,0 ou 7,3) e salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40). Os valores de pH em que os animais controle foram mantidos (8,0) foram escolhidos de acordo com os valores da área onde os animais foram coletados. A condição de hipercapnia (pH 7,3) foi escolhida após estudos de previsão de cenários futuros em que o pH das águas oceânicas pode sofrer uma redução de até 0,7 unidades (Caldeira e Wickett 2003; IPCC 2018; Findlay and Turley, 2021). O pH reduzido foi obtido por borbulhamento constante de CO₂ em água usando um cilindro equipado com manômetro, difusor e válvula solenóide durante todo o período de experimento (Dissanayake e Ishimatsu 2011; de la Haye et al. 2012; Ramaglia et al. 2018). As salinidades de 20, 25 e 30 foram obtidas diluindo a água do mar com água doce sem cloro. A salinidade 40 foi obtida após o congelamento da água do mar e a coleta das primeiras porções durante o descongelamento. Os fatores abióticos (pH, temperatura e salinidade) foram verificados diariamente (Tabela 1) e amostras de água foram coletadas para determinar a alcalinidade total (AT) determinada por titulação (Gran 1950). Alcalinidade total média, salinidade, temperatura e pH foram inseridos no software CO₂SYs para calcular a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) e os estados de saturação de calcita (Ω Cal) e aragonita (Ω Ag) para cada tratamento, juntamente com as constantes de dissociação de carbonato K₁ e K₂ (Dickson e Millero 1987) e KSO₄ (Dickson 1990). O software CO₂-SYS foi usado para calcular as pressões parciais de CO₂ (pCO₂; μ atm) e os estados de saturação da água do mar para calcita

(Ω Cal) e aragonita (Ω Ar).

Tabela 1. Parâmetros da água do mar durante o experimento, pH, temperatura ($^{\circ}$ C) e salinidade (‰) foram medidos diariamente e amostras de água (Média \pm EP, n= 10) foram coletadas para análise de Alcalinidade Total (μ mol Kg⁻¹). O software CO2-SYS foi usado para calcular as pressões parciais de CO2 (μ atm) e os estados de saturação da água do mar para calcita (Ω Cal) e aragonita (Ω Ar).

	pH	Salinity	AT (mmol Kg ⁻¹)	pCO ₂ (matm)	Ω Cal	Ω Ar
pH 8.0	7.90 \pm 0.10	20	1685 \pm 385	405 \pm 49	2.77 \pm 0.3	1.72 \pm 0.2
	7.94 \pm 0.06	25	1999 \pm 152	448 \pm 34	3.59 \pm 0.3	2.29 \pm 0.2
	7.99 \pm 0.04	30	2122 \pm 210	450 \pm 44	4.13 \pm 0.41	2.68 \pm 0.27
	7.96 \pm 0.04	35	2985 \pm 206	608 \pm 42	6.14 \pm 0.56	4.12 \pm 0.41
	8.03 \pm 0.03	40	2729 \pm 253	540 \pm 50	5.93 \pm 0.55	3.91 \pm 0.36
pH 7.3	7.32 \pm 0.05	20	1761 \pm 284	2353 \pm 380	0.64 \pm 0.1	0.40 \pm 0.06
	7.27 \pm 0.04	25	1995 \pm 280	2530 \pm 355	0.81 \pm 0.11	0.51 \pm 0.07
	7.24 \pm 0.05	30	2138 \pm 171	2138 \pm 171	0.95 \pm 0.08	0.62 \pm 0.05
	7.35 \pm 0.04	35	3073 \pm 366	3648 \pm 435	1.48 \pm 0.18	0.97 \pm 0.12
	7.29 \pm 0.02	40	3551 \pm 494	4161 \pm 579	1.82 \pm 0.25	1.20 \pm 0.17

Durante 29 dias de exposição, foram avaliadas as taxas de ingestão, ingestão e crescimento dos animais. O consumo de oxigênio, excreção de amônia, substrato energético oxidado, índice hepatossomático, balanço energético e osmorregulação foram medidos no último dia (30). Esses procedimentos são explicados abaixo.

2.3 AVALIAÇÃO DO ORÇAMENTO ENERGÉTICO

2.3.1 Ingestão (C) e taxa de egestão (F)

A taxa de ingestão e egestão estava disponível de acordo com Augusto et al (2020) e Mantoan et al (2021). Os camarões foram pesados no início dos experimentos e 5% da biomassa individual da ração comercial (Guabitech Active, 40% proteína bruta) foi determinada para alimentação. Os animais foram alimentados no final da tarde durante 29 dias. As sobras de ração foram retiradas de cada aquário separadamente, todos os dias pela manhã por sifonagem, colocadas em estufa a 60°C por 48 horas e

posteriormente pesadas (Mettler Toledo, 1 µg). Amostras de alimento controle foram previamente pesadas e colocadas em aquários nas mesmas 161 condições experimentais, sem animais, para estimar a perda de peso do alimento por lixiviação. Amostras controle foram secas em estufa a 60 °C por 48h, pesadas e armazenadas em freezer (-20°C) para análise energética. A taxa de ingestão foi determinada pela diferença entre a massa de alimento oferecido e o que restou nos aquários. As fezes liberadas foram quantificadas diariamente por meio da coleta de material fecal. Pela manhã, após a sifonagem, com o auxílio de uma pipeta plástica, as fezes foram separadas do restante da ração. As amostras fecais foram secas em estufa a 60°C por 48 h e pesadas em balança analítica (Mettler Toledo, 1 µg). A taxa de ingestão foi calculada dividindo-se a quantidade total de fezes pelos dias de experimento. O conteúdo energético dos alimentos e fezes foi determinado usando uma bomba adiabática (IKA, C2000 Basic).

2.3.2 Crescimento (P)

Os animais foram pesados no primeiro dia de experimento e novamente após 30 dias. Ao final do experimento (30º dia), os animais foram eutanasiados por congelamento, secos em papel absorvente, pesados e colocados em estufa a 60°C por 48 horas e pesados novamente. Os corpos dos animais foram moídos em moinho e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análise do teor energético. O conteúdo energético do corpo de cada animal foi determinado em uma bomba adiabática (IKA, C2000 Basic).

2.3.3 Exuvia (E)

O valor utilizado como energia contida no exoesqueleto foi de 2,72%, valor encontrado na literatura para juvenis de *P. vannamei* alimentados com ração comercial (Coelho et al. 2019).

2.3.4 Metabolismo (R), excreção de amônia (U) e relação O: N

O consumo de oxigênio foi avaliado em respirometria de acrílico em câmara de 2,5 L equipada com oxímetro e monitor (YSI modelos 53 e 5905, respectivamente). Os animais foram aclimatados por 30 minutos às câmaras respirométricas contendo água com aeração constante e com os mesmos parâmetros físico-químicos da água do aquário em que os animais foram mantidos. Após esse período, a aeração foi retirada das câmaras, foi medida a concentração inicial de oxigênio e as câmaras foram seladas. Após três

horas, novas medições foram feitas. Foram utilizados apenas animais que estavam na fase de intermuda, pois alguns parâmetros fisiológicos podem ser alterados dependendo do ciclo de muda. As câmaras de controle sem animais foram mantidas nas mesmas condições experimentais. Após a determinação do consumo de oxigênio, os animais presentes em cada câmara foram mortos por congelamento, pesados (massa úmida), secos em estufa e novamente pesados (massa seca). O consumo de oxigênio foi determinado pela taxa respirométrica calculada de acordo com a fórmula abaixo (Winddows e Johnson 1988):

$$RT = \{[(Co - Cf). V/\Delta T] - f\}/DW$$

TR: taxa respirométrica ($\mu\text{g O}_2 \text{ mgMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$); Co: concentração inicial de oxigênio na câmara (mLO_2 / L); Cf: concentração final de oxigênio na câmara (mLO_2 / L); V: volume da câmara de respirometria (L); ΔT : duração do experimento (h); f: mudança na concentração de oxigênio nas câmaras de controle; DP: massa seca animal (mg).

A excreção total de amônia foi medida em amostras de água obtidas de câmaras respirométricas ao final da medição do consumo de oxigênio. As variações na concentração de amônia total foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nas amostras e nos controles (câmaras sem animais). A concentração de amônia foi determinada por colorimetria (Koroleff 1983) e corresponde à soma de NH^+ e NH^+ e foi expresso como taxa de massa seca ($\mu\text{g NH}^- \text{H. mg DW}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Os valores de consumo de oxigênio foram convertidos em energia como $14.06 \text{ Jmg}^{-1} \text{ O}_2$ (Gnaiger, 1983; Lemos et al., 2006) e excreção total de amônia como $24.87 \text{ Jmg}^{-1} \text{ NH}_3 \text{ -N}$ (Lemos et al., 2006).

A relação O: N foi calculada dividindo-se a quantidade de oxigênio consumida pela excreção de nitrogênio excretado. Valores entre três e 16 indicam o uso de proteínas, entre 16 e 60, o uso de uma mistura de proteínas e lipídeos; valores acima de 60 indicam a predominância de lipídeos como substrato energético (Mayzaud and Conover, 1988).

2.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (HSI)

Após medido o consumo de oxigênio e amônia, o hepatopâncreas de cada animal foi dissecado, pesado, mantido em estufa a 60°C por 48 horas e pesado novamente. O índice hepatossomático foi calculado

de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{HSI (\%)} = (\text{massa do hepatopâncreas} \times 100) / \text{massa corporal.}$$

2.5 AVALIAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO

O balanço energético foi calculado pela fórmula abaixo:

Consumo energético (C) = Energia gasta no crescimento (P) + Energia gasta no metabolismo (R) + Energia gasta na excreção (U) + Energia gasta nas fezes (F) + Energia gasta na exúvia (E)

2.6 AVALIAÇÃO DA OSMOLALIDADE E CAPACIDADE OSMORREGULATÓRIA DA HEMOLINFA

Após eutanásia e pesagem dos animais, foram retirados aproximadamente 20 µl de hemolinfa da região do cefalotórax, utilizando-se uma seringa de insulina e agulha nº 25-8. As amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) para posterior análise de osmolaridade. A osmolalidade da hemolinfa foi medida em amostras de 10 µl em um microsmômetro de pressão de vapor (Wescor, Modelo 5500). Os resultados são apresentados em mOsm/Kg de água. A capacidade osmorreguladora foi calculada pela razão: Δ osmolalidade da hemolinfa/ Δ osmolalidade média (Lignot et al. 2000; Freire et al. 2003).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito dos parâmetros fisiológicos pH (8,0 ou 7,3) e salinidade (20, 25, 30, 35 ou 40) foi avaliado por análise de variância de duas vias (pH e salinidade). As análises foram seguidas pelo teste de médias múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) para localizar médias estatisticamente diferentes. As análises foram realizadas após verificação das condições de normalidade de distribuição e igualdade de variância por meio do programa Sigmastat 3.5 e empregando-se um nível mínimo de significância de $P \leq 0,05$. Os dados são apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média.

3. RESULTADOS

3.1 CONTEÚDO ENERGÉTICO DA RAÇÃO ANIMAL, CORPO E FEZES

Os animais foram alimentados com dieta comercial contendo $18,56 \pm 0,07$ KJ/g de energia. Em geral, o pH não afetou o conteúdo energético dos corpos e fezes dos animais ($P < 0,05$) (Tabela 2). As fezes dos animais foram menos energéticas nas salinidades entre 25 a 40

Tabela 2. Conteúdo energético (kJ g^{-1} DP) do corpo e fezes (kJ g^{-1}) do camarão branco do pacífico, *Penaeus vannamei*, exposto a dois pHs (8,0 ou 7,3) e cinco salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40) durante 30 dias (Média \pm EP, N = 10).

Salinity	pH 8.0					pH 7.3				
	20	25	30	35	40	20	25	30	35	40
Body Energy	$18.72 \pm 0.2^{\text{ABa}}$	$18.68 \pm 0.2^{\text{ABa}}$	$18.35 \pm 0.2^{\text{Aa}}$	$18.29 \pm 0.2^{\text{Aa}}$	$18.93 \pm 0.2^{\text{Ba}}$	$18.50 \pm 0.2^{\text{ABa}}$	$18.42 \pm 0.2^{\text{Aa}}$	$18.35 \pm 0.2^{\text{Aa}}$	$18.57 \pm 0.2^{\text{ABa}}$	$19.10 \pm 0.2^{\text{Ba}}$
Feces Energy	$9.21 \pm 0.3^{\text{Aa}}$	$7.21 \pm 0.2^{\text{Ba}}$	$6.52 \pm 0.2^{\text{Ca}}$	$6.03 \pm 0.3^{\text{Ca}}$	$5.86 \pm 0.2^{\text{Ca}}$	$8.99 \pm 0.3^{\text{Aa}}$	$7.39 \pm 0.3^{\text{Ba}}$	$7.17 \pm 0.2^{\text{Bb}}$	$6.31 \pm 0.2^{\text{Ca}}$	$6.14 \pm 0.2^{\text{Ca}}$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e o mesmo pH. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes pHs na mesma salinidade. Os dados são apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. ($P \leq 0,05$).

3.2 INGESTÃO, EGESTÃO, CRESCIMENTO, ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO, O: N

As taxas de ingestão, egestão e crescimento em *P. vannamei* são mostradas na Tabela 4. Em ambos pH nas salinidades maiores que 20 houveram reduções na taxa de ingestão (até 30% menor) acompanhadas por aumentos na taxa de defecação (até 190 % mais alto). Em salinidades superiores a 20 também observamos taxas de crescimento mais baixas. Tais reduções chegam a 85% na salinidade de 25, independente do pH (Tabelas 3 e 4). Comparando animais expostos ao pH controlado e pH reduzido foram observadas apenas alterações pontuais nas taxas de ingestão (salinidade 25: +13% e salinidade 30: -10%), ingestão (salinidade 40: -12%) e crescimento (salinidade 20: +21% e salinidade 30: -20%) em relação ao controle de pH. De acordo com a relação O: N os animais oxidaram principalmente proteínas como substrato energético. De forma geral, o IHS não foi alterado em função da salinidade. Uma redução de 25% foi observada nos animais expostos ao pH reduzido na salinidade de 40.

Tabela 3. Resultados de uma ANOVA de duas vias testando os efeitos da exposição a dois pH (8,0 ou 7,3) e cinco salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40) por 30 dias nas taxas de ingestão (C), relação fezes/ingestão (F/C), crescimento (P) e índice hepatossomático (HSI) do camarão branco do pacífico, *Penaeus vannamei*.

	PH				Salinity				pH x Salinity				Residual	
	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS
C/WWi (%)	1	0,0558	1,625	0,206	4	1,051	30,62	<0,001	4	0,0997	2,904	0,027	2,61	0,0343
F/C (%)	1	169,274	2,147	0,147	4	5035,073	63,86	<0,001	4	147,47	1,870	0,124	6150,04	78,847
P/WWi (%)	1	0,669	0,0141	0,906	4	4131,927	86,83	<0,001	4	80,035	1,682	0,166	2902,92	47,589
HSI	1	1,061	1,330	0,256	4	3,002	3,763	0,011	4	1,412	1,770	0,154	31,91	0,798

WWi: peso úmido inicial. WW= peso úmido. DW = peso seco.

Tabela 4. Taxas médias diárias de ingestão (C), defecação (F), razão fezes/ingestão (F/C), crescimento (P), razão atômica O:N e índice hepatossomático (HSI), do camarão branco do pacífico, *Penaeus vannamei*, exposto a dois pHs (8,0 e 7,3) e cinco salinidades (20,25,30,35 e 40) durante 30 dias (Média ± SE, N = 10).

	pH 8.0					pH 7.3				
	Salinity	20	25	30	35	40	20	25	30	35
C/ WWi (%)	2.44 ± 0.07 ^{Aa}	1.67 ± 0.06 ^{Ba}	1.86 ± 0.06 ^{Ca}	2.15 ± 0.06 ^{Da}	1.96 ± 0.06 ^{Ca}	2.37 ± 0.09 ^{Aa}	1.88 ± 0.07 ^{Bb}	1.68 ± 0.06 ^{Bb}	2.06 ± 0.06 ^{Ca}	1.82 ± 0.07 ^{Ba}
F/C (%)	29.90 ± 3.14 ^{Aa}	42.41 ± 2.20 ^{Ba}	44.34 ± 2.32 ^{Ba}	68.93 ± 2.96 ^{Ca}	64.21 ± 2.32 ^{Ca}	26.42 ± 3.11 ^{Aa}	46.53 ± 2.46 ^{Ba}	44.93 ± 2.20 ^{Ba}	69.06 ± 2.81 ^{Ca}	77.09 ± 2.63 ^{Cb}
P/WWi (%)	49.04 ± 2.48 ^{Aa}	9.41 ± 1.5 ^{Ba}	27.81 ± 2.65 ^{Ca}	17.42 ± 2.65 ^{Ba}	10.57 ± 3.51 ^{Ba}	59.25 ± 3.51 ^{Ab}	7.07 ± 0.42 ^{Ba}	22.20 ± 2.48 ^{Cb}	20.50 ± 2.87 ^{Ca}	10.01 ± 2.48 ^{Ba}
O:N	12.42 ± 2.5 ^{Aa}	12.44 ± 2.90 ^{Aa}	14.27 ± 2.37 ^{Ba}	7.40 ± 2.37 ^{Aa}	13.01 ± 2.24 ^{Aa}	15.81 ± 3.55 ^{Ab P}	11.12 ± 2.68 ^{Ba}	18.82 ± 2.24 ^{Aa}	11.73 ± 2.24 ^{Ba}	11.71 ± 32.68 ^{Ba}
	P	P	P	P	P		P	P+L	P	P
IHS	4.53 ± 0.40 ^{Aa}	3.36 ± 0.45 ^{Aa}	3.72 ± 0.34 ^{Aa}	4.41 ± 0.40 ^{Aa}	5.08 ± 0.45 ^{Aa}	4.05 ± 0.40 ^{ABa}	2.76 ± 0.44 ^{Ba}	4.33 ± 0.34 ^{Aa}	4.68 ± 0.40 ^{Aa}	3.80 ± 0.45 ^{ABb}

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e o mesmo pH. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes pHs na mesma salinidade. Os dados são apresentados como Média ± Erro Padrão da Média. ($P \leq 0,05$). WWi: peso úmido inicial. WW= peso úmido. DW = peso seco.

3.3 CONSUMO DE OXIGÊNIO, EXCREÇÃO DE AMÔNIA, SUBSTRATO ENERGÉTICO E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

O consumo específico de massa seca de oxigênio ($\mu\text{g O}_2 \text{ mg DW}^{-1} \text{ h}^{-1}$) variou apenas em função do pH (Tabela 5, Figura 1). Em pH acidificado houve aumento nas salinidades 20 (+61%), 35 (+38%) e 40 (+38%) em relação aos animais mantidos em pH controle. Em geral, a excreção de amônia não foi afetada pela salinidade ou pH e foi mantida em torno de $0,08 \mu\text{g NH}_4\text{-N mg DW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 5, Figura 1).

Tabela 5: Resultados de uma ANOVA de duas vias testando os efeitos da exposição a dois pH (8,0 ou 7,3) e cinco salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40) por 30 dias no consumo de oxigênio e excreção de amônia do camarão-branco-do-Pacífico, *Penaeus vannamei*.

	pH				Salinidade				pH x Salinidade				Residual	
	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS
Consumo de oxigênio	1	2,98	19,62	<0,001	4	2,739	4,51	0,003	4	0,383	0,63	0,64	69	10,485
Excreção de Amônia	1	0,00002	0,0209	0,88	4	0,0051	4,423	0,003	4	0,002	1,37	0,25	76	0,0012

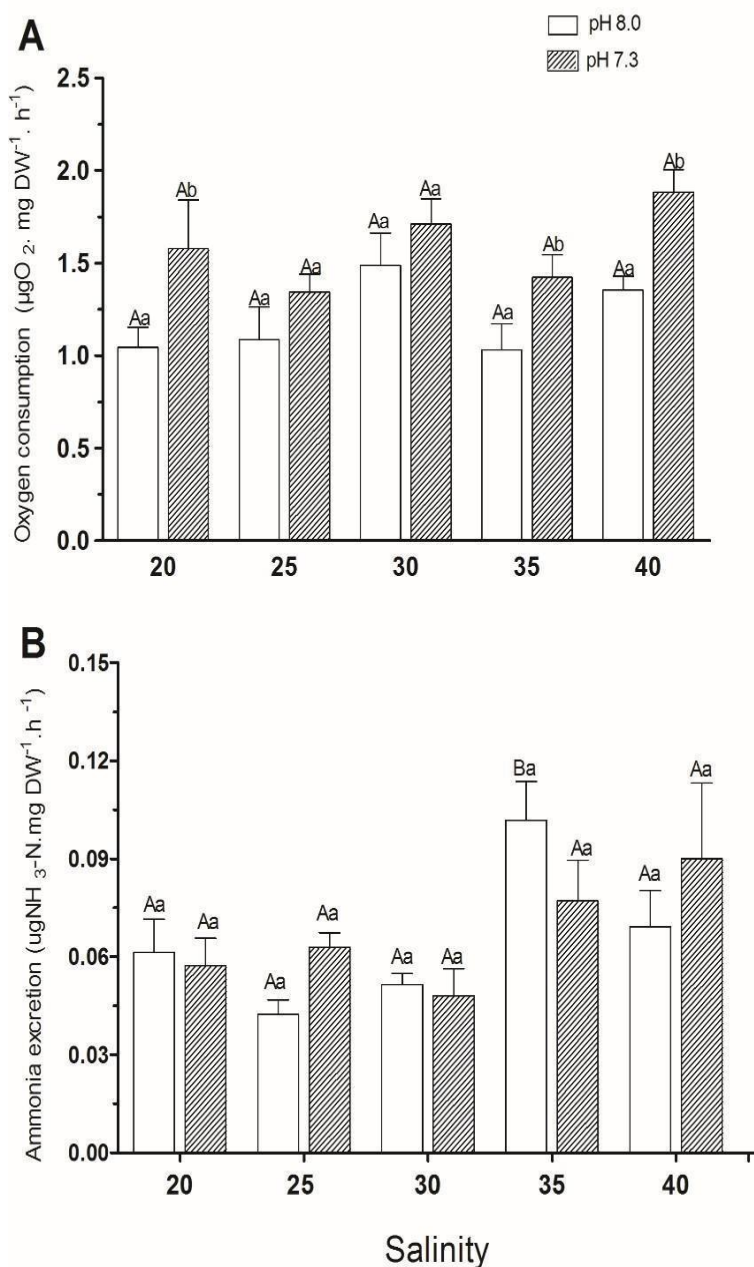


Figura 1: (A) Consumo de massa seca específica de oxigênio ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg DW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) do camarão branco do pacífico, *Penaeus vannamei*, exposto a dois pHs (8,0 e 7,3) e cinco salinidades (20,25,30 ,35 e 40) durante 30 dias (B) Massa seca específica de amônia excretada ($\mu\text{g TAN} \cdot \text{mg DW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) do camarão branco do pacífico, *Penaeus vannamei*, exposto a dois pHs (8,0 e 7,3) e cinco salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante 30 dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e o mesmo pH. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes pHs na mesma salinidade (Média \pm SE, N = 10) ($P < 0,05$).

3.4 CAPACIDADE OSMORREGULATÓRIA

O padrão osmorregulador de *P. vannamei* é mostrado na Figura 2. Em pH controle *P. vannamei* é um forte osmorregulador até uma salinidade de 30, mas em pH 7,3 hipoconformador a partir de uma salinidade de 25. O ponto isosmótico em animais expostos a pH controle (~661,4 mOsm/Kg H₂O) e pH acidificado (658,4 Osm/Kg H₂O) ocorreram próximos à salinidade 20 (700 mOsm/Kg H₂O). A capacidade osmorregulatória dos animais mantidos em pH controle foi de 0,70 e dos animais mantidos em pH reduzido foi de 0,75.

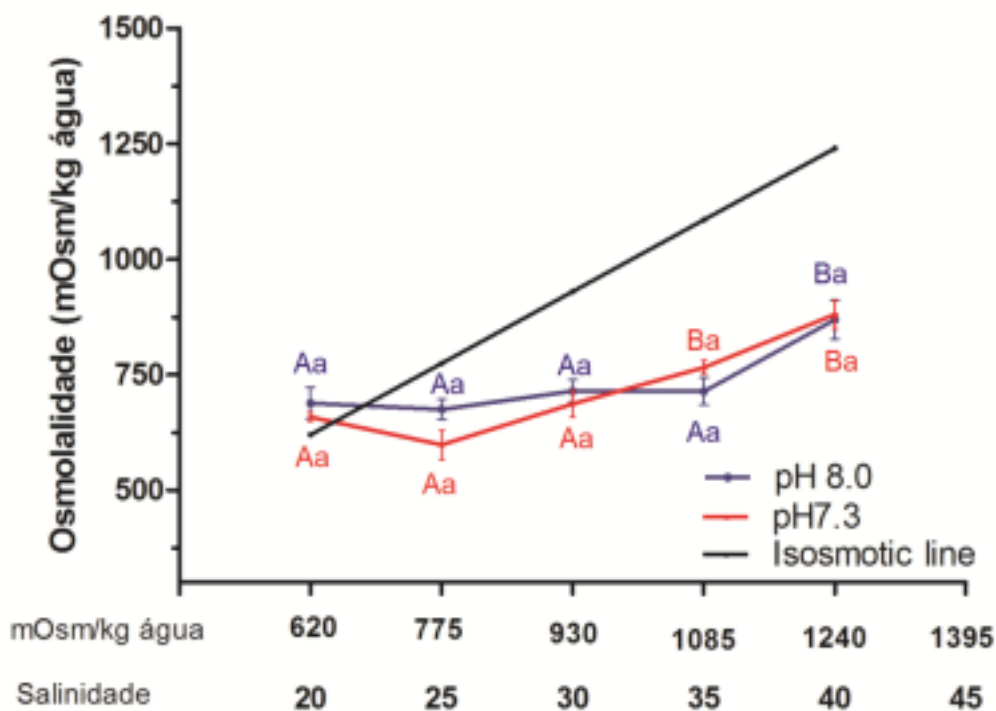


Figura 2. Osmolalidade de *Penaeus vannamei* exposto a dois pHs (8,0 ou 7,3) e cinco salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40) por 30 dias. A osmolalidade utilizada para a linha isosmótica foi de 1‰ salinidade = 31mOsm/ Kg H₂O.

3.5 BALANÇO ENERGÉTICO

A energia ingerida e canalizada para as diferentes funções fisiológicas é mostrada na Figura 3. A salinidade teve um efeito importante na energia ingerida e canalizada para o crescimento e metabolismo. Nesse sentido, os animais mantidos em pH controle e salinidades entre 25 e 40 (cerca de $2,21 \pm 0,15$ kJ/dia)

ingeriram metade da energia dos animais mantidos em 20 ($4,13 \pm 0,17$ kJ/dia). De forma geral, nas salinidades maiores que 20 a energia canalizada para o crescimento foi reduzida, mas a energia canalizada para o metabolismo aumentou ou apresentou forte tendência a aumentar. Comparando-se animais mantidos em diferentes pHs observamos aumentos pontuais em função da salinidade. Os seguintes parâmetros aumentaram em pH reduzido: taxa de defecação (25 e 40 salinidade: +.21 e 13% respectivamente), excreção (25 salinidade: +55%) e metabolismo (20 salinidade: + 58%).

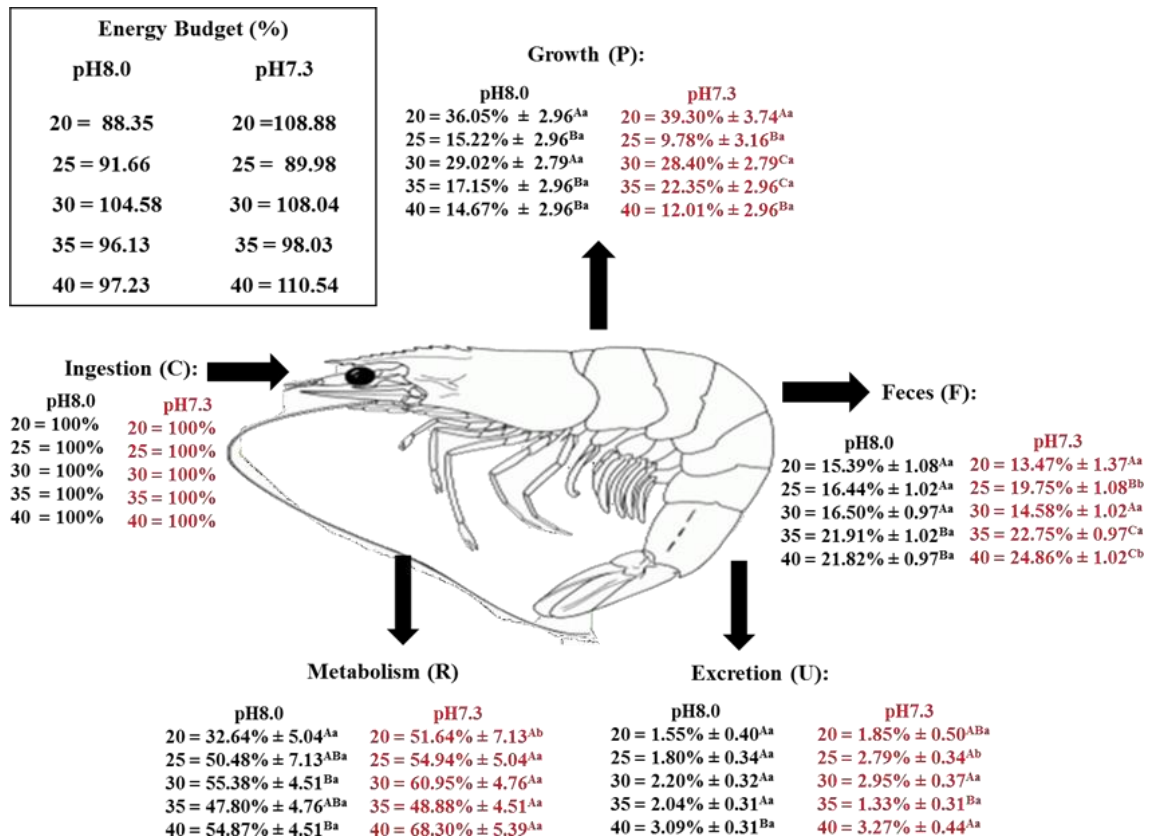


Figura 3. Distribuição de energia (expressa em % da energia ingerida) em camarões *Penaeus vannamei* expostos a dois pHs (8,0 ou 7,3) e cinco salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40) por 30 dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e o mesmo pH. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes pHs na mesma salinidade (Média ± SE, N = 10). ($P \leq 0,05$). Figura ilustrativa: FAO (2010).

4. DISCUSSÃO

Os crustáceos são organismos de extrema importância tanto na aquicultura como na ecologia dos ambientes aquáticos. Trabalhos recentes têm mostrado que o grupo possui diferentes respostas em relação à mudança climática como sobrevivência, alimentação, muda, crescimento, entre outros (Ramaglia et al.

2018; Strefezza et al. 2019; Menu-Courey et al. 2019; Behringer and Duermit-Moreau 2021; Thangal et al. 2022). O presente estudo é o primeiro a utilizar o balanço energético como uma ferramenta para avaliar os impactos da variação de salinidade e acidificação dos oceanos na fisiologia do camarão-brancodo-pacífico (*P. vannamei*), e verificar que tais fatores abióticos alteram a canalização da energia ingerida pelo animal. A análise comparativa dos balanços energéticos mostra que salinidade e pH podem afetar a forma como a energia é canalizada para as diferentes funções. A maior porcentagem de energia ingerida é canalizada para metabolismo, independente da salinidade ou pH. Entretanto a maior parte das diferenças significativas detectadas evidenciam que ocorreu uma modulação dos processos fisiológicos e bioquímicos, o que pode ser explicado pelo fato do camarão *L. vannamei* ter um alto grau de eurialinidade, tolerando diversas salinidades e pHs reduzidos e serem bem resistentes e capazes de se adaptar em diferentes condições (Feng, et al., 2008; Saraswathy et al. 2021; Valle-Gough et al. 2022)

A interação entre variação de salinidade e acidificação oceânica na taxa de ingestão

Conhecer as respostas dos organismos aos múltiplos estressores é fundamental para entendermos como estes se comportaram diante a mudança do clima (Przeslawski et al. 2015; Hurd et al. 2019). No nosso estudo a interação entre os fatores salinidade e pH só influenciou na taxa de alimentação (ver Tabela 3 e 4). Resposta semelhante também foi observada em juvenis de lagostas americanas (*Homarus americanus*) (Waller et al. 2017; Menu-Courey et al. 2019). Já nos animais mantidos na salinidade 30 e pH reduzido foi observado uma redução na taxa de ingestão, possivelmente por uma diminuição das atividades de bombeamento ou comportamental. A interação entre os fatores também alterou a taxa de absorção/alimentação, tendo uma menor taxa de alimentação em salinidades reduzidas em ascídia *Ciona intestinalis* e no mexilhão *Mytilus edulis* (Rastrik al. 2018).

Os Efeitos da salinidade na fisiologia de *P. vannamei*

A salinidade é um dos fatores abióticos mais importantes na fisiologia dos animais aquáticos e determina a distribuição das espécies na natureza principalmente porque afeta parâmetros como o uso da energia, crescimento, metabolismo, imunidade, sobrevivência, reprodução, dentre outros. Aqui nós observamos que nas salinidades superiores a 20 ocorrem reduções nas taxas de ingestão, defecação e

crescimento, bem como alterações no balanço de energia nos animais mantidos.

É possível que as reduções nas taxas de ingestão seja consequência em alterações na obtenção de nutrientes, minerais e energia, contribuindo para a redução do crescimento de *P. Vannamei* em salinidades acima de 20. Alterações na taxa de ingestão em função da salinidade também já foram observadas: em peixes (*Alosa sapidissima*, *Ctenopharyngodon idella*) (Shui et al.2019; Djiba et al.2021), crustáceos (*Daphnia magna*) (Zadereev et al.2022), equinodermos (*Luidia clathrata*) (Honeycutt and Pomory, 2019), moluscos (*Ischadium recurvum*, *Mytella charruana* e *Perna viridis*) (Galimany et al.2018) dentre outros. Alguns autores têm sugerido que variações da salinidade podem afetar a taxa de ingestão alimentar dos animais devido a alterações na palatabilidade do alimento e na quimiorrecepção, mecanismo responsável pela identificação e busca do alimento (Mikhailova and Kasumyan 2010; Kasumyan 2019). Diante da redução na taxa de ingestão os animais poderiam ter usado a energia estocada no hepatopâncreas ou oxidado substratos mais energéticos em suas mitocôndrias. No entanto, o índice hepatossomático e o tipo de substrato energético oxidado (principalmente proteínas) por *P. vannamei* não sofreram alterações relevantes. Alguns autores têm sugerido que espécies podem reduzir a ingestão alimentar devido a menor necessidade de energia para a osmorregulação (Garcia et al. 2014). Em camarões peneídeos como *Penaeus indicus*, *Penaeus monodon* e *Penaeus semisulcatus* aumentos na taxa de crescimento têm sido relacionados com a proximidade do ponto isosmótico (Ye et al. 2009; Anand et al. 2023). Yan et al. (2007) mantiveram *P. vannamei* nas salinidades de 0,2, 11, 21 e 31 e verificaram que as taxas de ingestão e crescimento da espécie é inversamente proporcional à salinidade. Uma das hipóteses dos autores é que quando os animais são expostos a salinidades próximas do seu ponto isosmótico, menos energia é necessária para a osmorregulação, e esta pode ser usada no crescimento (Ye et al. 2009; Anand et al. 2023). Aqui nós observamos que *P. vannamei* é um forte osmorregulador, mas seu ponto isosmótico ocorre próximo da salinidade de 20, situação o que pode explicar nos observarmos um maior crescimento nessa salinidade

A redução da taxa de ingestão de *P. vannamei* mantido em salinidades elevadas também foi acompanhada por um aumento da defecação. No entanto, essas fezes continham menos energia que aquelas dos animais mantidos em água salobra de 20, sugerindo uma melhoria na absorção de substratos energéticos no intestino dos animais. O aumento na taxa de defecação pode ser devido a alterações na digestibilidade, absorção de nutrientes e solubilidades das fibras devido à elevada concentração de sais no intestino, o que poderia afetar o trânsito intestinal (Feng et al. 2008; Shang et al. 2023; Zhang et al. 2023). Alterações na absorção intestinal foram observadas no mexilhão (*Mytilus coruscus*) mantido nas salinidades de 15 e 25

(Sui et al. 2023; Shang et al. 2023). Entretanto as alterações na absorção dos nutrientes exibem diferenças na capacidade de equilibrar as demandas fisiológicas de digestão de alimento, por exemplo, no caranguejo *Cancer magister* baixas salinidades reduz a digestão mecânica e a secreção enzimática dos animais, já no siri *Callinectes sapidus* a permanência em baixas salinidades não afeta a eficiência na absorção de nutriente nem a digestibilidade dos alimentos (Curtis et al.2013).

A salinidade também alterou a o balanço energético de *P. vannamei*. Além do ganho de energia ter sido reduzido nas salinidades maiores que 20, a sua canalização para o crescimento, defecação, excreção e metabolismo também sofreram alterações em algumas salinidades. Uma das coisas mais importantes observadas nesse sentido, é que enquanto na salinidade de 20 os animais canalizam energia igualmente para o crescimento e o metabolismo, nas salinidades maiores (25, 30, 35 e 40) eles passam a canalizar mais energia para o metabolismo (ver Figura3). Tais alterações podem afetar diferentes aspectos da biologia dos animais como a reprodução e o enfrentamento de fatores que imponham desafios à homeostase. No camarão *Penaeus monodon* foi observado que a salinidade teve um efeito imediato e significativo na sobrevivência, crescimento e alocações de energia dos animais, indicando que uma faixa de salinidade fora de 20 a 30 aumentará a energia canalizada para respiração, excreção e exúvias e, reduzindo significativamente o crescimento e a eficiência da conversão alimentar (Ye et al. 2009). No camarão marrom *Crangon crangon* também foi observado que salinidades abaixo do seu ponto isosmótico (salinidade 21) ocorre um aumento na demanda de energia que foi relacionado com o aumento no metabolismo devido manutenção osmótica em baixas salinidades (Reiser et al.2017).

A salinidade é um dos fatores abióticos mais importantes na aquicultura, pois como foi visto níveis ótimos afetam diretamente o crescimento, a sobrevivência e a eficiência de produção e muitas vezes são específicos da espécie (Okomoda et al., 2020). Além de que a manutenção da homeostase em diferentes salinidades tem um custo energético alto, pois perturba o equilíbrio osmótico nos organismos aquáticos. Prevê-se que o nível do mar e o aumento das precipitações afete as instalações de produção na aquicultura, por meio da intrusão de água salina (Kibria et al., 2017) ou do aumento na entrada de água doce nos viveiros. Portanto, a alteração de salinidade pode trazer prejuízos para a produção, levando a custos mais altos e menores ganhos econômicos (Maulu et al.2021).

A variação da salinidade também pode diferentes tipos de ecossistemas, resultando em mudanças na composição de espécies, abundância e distribuição de organismos, produtividade e mudanças fenológicas que podem ameaçar além da produção da aquicultura terrestre e marinha a biodiversidade dos

ambientes naturais (Doneyet al., 2012). Com os nossos resultados conseguimos entender como as alterações salínicas irá afetar diretamente a espécie indicar qual a melhor salinidade para uma produção saudável e rentável. Além disso, entender esses efeitos é importante para saber quais as espécies serão resilientes e melhores para a sustentabilidade na produção aquícola.

Os Efeitos da acidificação oceânica na fisiologia de *P. vannamei*

O pH é um importante fator abiótico que modula as atividades bioquímicas e enzimáticas dos animais. Nos crustáceos, o pH dos fluídos corporais é regulado principalmente pelas brânquias por meio de transportadores de membrana, bombas e canais de íons que são responsáveis pela compensação ativamente a queda do pH corporal, aumentando o transporte dos íons de H^+ ou de HCO^- , ambos diretamente relacionados ao transporte de Na^+ e Cl^- e as bombas de Na/K -ATPase e a V /ATPase. (Freire et al 2008; Henry et al., 2012). De acordo com as últimas previsões do IPCC (2018) o pH da superfície da água pode ser reduzido de até 0,4 unidade antes de 2100 e 0,7 unidade até 2300. Animais que forem incapazes de manter o pH dos seus fluídos corporais em níveis ótimos poderão sofrer alterações em seus processos bioquímicos, afetando também aspectos da fisiologia como visto em várias espécies de crustáceos (Bhuiyan et al. 2022; Weerathunga et al. 2023;). Aqui nós observamos que a redução do pH de 8.0 para 7.3 afetou principalmente o consumo de oxigênio, a osmorregulação e o balanço energético de *P. vannamei*.

O consumo de oxigênio é uma medida indireta do metabolismo e costuma sofrer variações em situações que impõem desafios à homeostase dos animais. Esse parâmetro fisiológico fornece informações importantes para a compreensão das repostas dos animais em relação a exposição a estressores ambientais, bem-estar- animal, manejo do cultivo, entre outros fatores (Waller et al. 2017; Augusto et al. 2020; Mantoan et al. 2021;). Em *P. vannamei* a exposição ao pH reduzido causou um aumento de até 60% do consumo de oxigênio em comparação aos animais mantidos em pH controle nas salinidades de 20, 35 e 40. Essa resposta também já foi observada nos caranguejos *Paralithodes camtschaticus* e *Paralithode platypus* (Long et al. 2019), no mexilhão *M. coruscus* (Tang et al. 2022), no peixe *Dicentrarchus labrax* (Crespel et al 2019), dentre outros. O aumento no consumo de oxigênio pode ser devido a um aumento da demanda energética em animais expostos ao pH reduzido, como por exemplo a regulação do pH (Knapp et al., 2015; Klymasz-Swartz et al., 2019; Allen et al., 2020). Diferentemente de *P. vannamei*, em muitas espécies como o siri *C. danae* (Ramaglia et al. 2018), no mexilhão *Mytilus edulis* (Gu et al. 2019) e a lagosta *Jasus*

lalandii (Knapp et al. 2015) são observadas reduções no consumo de oxigênio após exposição ao pH reduzido. Tais reduções costumam ser devido a uma diminuição de afinidade entre o oxigênio e a hemocianina ou a danos estruturais nas brânquias como infiltração de hemócitos, edema, inflamação, lamelas fundidas, entre outras (Kathyayani et al. 2019).

Quando *P. vannamei* foi exposto ao pH reduzido e mantido nas salinidades de 25 e 30, o consumo de oxigênio permaneceu inalterado, sugerindo que os animais não foram capazes de aumentar o suprimento de energia para os mecanismos ativos. Nessas salinidades, bem como em 35, os animais mantidos em pH reduzido reduzem a capacidade de hiporregular a osmolalidade de hemolinfa e passaram a hipoconformar. Tal perda da capacidade osmorregulatória após exposição ao pH reduzido também já foi descrito no siri *Callinectes danae* (Ramaglia et al., 2018). Essas alterações podem ocorrer porque transportadores como a Na^+/H^+ são compartilhados pela osmorregulação e pelo controle ácido-base (Ramaglia et al., 2018). Nos camarões *Palaemon elegans* e *P. serratus* foi observado que a compensação da redução do pH da hemolinfa ocorre por meio de mecanismos ativos de trocas iônicas mantendo a homeostase iônica quando expostos a hipercapnia (Dissanayake and Ishimatsu 2011). A perda da capacidade osmorregulatória é uma resposta preocupante porque os animais osmorreguladores possuem maior capacidade de invadir e migrar novos ambientes, além da osmorregulação ser considerado um mecanismo fisiológico que gasta mais energia que a osmoconformação, que é dependente de osmólitos intracelulares (Rivera-Ingraham and Lignot, 2017).

O balanço energético de *P. vannamei* exposto ao pH acidificado sofreu alterações em relação aos animais mantidos em pH controle em algumas salinidades. O pH acidificado causou aumento da energia perdida nas fezes e excreção, bem como da energia investida no metabolismo. Tal investimento no metabolismo pode estar relacionado ao enfrentamento às mudanças causadas na biologia do animal e também a uma possível regulação do pH. No gastrópode *Austrocochlea concamerata* e nos ouriços-do-mar *Strongylocentrotus intermedius* e *Tripneustes gratilla* a exposição ao pH reduzido causou uma diminuição no balanço de energia devido à redução da taxa de alimentação e assimilação de energia, indicando estados bioenergéticos insustentáveis e afetando o crescimento (Leug et al. 2020, Zhang et al. 2022). Entretanto, nos nossos resultados a exposição ao pH reduzido não afetou a energia canalizada para o crescimento da espécie. Essa é uma resposta importante e que mostra resiliência da espécie à acidificação oceânica, pelo menos durante o período de 30 dias. Portanto, embora mecanismos como osmorregulação e a energia canalizada para defecação, excreção e metabolismo tenham sido afetados pelo pH reduzido, a energia canalizada para o crescimento foi poupada em *P. vannamei*.

Nós concluímos o balanço energético mostrou-se uma boa ferramenta para avaliar os impactos da mudança climática, podendo ser empregado na compreensão dos fluxos de energia diante de estressores ambientais. Através dele e dos parâmetros necessários para seu cálculo foi possível observar que em *P. vannamei* a salinidade afeta de forma acentuada as taxas de ingestão, defecação e crescimento e o pH afeta mais o metabolismo e a osmorregulação. Esses resultados são um alerta diante das previsões referentes à mudança climática, porque foram observados em salinidades que são encontrados na natureza (Pousse et al. 2020; Leung et al. 2020; Shang et al. 2023). Percebemos também que a combinação das variáveis não foi acentuada, a maioria dos efeitos da variação de salinidade e do pH reduzido foram independentes. Outro ponto importante, é que praticamente todas as respostas medidas não tiveram uma linearidade sugerindo fortemente que a maior parte das diferenças significativas detectadas indica uma modulação dos processos fisiológicos e bioquímicos, o que pode ser explicado pelo fato dos organismos serem bem resistentes e capazes de se adaptar em diferentes condições.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the University of São Paulo - Campus Ribeirão Preto, for all the support offered during the measurements of hemolymph osmolality; professor Unesp Aquaculture Center (CAUNESP) and professor Dr. Wagner Valenti, for the energy analyzes.

FUNDING

The authors acknowledge the funding of the H2020/Aquavivae project; FAPESP 2019/26801-6 and CAPES for funding the research.

DECLARATIONS

Conflict of interest: The authors Andressa Cristina Ramaglia; Caterina do Valle Trotta; Juliana Rodrigues; Emanuelle Borges; Ana Carolina Louzã; Michelle Roberta dos Santos; Patrícia Moraes-Valenti, Alessandra Augusto, declare no competing interest.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abdelrahman HA, Abebe A, Boyd, CE (2019) Influence of variation in water temperature on survival, growth and

- yield of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in inland ponds for low-salinity culture. *Aquac Res* 50(2): 658- 672.
- Allen GJ, Kuan PL, Tseng YC, Hwang PP, Quijada-Rodriguez AR, Weihrauch D (2020) Specialized adaptations allow vent-endemic crabs (*Xenograpsus testudinatus*) to thrive under extreme environmental hypercapnia. *Sci Rep* 10(1): 1-13
- Anand PS, Aravind R, Balasubramanian CP, Kumar S, Antony J, Biju IF, Vijayan KK (2023) Growth, survival, and osmo-ionic regulation in post larval and juvenile Indian white shrimp, *Penaeus indicus*, reared under three levels of salinity in a semifloc system. *Aquaculture* 564 :739042.
- Antony J, Vungurala H, Saharan N, Reddy AK, Chadha NK, Lakra WS, Roy LA (2015) Effects of salinity and Na⁺/K⁺ ratio on osmoregulation and growth performance of black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, juveniles reared in inland saline water. *J World Aquac Soc* 46(2): 171-182
- Augusto A, New MB, Santos MR, Amorim RV, Valenti WC (2020) Energy budget and physiology in early ontogenetic stages of the Amazon river prawn. *Aquac Rep* 18:100446
- Bao J, Li X, Yu H, Jiang H (2018) Respiratory metabolism responses of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* and Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, subjected to environmental hypoxia stress. *Front Physiol* 9: 1559
- Behringer DC, Duermit-Moreau E (2021) Crustaceans, one health and the changing ocean. *J Invertebr Pathol* 186: 107500.
- Bhuiyan MKA., Rodríguez BM, Billah MM, Pires A, Freitas R, Conradi M (2022) Effects of ocean acidification on the biochemistry, physiology and parental transfer of *Ampelisca brevicornis* (Costa, 1853). *Environ. Pollut*, 293, 118549.
- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425(6956): 365-365.
- Chong-Robles J, Charmantier G, Boulo V, Lizárraga-Valdéz J, Enríquez-Paredes LM, Giffard-Mena I (2014) Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*. 422: 261-267.
- Cochrane K, De Young C, Soto D, Bahri T (2009) Climate change implications for fisheries and aquaculture. *FAO Fisheries and aquaculture technical paper* 530: 212.
- Coelho RTI, Yasumaru FA, Passos MJACR, Gomes V, Lemos D (2019) Energy budgets for juvenile Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* fed different diets. *Braz. J. Oceanogr* 67.
- Crespel A, Anttila K, Lelièvre P, Quazuguel P, Le Bayon N, Zambonino-Infante JL, Chabot D, Claireaux G (2019) Long-term effects of ocean acidification upon energetics and oxygen transport in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus). *Mar Biol*, 166, 1-12.
- Dawood MA, Koshio S (2016) Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquaculture* 454: 243-251.
- Dawood MA (2021) Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. *Rev Aquac* 13(1): 642-663.
- de la Haye K, Spicer JI, Widdicombe S, Briffa M (2012) Reduced pH sea water disrupts chemo-responsive behavior in an intertidal crustacean. *J Exp Mar Biol* 412: 134-140.
- Dickson AG, Millero FJ (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Res* 34(10): 1733-1743.

- Dickson AG (1990) Standard potential of the reaction: $\text{AgCl (s)} + 12\text{H}_2 \text{(g)} = \text{Ag (s)} + \text{HCl (aq)}$, and the standard acidity constant of the ion HSO^- in synthetic sea water from 273.15 to 318.15 K. *J Chem Thermodyn* 22(2): 113-127.
- Dissanayake A, Ishimatsu A (2011) Synergistic effects of elevated CO_2 and temperature on the metabolic scope and activity in a shallow-water coastal decapod (*Metapenaeus joyneri*; Crustacea: Penaeidae). *ICES Mar Sci Symp* 68(6): 1147-1154.
- Donohue CG, Partridge GJ, Sequeira AMM (2021) Bioenergetic growth model for the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture* 531: 735884.
- Doney SC, Ruckelshaus M, Emmett Duffy J, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, Polvina J, Rabalais NN, Sydeman WJ, Talley LD (2012) Climate change impacts on marine ecosystems. *Annual review of marine science*, 4, 11-37.
- Doo SS, Kealoha A, Andersson A, Cohen AL, Hicks TL et al (2020) The challenges of detecting and attributing ocean acidification impacts on marine ecosystems. *ICES Mar Sci Symp* 77(7-8): 2411-2422.
- Du L, Niu CJ (2002) Effects of dietary protein level on bioenergetics of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)(Decapoda, Natantia). *Crustaceana*, 75(7): 875-889.
- FAO (2022) The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.
- Feng C, Tian X, Dong S, Su Y, Wang F, Ma S (2008). Effects of frequency and amplitude of salinity fluctuation on the growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac Res* 39(15): 1639-1646.
- Findlay HS, Turley C (2021) Ocean acidification and climate change. *Climate Change Elsevier* 251-279
- Freire CA, Onken H, McNamara JC (2008) A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 151(3), 272-304.
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC (2003). Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 136:771–778.
- Furtado PS, Gaona CA, Serra FP, Poersch LH, Wasielesky JW (2017) Acute toxicity of carbon dioxide to juvenile marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Mar Freshw Behav Physiol* 50(4): 293-301.
- Galappaththi EK, Ichien ST, Hyman AA, Aubrac CJ, Ford JD (2020) Climate change adaptation in aquaculture. *Rev Aquac* 12(4): 2160-2176.
- Galimany E, Lunt J, Domingos A, Paul VJ (2018) Feeding behavior of the native mussel *Ischadium recurvum* and the invasive mussels *Mytella charruana* and *Perna viridis* in FL, USA, across a salinity gradient. *Estuaries Coast.* 41, 2378-2388.
- Garcia AB, Partridge GJ, Flik G, Roques JA, Abbink W (2015) Salinidade ambiente e osmorregulação, metabolismo energético e crescimento em juvenis de peixe-rei (*Seriola lalandi Valenciennes 1833*) em um sistema de aquicultura de recirculação. *Aquac Res* 46 (11), 2789-2797.
- Gattuso JP, Magnan A, Billé R, Cheung WW, Howes EL, Joos F, Turley C (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO_2 emissions scenarios. *Science* 349(6243): aac4722.
- Gnaiger E (1983) Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In *Polarographic oxygen sensors: aquatic and physiological applications* (pp. 337-345). Springer Berlin Heidelberg.
- Gran G (1950) Determination of the equivalent point in potentiometric titrations. *Acta Chem Scand* 4:559–577.

- Gu H, Shang Y, Clements J, Dupont S, Wang T, Wei S, Wang X, Chen J, Huang W, Hu M, Wang, Y (2019) Hypoxia aggravates the effects of ocean acidification on the physiological energetics of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull* 149, 110538.
- Hall-Spencer JM, Harvey BP (2019) Ocean acidification impacts on coastal ecosystem services due to habitat degradation. *Emerg Top Life Sci* 3(2): 197-206.
- Hans S, Fehsenfeld S, Treberg JR, Weihrauch D (2014) Acid–base regulation in the Dungeness crab (*Metacarcinus magister*). *Mar Biol* 161(5): 1179-1193.
- He Y, Wang Q, Li J, Li Z (2022). Comparative proteomic profiling in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* under low pH stress. *Fish Shellfish Immunol* 120: 526-535.
- Henry RP, Lucu Č, Onken H, Weihrauch D (2012) Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physiol*, 3, 431.
- Honeycutt NR, Pomory CM (2019) Effects of salinity and feeding on arm regeneration in the starfish *Luidia clathrata* (Say, 1825)(Echinodermata: Asteroidea). *Mar Freshw Behav Physiol* 52(1), 37-51.
- Hsieh HH, Weerathunga V, Weerakkody WS, Huang WJ, Muller FL, Benfield MC, Hung CC (2021). The effects of low pH on the taste and amino acid composition of tiger shrimp. *Sci Rep* 11(1): 1-9.
- Hu MY, Tseng YC, Su YH, Lein E, Lee HG, Lee JR, Dupont S, Stumpp M (2017). Variability in larval gut pH regulation defines sensitivity to ocean acidification in six species of the Ambulacraria superphylum. *Proc R Soc B* 284:20171066.
- Hurd CL, Beardall J, Comeau S, Cornwall CE, Havenhand JN, Munday PL, Parker LM, Raven JA McGraw CM (2019) Ocean acidification as a multiple driver: how interactions between changing seawater carbonate parameters affect marine life. *Mar Freshw Res* 71(3): 263-274.
- IPCC (2022) *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3056 pp., doi:10.1017/9781009325844.
- Jaeckle W (2017) Physiology of larval feeding. In *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae*, ed. T Carrier, A Reitzel, A Heyland A, pp. 124–41. Oxford, UK: Oxford Univ. Press
- Jaffer YD, Saraswathy R, Ishfaq M, Antony J, Bundela DS, Sharma PC (2020) Effect of low salinity on the growth and survival of juvenile pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*: A revival. *Aquicultura* 515: 734561.
- Jakubowska M, Normant-Saremba M (2015). The effect of CO₂-induced seawater acidification on the behaviour and metabolic rate of the Baltic clam *Macoma balthica*. *Annales Zoologici Fennici* 52 :353–367
- Kangpanich C, Pratoomyot J, Siranonthana N, Senanan W (2016). Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *PeerJ* 4: e2735.
- Kathyayani SA, Poornima M, Sukumaran S, Nagavel A, Muralidhar M (2019). Effect of ammonia stress on immune variables of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* under varying levels of pH and susceptibility to white spot syndrome virus. *Ecotoxicol Environ Saf* 184: 109626.
- Kasumyan AO (2019) The taste system in fishes and the effects of environmental variables. *J Fish Biol* 95(1), 155-

- Kibria G, Haroon AKY, Nuggeoda D (2017). Climate change impacts on tropical and temperate fisheries, aquaculture, and seafood security and implications-A review. *Livest Res Rural Dev* 29, 1-29.
- Klymasz-Swartz AK, Allen GJ, Treberg JR, Yoon GR, Tripp A, Quijada-Rodriguez AR, Weihrauch D (2019). Impact of climate change on the American lobster (*Homarus americanus*): Physiological responses to combined exposure of elevated temperature and pCO₂. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 235: 202-210.
- Knapp JL, Bridges CR, Krohn J, Hoffman LC, Auerswald L (2015) Acid–base balance and changes in haemolymph properties of the South African rock lobsters, *Jasus lalandii*, a palinurid decapod, during chronic hypercapnia. *Biochem Biophys Res Commun* 461(3): 475-480.
- Kong N, Han S, Fu Q, Yu Z, Wang L, Song L (2022) Impact of ocean acidification on the intestinal microflora of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 546: 737365.
- Koroleff F (1976) Determination of nutrients. *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie Weinheim 1–3.
- Lemos D, Netto B, Germano A (2006) Energy budget of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed live food. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144: 33-40.
- Lemos D, Phan VN (2001) Energy partitioning into growth, respiration, excretion and exuvia during larval development of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture* 199: 131-143.
- Levine DM, Sulkin SD (1979) Partitioning and utilization of energy during the larval development of the xanthid crab, *Rithropanopeus harrisi* (Gould). *J Exp Mar Biol Ecol* 40: 247-257
- Letcher TM, Williamson A (2004) Forms and Measurement of Energy. In: *Encyclopedia of Energy*, Cleveland, C.J. (ed.), New York: Elsevier, p. 739-748
- Leung JY, Russell BD, Connell SD (2020) Linking energy budget to physiological adaptation: how a calcifying gastropod adjusts or succumbs to ocean acidification and warming. *Sci Total Environ* 715: 136939.
- Li F, Huang J, Wang M, Chen L, Xiao Y (2021) Sources, distribution and dynamics of antibiotics in *Litopenaeus vannamei* farming environment. *Aquaculture* 545: 737200.
- Lignot JH, Spanings-Pierrot C, Charmantier G (2000) Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191:209–245
- Lin W, Ren Z, Mu C, Ye Y, Wang C (2020) Effects of Elevated p CO₂ on the Survival and Growth of *Portunus trituberculatus*. *Front Physiol* 11: 750.
- Louis F, Devin S, Giambérini L, Potet M, David E, Pain-Devin S (2019) Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. *Environ Pollut* 245, 889-897.
- Long WC, Pruisner P, Swiney KM, Foy RJ (2019) Effects of ocean acidification on the respiration and feeding of juvenile red and blue king crabs (*Paralithodes camtschaticus* and *P. platypus*). *ICES J Mar Sci* 76(5), 1335-1343.
- Lowder KB, Allen MC, Day J, Deheyn DD, Taylor JR (2017) Assessment of ocean acidification and warming on the growth, calcification, and biophotonics of a California grass shrimp. *ICES J Mar Sci* 74(4): 1150-1158.
- Lucas A (1996) *Bioenergetics of Aquatic Animal* (1^a ed), Londres, Reino Unido.
- Mangi SC, Lee J, Pinnegar JK, Law RJ, Tyllianakis E, Birchenough SN (2018) The economic impacts of ocean acidification on shellfish fisheries and aquaculture in the United Kingdom. *Environ Sci Policy* 86: 95-105.
- Mantoan P, Ballester E, Ramaglia AC, Augusto A (2021) Diet containing 35% crude protein improves energy balance, growth, and feed conversion in the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquac*

Rep 21: 100962.

- Maulu S, Hasimuna OJ, Haambiya LH, Monde C, Musuka CG, Makorwa TH, Munganga BP, Phiri KJ, Nsekanabo JD (2021) Climate change effects on aquaculture production: sustainability implications, mitigation, and adaptations. *Front sustain. food syst* 5, 609097.
- Mayzaud P, Conover R (1988) O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar Ecol Prog Ser* 45:289–302. doi: 10.3354/meps045289
- Menu-Courey K, Noisette F, Piedalue S, Daoud D, Blair T, Blier PU, Zetsu-Scott K, Calosi P (2019) Energy metabolism and survival of the juvenile recruits of the American lobster (*Homarus americanus*) exposed to a gradient of elevated seawater pCO₂. *Mar Environ Res* 143: 111-123.
- Miller SH, Zarate S, Smith EH, Gaylord B, Hosfelt JD, Hill TM (2014) Effect of elevated p CO₂ on metabolic responses of porcelain crab (*Petrolisthes cinctipes*) larvae exposed to subsequent salinity stress. *PLoS one* 9(10): e109167.
- Mikhailova ES, Kasumyan AO (2010) Taste preferences and feeding behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* in marine and fresh waters. *J Ichthyol* 50:795-807.
- Muralisankar T, Kalaivani P, Thangal SH, Santhanam P (2021). Growth, biochemical, antioxidants, metabolic enzymes and hemocytes population of the shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acidified seawater. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 239: 108843.
- Porteus CS, Roggatz CC, Velez Z, Hardege JD, Hubbard PC (2021). Acidification can directly affect olfaction in marine organisms. *J Exp Biol* 224(14): jeb237941.
- Pousse E, Poach ME, Redman DH, Sennefelder G, White LE, Lindsay JM, Munroe D, Hart D, Hennen D, Dixon MS, Li Y, Wikfors GH, Meseck SL (2020) Energetic response of Atlantic surfclam *Spisula solidissima* to ocean acidification. *Mar Pollut Bull* 161: 111740.
- Prakash S, Kumar A, Okla MK, Ahmad A, Abbas ZK, Al-Ghamdi AA, Beemster G, AbdElgawad H (2022) Physiological responses of the symbiotic shrimp *Ancyllocaris brevicarpalis* and its host sea anemone *Stichodactyla haddoni* to ocean acidification. *Mar Pollut Bull* 175: 113287.
- Przeslawski R, Byrne M, Mellin C (2015) A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob Chang Biol* 21(6): 2122-2140.
- Ravichandran P (2012) Overview of *Litopenaeus vannamei* culture practice and importance of Govt. regulation measures. Management of emerging diseases of shrimp with special reference to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.
- Ramaglia AC, de Castro LM, Augusto A (2018) Effects of ocean acidification and salinity variations on the physiology of osmoregulating and osmoconforming crustaceans. *J Comp Physiol B* 188: 729-738.
- Reiser S, Mues A, Herrmann JP, Eckhardt A, Hufnagl M, Temming A (2017) Salinity affects behavioral thermoregulation in a marine decapod crustacean. *J. Sea Res* 128, 76-83
- Richards RG, Davidson AT, Meynecke JO, Beattie K, Hernaman V, Lynam T, van Putten IE (2015) Effects and mitigations of ocean acidification on wild and aquaculture scallop and prawn fisheries in Queensland, Australia. *Fish Res* 161: 42-56.
- Rodrigues LC, Van Den Bergh JC, Massa F, Theodorou JA, Ziveri P, Gazeau F (2015) Sensitivity of Mediterranean bivalve mollusc aquaculture to climate change, ocean acidification, and other environmental pressures: findings from a producer survey. *J Shellfish Res* 34(3): 1161-1176.

- Rosa R, Marques A, Nunes ML (2012) Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Rev Aquac* 4(3): 163- 177.
- Roy LA, Davis DA, Saoud IP, Henry RP (2007) Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture* 262(2-4): 461-469.
- Saraswathy R, Muralidhar M, Balasubramanian CP, Rajesh R, Sukumaran S, Kumararaja P, Vijayan KK (2021) Osmo- ionic regulation in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, exposed to climate change-induced low salinities. *Aquac Res* 52(2): 771-782.
- Shang Y, Wang X, Shi Y, Huang W, Sokolova I, Chang X, Wang Y (2023) Ocean acidification affects the bioenergetics of marine mussels as revealed by high-coverage quantitative metabolomics. *Sci Total Environ* 858: 160090.
- Shang Y, Wang X, Chang X, Sokolova IM, Wei S, Liu W, Fang JK, Hu M, Huang W, Wang Y (2021) The effect of microplastics on the bioenergetics of the mussel *Mytilus coruscus* assessed by cellular energy allocation approach *Frontiers in Marine Science* 8, 754789
- Shui B, Wang Y, Lou F, Han Z (2022) Salinity fluctuation on the genetic regulatory mechanisms of the crustacean, *Charybdis japonica*. *Front Mar Sci* 1202.
- Sui Y, Kong H, Huang X, Dupont S, Hu M, Storch D, Portner HO, Lu W, Wang Y (2016) Combined effects of short- term exposure to elevated CO₂ and decreased O₂ on the physiology and energy budget of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Chemosphere* 155: 207-216.
- Sui Y, Zhang T, Yao X, Yan M, Yang L, Mohsen M, Nguyen H, Zhang S, Jiang H, Lv L, Zheng, L (2022) Synthesized effects of medium-term exposure to seawater acidification and microplastics on the physiology and energy budget of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Environ Pollut* 308, 119598.
- Strefezza TF, De Andrade IM, Augusto A (2019) Reduced pH and elevated salinities affect the physiology of intertidal crab *Minuca mordax* (Crustacea, Decapoda). *Mar Freshw Behav Physiol* 52(5): 241-254.
- Talbot SE, Widdicombe S, Hauton C, Bruggeman J (2019) Adapting the dynamic energy budget (DEB) approach to include non-continuous growth (moulting) and provide better predictions of biological performance in crustaceans. *ICES J Mar Sci* 76(1): 192-205.
- Tang Y, Du X., Sun S., Shi W., Han Y., Zhou W, Zhang J, Teng S, Ren P, Liu G (2022) Circadian rhythm and neurotransmitters are potential pathways through which ocean acidification and warming affect the metabolism of thick-shell mussels. *Environ Sci Technol* 56(7), 4324-4335.
- Thangal SH, Muralisankar T, Anandhan K, Gayathri V, Yogeshwaran A (2022) Effect of CO₂ driven ocean acidification on the mud crab *Scylla serrata* instars. *Environ Pollut* 312: 119995.
- Tripp A, Allen GJ, Quijada-Rodriguez AR, Yoon GR, Weihrauch D (2022) Effects of single and dual-stressor elevation of environmental temperature and PCO₂ on metabolism and acid-base regulation in the Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol Part A: Mol Integr Physiol* 266: 111151.
- Valenti WC, Barros HP, Moraes-Valenti P, Bueno GW, Cavalli RO (2021) Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquac Rep* 19: 100611.
- Valle-Gough RE, Samaniego-Gómez BY, Apodaca-Hernández JE, Chiappa-Carrara FX, Rodríguez-Dorantes M, Arena- Ortiz ML (2022). RNA-Seq Analysis on the Microbiota Associated with the White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Different Stages of Development. *Appl Sci* 12(5): 2483.

- Vlaeminck K, Viaene KP, Van Sprang P, De Schampheleere KA.(2021).Development and validation of a mixture toxicity implementation in the dynamic energy budget–individual-based model: Effects of copper and zinc on *Daphnia magna* populations. *Environ. Toxicol. Chem* 40(2), 513-527.
- Waller JD, Wahle RA, McVeigh H, Fields DM (2017). Linking rising pCO₂ and temperature to the larval development and physiology of the American lobster (*Homarus americanus*). *ICES J Mar Sci* 74(4): 1210-1219.
- Weihrauch D, Fehsenfeld S, Quijada-Rodriguez A (2017) Nitrogen excretion in aquatic crustaceans. *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates: Mechanisms and Strategies in Various Invertebrate Groups with Considerations of Challenges Caused by Ocean Acidification* 1-24.
- Weerathunga V, Hung CC, Dupont S, Hsieh HH, Piyawardhana,N., Yuan FL, Kao KJ, Huang KC, Huang WJ (2023) Ocean acidification increases inorganic carbon over organic carbon in shrimp's exoskeleton. *Mar Pollut Bull* 192, 115050.
- Whiteley NM (2011) Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. *Mar Ecol Prog Ser* 430: 257-271.
- Widdows J, Johnson D (1988) Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar Ecol Prog Ser* 113-121.
- Xue S, Ding J, Li J, Jiang Z, Fang J, Zhao F, Mao Y (2021) Effects of live, artificial and mixed feeds on the growth and energy budget of *Penaeus vannamei*. *Aquac Rep* 19: 100634.
- Yan B, Wang X, Cao M (2007) Effects of salinity and temperature on survival, growth, and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *J Shellfish Res* 26(1): 141-146.
- Ye L, Jiang S, Zhu X, Yang Q, Wen W, Wu K (2009) Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 290(1-2): 140-144.
- Yu Q, Xie J, Huang M, Chen C, Qian D, Qin JG, Li E (2020) Growth and health responses to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Rep* 16: 100280.
- Zhang T, Wang X, Qu Y, Zhang X, Zhang Q, Yang D, Zhao J (2023). Intestinal microbiota perturbations in the gastropod *Trochus niloticus* concurrently exposed to ocean acidification and environmentally relevant concentrations of sulfamethoxazole. *Chemosphere* 311: 137115.
- Zhang L, Zhao Z, Xiong D, Fang W, Li B, Fan Q, Yang K, Wang, X (2011) Effects of ration level on growth, nitrogenous excretion and energy budget of juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquac Res* 42(7): 899-905.
- Zhu C, Dong S, Wang F, Huang G (2004) Effects of Na/K ratio in seawater on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 234(1-4): 485-496.

CAPÍTULO 3

Os efeitos dos microplásticos na fisiologia de invertebrados mantidos em diferentes salinidades

Revista de referência: Marine Pollution Bulletin |

Os efeitos dos microplásticos na fisiologia de invertebrados mantidos em diferentes salinidades

Ramaglia, A.C.¹, Louzã, A. C.³, Leite, H.S.¹, Borges, E.P.³, Rodrigues, J.³, Araujo, M.¹, Augusto, A.^{1,2,3}

¹Centro de Aquicultura da Unesp- UNESP - Universidade Estadual Paulista- Jaboticabal, SP, Brasil.

²Instituto de Biociências do Litoral Paulista–UNESP - Universidade Estadual Paulista - São Vicente, SP, Brasil.

³Instituto de Biociências de Botucatu, –UNESP - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo, Brasil.

Corresponding author: andressa.cr.mota@unesp.br (A. C. Ramaglia)

RESUMO

Os microplásticos estão se tornando um problema emergente global, principalmente porque muitos dos seus efeitos na biologia dos animais aquáticos ainda não são compreendidos. Neste trabalho investigamos os efeitos do microplástico poliestileno (0 e 40 mg/L) na fisiologia de moluscos e crustáceos marinhos e estuarinos (*Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*) mantidos nas salinidades em que são encontrados na natureza (20, 25, 30, 35 e 40) durante 10 dias. Os seguintes parâmetros fisiológicos foram investigados: osmorregulação, metabolismo, excreção de amônia e tipo de substrato energético oxidado. Verificamos que os efeitos do microplástico na fisiologia dos invertebrados são bastante dependentes da salinidade, mas não encontramos um padrão de alterações nos mecanismos fisiológicos dos animais expostos ao microplástico em função do seu habitat natural ou grupo taxonômico porque as respostas foram espécie-específicas. De forma geral, a presença do microplástico não afetou o padrão osmorregulatório dos animais, mas foram observadas alterações pontuais em algumas salinidades. Por exemplo, no mexilhão *P. perna* (salinidade 20) e no caranguejo entre-marés *L. thayeri* (salinidades 30 e 35) ocorreram perdas da capacidade osmorregulatória, provavelmente devido à redução no consumo de oxigênio e consequente indisponibilidade de ATP para os mecanismos de absorção/secreção de sal. O metabolismo foi o parâmetro fisiológico mais afetado em todas as espécies expostas ao microplástico e foi dependente da salinidade em que os animais estavam. De forma geral, a ostra *C. gasar* foi a menos afetada pelo microplástico (alteração somente na salinidade de 20) e *L. thayeri* foi a mais afetada (alterações em todas as salinidades). Mudanças no consumo de oxigênio podem alterar a energia obtida por meio da respiração celular e sua canalização para processos fisiológicos essenciais como crescimento, reprodução, comportamento, além da osmorregulação observada aqui. E de forma geral na excreção de amônia e no substrato energético oxidado foram observadas alterações pontuais, possivelmente acúmulo de microplásticos nas brânquias e as diferentes salinidades podem ter influenciado nesses resultados. Nós concluímos que a salinidade possui um papel importante

no que tange aos efeitos dos microplásticos na fisiologia dos invertebrados. Essa descoberta é muito relevante porque fenômenos naturais como mudança climática e El Niño alteram a salinidade da água devido aos aumentos do nível do mar, evaporações e alterações dos regimes de chuvas tornando os invertebrados mais ou menos suscetíveis aos efeitos dos microplásticos.

Palavras chaves: polietileno; osmorregulação, metabolismo, crustáceos, moluscos.

ABSTRACT

Microplastics are becoming an emerging global problem, mainly because many of their effects on the biology of aquatic animals are still not understood. In this work we investigated the effects of polystyrene microplastic (0 and 40 mg/L) on the physiology of marine and estuarine molluscs and crustaceans (*Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* and *Penaeus vannamei*) kept in the salinities where they are found in nature (20, 25, 30, 35 and 40) for 10 days. The following physiological parameters were investigated: osmoregulation, metabolism, ammonia excretion and type of oxidized energetic substrate. We found that the effects of microplastic on the physiology of invertebrates are very dependent on salinity, but we did not find a pattern of changes in the physiological mechanisms of animals exposed to microplastic as a function of their natural habitat or taxonomic group because the responses were species-specific. In general, the presence of microplastic did not affect the osmoregulatory pattern of the animals, but punctual changes were observed in some salinities. For example, in the mussel *P. perna* (salinity 20) and in the intertidal crab *L. thayeri* (salinities 30 and 35) there were losses of osmoregulatory capacity, probably due to the reduction in oxygen consumption and consequent unavailability of ATP for the mechanisms of salt absorption/secretion. Metabolism was the most affected physiological parameter in all species exposed to the microplastic and was dependent on the salinity in which the animals were. In general, the oyster *C. gasar* was the least affected by the microplastic (change only in salinity of 20) and *L. thayeri* was the most affected (changes in all salinities). Changes in oxygen consumption can alter the energy obtained through cellular respiration and its channeling to essential physiological processes such as growth, reproduction,

behavior, in addition to the osmoregulation observed here. And in general, in the excretion of ammonia and in the oxidized energy substrate, punctual changes were observed, possibly accumulation of microplastics in the gills and the different salinities may have influenced these results. We conclude that salinity plays an important role regarding the effects of microplastics on invertebrate physiology. This discovery is very relevant because natural phenomena such as climate change and El Niño change the salinity of the water due to sea level rise, evaporation and changes in rainfall patterns, making invertebrates more or less susceptible to the effects of microplastics.

Keywords: polyethylene; osmoregulation, metabolism, crustaceans, molluscs

5. INTRODUÇÃO

A poluição por plástico nos ambientes aquáticos vem sendo relatada desde a década de 1970 (Scott, 1972; Cundell, 1973; Moris, 1980; Menéndez-Pedriz and Jaumot, 2020; Dusaucy et al., 2023). Nos últimos anos o crescente aumento na quantidade de plástico encontrado nos corpos hídricos vem sendo motivo de preocupações, pois se estima que 95% dos resíduos marinhos tenham o plástico como componente principal (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2021a). Por ser um material versátil, leve, resistente e com um bom custo-benefício, o plástico é amplamente utilizado em diversos ramos da indústria, substituindo materiais como vidro, metal e papel (Frias and Nash, 2019; Menéndez-Pedriz and Jaumot, 2020; Bergmann et al., 2022; Sharma et al., 2023). Devido a essas características a demanda global anual por plásticos aumentou exponencialmente nas últimas cinco décadas. Só no ano de 2019 foram produzidas aproximadamente 370 milhões de toneladas (Mohrig, 2020; PlasticsEurope, 2020; Silva et al., 2020, Martinho et al., 2022), podendo chegar a 500 milhões de toneladas/ano de plásticos produzidos até 2025 (Huang et al., 2021a). O que foi descoberto como um material revolucionário tornou-se uma ameaça ambiental global, considerando a grande lacuna entre o aumento da produção de plástico, a baixa taxa de reutilização e a sua distribuição

onipresente em ecossistemas marinhos e de água doce (Wagner et al., 2018; Zeng et al., 2018; Borrelle et al., 2020; Ziani et al., 2023).

As grandes partículas de plásticos, meso e macroplásticos, podem causar efeitos visíveis na biodiversidade aquática, como sufocamento, emaranhamento, bloqueio intestinal entre outros, que já estão bem documentados (Wilcox and Hardesty, 2015; Thiel et al., 2018; Zhu et al., 2019). Entretanto, os microplásticos e nanoplásticos estão se tornando um problema emergente global, principalmente porque muitos dos seus efeitos ainda não são compreendidos (Wang et al. 2016; Suckling and Richards, 2020; Catarino et al., 2021; Soares et al., 2021, Ziani et al., 2023). Já foram encontrados entre 93 a 236 bilhões de toneladas de microplásticos nos oceanos (Van Sebille et al., 2015; Koelmans et al., 2019). Os microplásticos são partículas sólidas, sintéticas, de matriz polimérica, insolúveis em água, com forma regular ou irregular, de tamanho variando de 1 μm a 5 mm (microplásticos) ou menores que 1 μm (nanoplásticos) (Gigault et al., 2018, Jiang et al., 2020). Eles podem ser classificados também pela sua origem de fabricação em primários ou secundários (Dris et al., 2017; Frias and Nash 2019, NOAA, 2021). Os primários são aqueles que foram fabricados e liberados no meio ambiente na forma de pequenos grânulos (μm) e são usados na fabricação de produtos cosméticos, esfregões abrasivos, produtos de limpeza, entre outros (Andrady, 2017; Anbumani and Kakkar, 2018; Vivekanand et al., 2021). Já os secundários são aqueles fragmentos que resultam da deterioração de plásticos maiores por meio de processos mecânicos, radiação solar, abrasão e interações com embarcações e organismos (Shah et al., 2008; Costa et al., 2010; Andrady, 2017; Frias and Nash, 2019).

Devido as diferentes características dos polímeros plásticos nos oceanos, os microplásticos são encontrados desde a superfície até o sedimento (Rochmann et al., 2019; Nurul et al., 2020; Von Friesen et al., 2020), fazendo com que eles sejam facilmente ingeridos ou absorvidos por espécies de diferentes tamanhos ou nichos ecológicos (Lei et al., 2018; Franzellitti et al., 2019; Ziani et al., 2023). A absorção de microplásticos pode ocorrer por meio de ventilação, ingestão direta ou por transferência na cadeia trófica (Watts et al., 2016; Au et al., 2017; Koelmans et al., 2022; Pisani et al., 2022; Ziani et al., 2023). Estudos

têm mostrado que os microplásticos absorvidos podem se acumular nos tecidos de organismos aquáticos ou serem translocados para o sistema circulatório e diferentes órgãos e tecidos (Avio et al., 2015; Al-Sid-Cheikh et al., 2018; Paul-Pont et al., 2018; Chen et al., 2022), afetando o crescimento (Besseling et al., 2014; Mao et al., 2018; Urbina et al., 2023), o comportamento (Yin et al., 2019), a reprodução (Sussarellu et al., 2015; Han, et al., 2022; Jiang et al., 2022), o metabolismo (Katrina et al., 2019; Rios-Fuster et al., 2021; Trestrail et al., 2021; Wang et al., 2021), a regulação osmótica e iônica (Watts et al., 2016; Zheng and Wang, 2022), dentre outros.

Além de enfrentar os efeitos de contaminantes como os microplásticos, os organismos aquáticos também estão sob pressão das variações naturais do ambiente e das mudanças climáticas (Frölicher et al., 2018, IPCC, 2022). Portanto, os microplásticos podem ter efeitos sinérgicos com outros estressores ambientais, como salinidade, temperatura, pH, amônia, dentre outros (Du et al., 2023; Han et al., 2021; Dinh et al., 2022; Lee et al., 2023; Xing et al., 2023). Dentre estes parâmetros ambientais, a variação da salinidade é um importante fator, porque define a distribuição das espécies na natureza (Whitehead et al., 2011; Uyhelji et al., 2016). Nesse sentido enquanto espécies eurialinas conseguem tolerar amplas variações da salinidade do meio externo e serem resilientes às mudanças consequentes do aumento do nível do mar ou do regime de chuvas, as espécies estenoalinas toleram pequenas variações de salinidade e são mais propensas a sofrerem os efeitos de mudanças ambientais (Whitehead et al., 2011; Uyhelji et al., 2016). Além disso, há na natureza animais que mantêm a osmolalidade da sua hemolinfa constante, os osmorreguladores, e outros que são incapazes de osmorregular, são os osmoconformadores (Figura 1). Tal capacidade também possui relação com a resiliência a diferentes ambientes salínicos e pode ser alterada por mudanças climáticas. Ramaglia et al (2018) verificou que o siri *Callinectes danae* perde sua capacidade osmorregulatória quando exposto ao pH reduzido e os efeitos combinadas da temperatura com a salinidade modulam a capacidade osmótica dos peixes *Sparus aurata* e *Harpagifer antarcticus* (Vargas-Chacoff et al., 2020, 2021). Ainda não se sabe exatamente se poluentes como os microplásticos afetam a capacidade osmorregulatória das espécies aquáticas. No caranguejo *Carcinus maenas* a

exposição ao microplástico afeta a troca iônica branquial e diminui a osmolalidade da hemolinfa nas primeiras horas (Watts et al., 2016) mas no caranguejo violinista *Minuca rapax* a regulação osmótica não é afetada (Capparelli et al 2023).

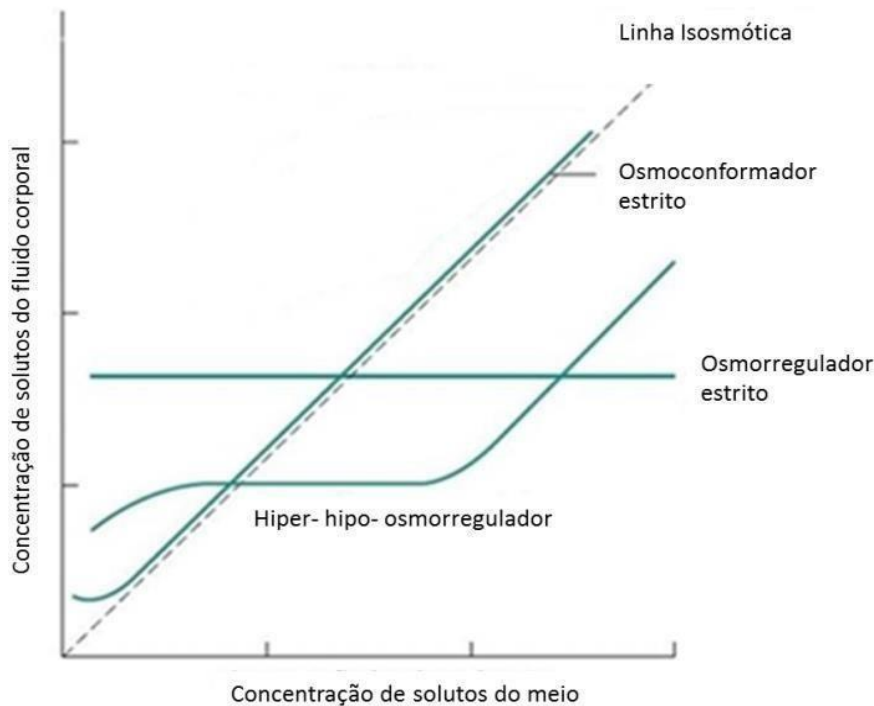


Figura 1- Estratégias osmorregulatórias utilizadas para manutenção dos fluidos corporais internos (adaptada de Willmer et al., 2005).

Os processos osmorregulatórios de invertebrados como crustáceos e moluscos ocorrem principalmente nas brânquias e são dependentes de energia (ATP) (Sokolova et al., 2012a; Rivera-Ingraham and Lignot, 2017; Urzúa and Urbina, 2017) (Figura 2). As brânquias são órgãos multifuncionais, que estão associadas também com as trocas gasosas, excreção de amônia e regulação do pH (Freire et al., 2008; McNamara et al., 2015). Como têm contato contínuo com o ambiente externo, as brânquias, são reconhecidas como um dos tecidos que mais acumulam microplásticos (Browne et al., 2008; Ding et al., 2018; Lu et al., 2016; Truchet et al., 2023). Animais expostos ao contaminante podem sofrer lesões nas lamelas branquiais e necrose tecidual (Hu et al., 2020; Teng et al., 2021). Tais danos estruturais podem comprometer as funções fisiológicas do tecido branquial.

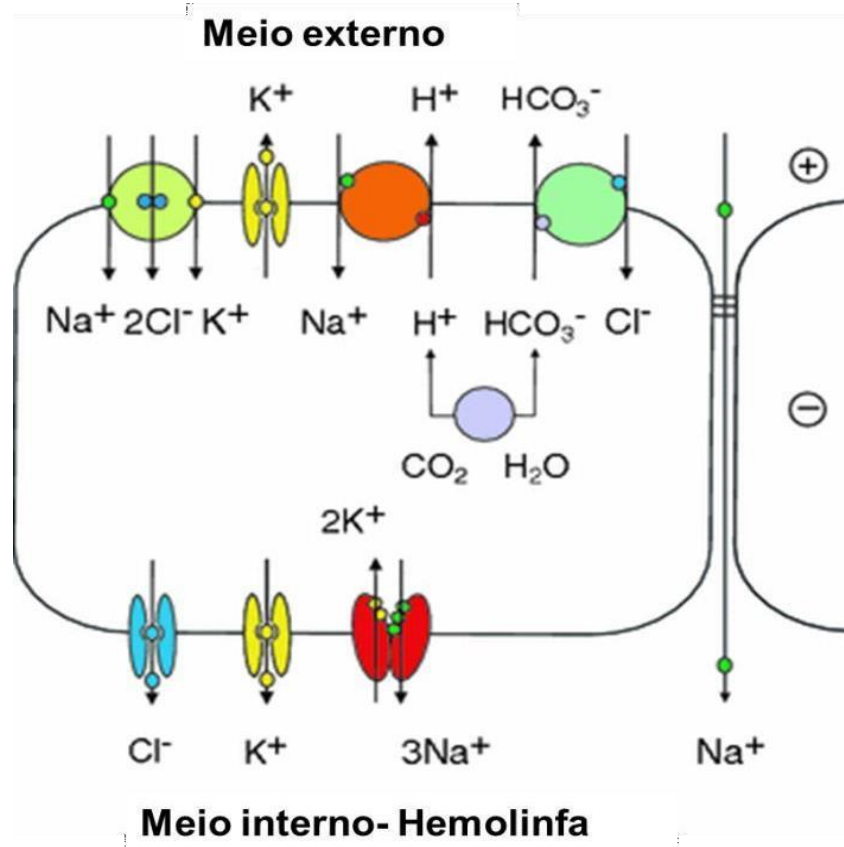


Figura 2: Modelo hipotético para o transporte acoplado de Na^+ e Cl^- através do epitélio branquial em hiperosmorreguladores de regiões entre-marés ou estuarinos. O transportador apical de $Na^+ / K^+ / 2Cl^-$ impulsionado pelo gradiente de Na^+ direcionado para dentro, suplementado por canais apicais de K^+ , que reciclam K^+ e hiperpolarizam a membrana apical, criando um potencial celular negativo que conduz o efluxo de Cl^- através dos canais basais de Cl^- . A absorção de Na^+ pode ser aumentada através do antiportador Na^+ / H^+ apical. O potencial transepitelial externo positivo resultante conduz um movimento paracelular interno substancial de Na^+ através deste epitélio permeável (McNamara e Faria, 2012).

O fornecimento de energia para o metabolismo é um fator limitante para os processos fisiológicos e para a sobrevivência das espécies (Yung-Che and Pung- Pung, 2008). A taxa metabólica é medida com base no consumo de oxigênio de um organismo e pode ser alterada dependendo dos desafios ambientais (Ramaglia et al., 2018; Souster et al., 2018). Por exemplo, no caranguejo *Hemigrapsus crenulatus*, um caranguejo de entremarés, quando expostos às baixas salinidades foi possível observar um maior consumo de

oxigênio, acompanhadas de um aumento da capacidade osmorregulatória (Urzúa and Urbina, 2017), em mexilhões juvenis, *Mytilus chilensis* a combinação dos efeitos entre a variação da salinidade e acidificação oceânica, causou uma redução no consumo de oxigênio (Duarte et al., 2018). Ainda não se sabe muito bem como a sinergia entre as variações de salinidade e microplásticos afeta o consumo de oxigênio das espécies (Du et al., 2023; Sui et al., 2023) mas no caranguejo *Carcinus maenas* (Watts et al., 2016) e no mexilhão *Mytilus coruscus* já foram observadas reduções (Sui et al., 2023).

Adicionalmente, do ponto de vista químico, salinidades diferentes alteram características importantes dos polímeros de plásticos, como a fluabilidade e a agregação das partículas, podendo induzir o efeito salting-out. Esse efeito diminui a solubilidade das moléculas do solvente na fase aquosa, levando à formação de um sistema bifásico (Menéndez-Pedriza and Jaumot, 2020; Pinheiro et al., 2021). De forma geral, o efeito da salinidade irá depender das propriedades dos microplásticos e dos produtos químicos avaliados (Menéndez-Pedriza and Jaumot, 2020). A mudança dessas características pode tornar o microplástico mais biodisponível no ambiente. No entanto, ainda são poucos os estudos que investigaram os efeitos dos microplásticos em combinação com as variações de salinidade nas quais os animais aquáticos estão expostos.

No presente capítulo, nós investigamos os efeitos do microplástico do tipo PET (poliestileno) na fisiologia de invertebrados marinhos e/ou estuarinos (*Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*) mantidos nas salinidades em que são encontrados na natureza. De forma geral, nós queremos entender se o efeito do microplástico na fisiologia dos invertebrados é alterado devido à salinidade em que o animal se encontra. Isso é especialmente importante porque muitas das espécies estudadas são encontradas em salinidades variadas e também porque mudanças climáticas e fenômenos como o El Niño podem mudar a salinidade da água devido aos aumentos do nível do mar, aumento ou redução do regime de chuvas e evaporação da água das poças de maré.

2. MATÉRIAS E MÉTODOS

2.1 COLETAS DOS ANIMAIS

Os animais foram coletados em entre os anos de 2022 (*P. perna*, *C. brasiliiana*, *C. Danae* e *P. vannamei*) e 2023 (*C. danae*, *L. thayeri* e *P. vannamei*,) (Figura 3).

Mexilhão *Perna perna*

O mexilhão *P. perna* (5 - 12 g) foi coletado na região do costão rochoso localizado na Praia dos Sonhos em Itanhaém, SP (24°11'S, 46°48'W). O mexilhão marrom *Perna perna* está entre os bivalves comestíveis mais populares do mundo. É encontrado com abundância em quase toda a extensão do litoral brasileiro e na Costa Africana. Sendo o mexilhão que atinge maior tamanho, é uma espécie de grande interesse comercial e muito utilizada na miticultura (Pierri et al., 2016). Além disso, são organismos osmoconformadores com tolerância a variações de temperatura (Resgalla et al., 2007) e salinidade (Rola et al 2017)

Ostra *Crassotrea brasiliiana*

A ostra *C. brasiliiana* (52 - 113 g) foi obtida na reserva extrativista na comunidade quilombola do Mandira, região estuarino-lagunar de Iguape/Cananéia na cidade de Cananéia-SP (25°01'S, 48°02'W). É uma espécie que ocorre ao longo da costa brasileira desde o estado do Maranhão até Santa Catarina (Machado et al. 2002) podendo ser encontrada em substratos rochosos, manguezais e estuários (Varela et al., 2007). São animais eurialinos, sesséis e filtradores, devido a essas características sofrem muita influência com flutuação das condições ambientais, influenciando fortemente o crescimento e a sobrevivência desses moluscos bivalves durante distintas fases do seu ciclo de vida.

Caranguejo violinista *Leptuca thayeri*

O caranguejo chama-maré *L. thayeri* (1,70 - 4,5g), foi coletado escavando suas tocas com pás, no estuário do rio Jaguareguava em Bertioga (23°49'S, 46°09'W). O *L. thayeri* (Rathbun, 1900) é a terceira espécie de caranguejo-violinista mais comum na costa brasileira (Thurman et al., 2013). Ocupa áreas

de manguezais em todas as regiões tropicais e subtropicais, desde o Golfo do México até o estado de Santa Catarina, no sul do Brasil (Melo, 1996). Os indivíduos permanecem ativos nas marés baixa e alta (De Grande et al., 2018). É uma espécie mesohalina, ocupa habitat eurialino entre 1,2 e 60 psu (Thurman et al., 2013, 2017; Faria et al., 2017).

Siri *Callinectes danae*

O siri *C. danae* (40 – 109 g) foi coletado na cidade de Peruíbe, SP (24°38'S, 47° 02'W), com armadilhas de rede (puçá) e carcaça de peixe, usado como isca. O siri *C. danae* ocorre por todo Oceano Atlântico da Flórida, EUA, até a costa sul do Brasil (Melo 1996; Guerin and Stickle, 1997; Chacur and Negreiros-Fransozo, 2001). No litoral brasileiro é a segunda espécie mais abundante na região sul, sendo a primeira no litoral catarinense (Medeiros, 1982; Pita 1985; Morerira, 1988), e a mais consumida na culinária da região nordeste (Calado and Souza, 2003). Geralmente costumam ser coletados junto à fauna acompanhante, porém as capturas pelas comunidades caiçaras também são frequentes, para subsistência e /ou consumo (Severino-Rodrigues et al., 2001; Branco and Fracasso, 2004). O *C. danae* é um crustáceo eurialino e um nadador ativo, sendo encontrado em ambientes de águas salobras, estuários e áreas de mar aberto (Melo, 1996). Essa tolerância a variações de salinidade está diretamente relacionada ao seu ciclo de vida. Em geral as larvas do se desenvolvem em ambiente de mar aberto, depois iniciam a migração para a região estuarina.

Camarão *Penaeus vanammei*

O camarão-branco- do-pacífico *P. vannamei* (3 - 7,8 g) foi coletado com rede de tarrafas nos viveiros de fazendas de camarão no estado de Santa Catarina- Brasil (26°20'S, 48°73'W). Trata-se de uma espécie originária da costa do Pacífico, com distribuição desde o Golfo da Califórnia até o norte do Peru (Shu, 2007; Feng et al., 2008). É um animal eurialino, de rápido crescimento, alta taxa de sobrevivência em cultivos de alta densidade, além disso, também é rico em propriedades nutricionais, por esses motivos, tornou-se a espécie de crustáceo mais cultivada no mundo (Abdelrahman et al., 2019; Muralisankar et al., 2021; Li et al., 2021).

Todos os animais coletados foram transportados para o Laboratório de Aquicultura Sustentável da UNESP, campus do litoral paulista, em caixas contendo água do local de coleta com aeração constante. Os animais foram aclimatados às condições laboratoriais durante quatro dias em aquários de vidro contendo aeração constante e água com salinidade (30‰), pH (8,0) e temperatura (25°C). Mexilhões, ostras, camarões e caranguejos foram alimentados diariamente com ração comercial para camarão (Guabitech Active, 40% de proteína bruta). Os siris foram alimentados diariamente com filé de peixe.



Figura 3. (A) Locais de coleta A- Costão rochoso praia dos sonhos Itanhaém; B- Reserva extrativista do Mandira; C- Praia do Guarau- Peruipe; D- Rio Jaguareguava- Bertioga; E- Fazenda de camarão- Santa Catarina; **3(B)**- Animais coletados A- mexilhão *Perna perna*; B- ostras *Crassostrea gasar*; C- siri *Callinectes danae*; D- caranguejo chama-maré *Leptuca thayeri*; E- camarão *Penaeus vannamei*.

2.2 EXPOSIÇÃO AO MICROPLÁSTICO

Após o período de aclimação às condições laboratoriais, os animais foram transferidos para aquários de vidro (20L) e expostos por dez dias a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 ou 40) e concentrações de microplásticos

(0 ou 40 mg/L) (**Figura4**). O microplástico utilizado foi tereftalato de polietileno (PET) virgem, adquirido da Polyscience, Inc. Este é um dos plásticos mais produzidos e identificados nos ambientes marinhos (Andrady et al., 2011). Para selecionarmos o tamanho desejado (100 a 500 μm), o microplástico foi moído em um moedor de grãos e peneirado em um conjunto de peneiras para granulometria. A água dos aquários foi previamente filtrada para evitar contaminação por microplástico. As salinidades 20, 25 e 30 foram obtidas por meio da diluição da água do mar, com água doce (desclorificada). As salinidades de 35 e 40 foram obtidas após congelamento da água do mar e recolhida às primeiras porções durante o descongelamento. Os fatores abióticos, temperatura (25°C) e salinidade foram verificados diariamente com o auxílio de termômetro e refratômetro, respectivamente. Mexilhões, ostras, camarões e caranguejos foram alimentados diariamente com ração comercial para camarão (Guabitech Active, 40% proteína bruta). Os siris foram alimentados diariamente com filé de peixe. A troca de água dos aquários foi realizada a cada três dias a fim de que a qualidade da água e a concentração de microplástico fossem mantidas. Os experimentos foram realizados com oito animais (N= 8).



Figura 4. Estante e aquários em que os animais foram mantidos e expostos aos diferentes tratamentos.

Após 10 dias de exposição foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos dos invertebrados: consumo de oxigênio, excreção de amônia, tipo de substrato energético oxidado e osmolalidade da hemolinfa.

2.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO, EXCREÇÃO DE AMÔNIA E SUBSTRATO ENERGÉTICO OXIDADO (O: N)

O consumo de oxigênio (Figura 5A) e a excreção de amônia (Figura 5B) foram realizados de acordo com Augusto and Masui (2014). Os animais foram colocados individualmente em câmaras respirométricas fechadas contendo água com as mesmas salinidades e concentrações de microplásticos dos aquários em que foram retirados. Os animais permaneceram nas câmaras respirométricas por 30 minutos sob aeração constante para aclimação, visando à redução do estresse causado pela manipulação. Após esse período, a aeração foi retirada e a concentração de oxigênio na água medida com o auxílio de um oxímetro (monitor e probe YSI, Modelos 53 e 5905, respectivamente) e a câmara foi vedada. O tempo em que os animais permaneceram nas câmaras respirométricas variou em função do tamanho dos animais e da quantidade de oxigênio consumido. Foram realizados experimentos pilotos para estabelecer o tempo de permanência nas câmaras. Dessa forma, os animais permaneceram por três horas (mexilhão), seis horas (ostra) ou duas horas (siri, caranguejo e camarão) nas câmaras e logo após esse período a concentração de oxigênio foi medida novamente. Câmaras controles sem animais dentro foram mantidas nas mesmas condições experimentais. Variações na concentração do oxigênio foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos no início e no final do experimento. A taxa respirométrica foi calculada pela diferença entre os valores obtidos nas amostras e controles (sem animais). (Winddows and Johnson, 1988).

$$RT = \{[(Co - Cf) \cdot V/\Delta T] - f\}/DW$$

RT: taxa respirométrica ($\mu\text{g O}_2 \text{ mgDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$); Co: concentração inicial de oxigênio na câmara (mlO_2 / L); Cf: concentração final de oxigênio na câmara

(mlO_2/L); V: volume das câmaras (L); ΔT : tempo de duração do experimento (h); f: mudanças na concentração de oxigênio das câmaras; DW: massa seca do animal (mg).

A excreção de amônia foi determinada por colorimetria (Koroleff, 1983) em amostras de água obtidas das câmaras respirométricas no final dos experimentos de medição do consumo de oxigênio. Os dados foram apresentados como a soma da amônia não ionizável (NH_3) e ionizável (NH_4^+). O consumo de oxigênio e a excreção de amônia são expressos como massa seca específica ($\mu\text{g mg}^{-1}$ massa seca h^{-1}). O substrato energético oxidado foi calculado por meio da relação atômica entre o oxigênio consumo e a amônia excretada (O: N). Valores até 16 indicam o uso de proteínas, entre 16 e 60, o uso de uma mistura de proteínas e lipídios; valores acima de 60 indicam a predominância de lipídios como substrato energético (Mayzaud and Conover, 1988).

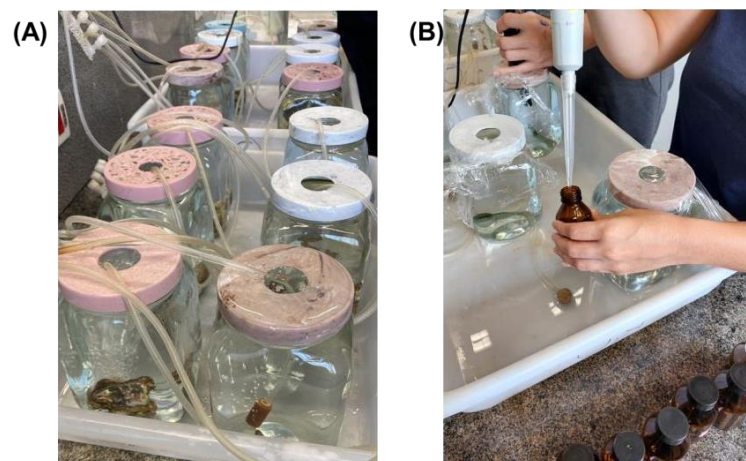


Figura 5. Avaliação do consumo de oxigênio e excreção de amônia dos animais. A: Animais mantidos nas câmaras com aeração, para medida inicial do consumo de oxigênio. B: amostras de água obtidas das câmaras respirométricas no final dos experimentos para determinar a excreção de amônia.

Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por congelamento e amostras de hemolinfa foram retiradas. O corpo de cada animal foi pesado e colocado na estufa por 48h a 60°C e pesados novamente.

2.4 AVALIAÇÃO DA OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA

Após serem eutanasiados com gelo, cerca de 100 μ l de amostra de hemolinfa foram retiradas da região do músculo adutor dos moluscos (mexilhão e ostra), membrana artrodial na base do último pereiópode dos siris e caranguejos e do cefalotórax dos camarões, utilizando-se seringa de insulina com agulha #25-8. A hemolinfa foi armazenada em freezer para posterior análise da osmolalidade. A osmolalidade da hemolinfa foi medida em amostras de 10 μ l em um micro- osmômetro de pressão a vapor (Elitechgroup VAPOR, Modelo 5600). Os resultados são apresentados em mOsm/ Kg água. A capacidade osmorreguladora das espécies, diferença entre a osmolalidade da hemolinfa e do meio externo em uma dada salinidade, foi calculada pela razão: Δ osmolalidade da hemolinfa/ Δ osmolalidade do meio (Freire et al., 2003).

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância de dois fatores (ANOVA). Em seguida foram submetidos ao teste de médias múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) para localizar as médias estatisticamente diferentes. As análises foram feitas após averiguar as condições de normalidade de distribuição e igualdade de variância usando o programa Sigma Stat 2.0 e empregando um nível mínimo de significância de $P \leq 0,05$. Para a construção das figuras foi utilizado o programa GraphPad Prism 7. Os dados são apresentados com Média \pm Erro Padrão da Média.

3. RESULTADOS

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA E CAPACIDADE OSMORREGULADORA (CO)

De forma geral, o microplástico não afetou o padrão osmorregulatório das espécies estudadas. Observamos apenas mudanças pontuais na osmolalidade da hemolinfa (Figura 6). O mexilhão *P. perma* é uma espécie osmoconformadora, mas que hiperosmorregula em salinidade de 20. A exposição ao microplástico causou a perda da capacidade osmorregulatória dessa espécie. A ostra *C. gasar* manteve o seu padrão osmoconformador em todas as situações experimentais, mas a osmolalidade da hemolinfa se afastou da linha isosmótica quando exposta ao microplástico (salinidades 25 e 30). O siri *C. danae* osmorregulou até a salinidade de 35 e osmoconformou a partir daí, independentemente do microplástico. O caranguejo *L. thayeri* hiperosmorregulou até a salinidade de 25 e hiporregulou nas salinidades superiores. A presença do microplástico mudou sutilmente esse padrão porque a espécie perdeu tal capacidade osmorregulatória entre as salinidades de 25 e 35. O camarão *P. vannamei* manteve-se fortemente osmorregulador, independente do microplástico.

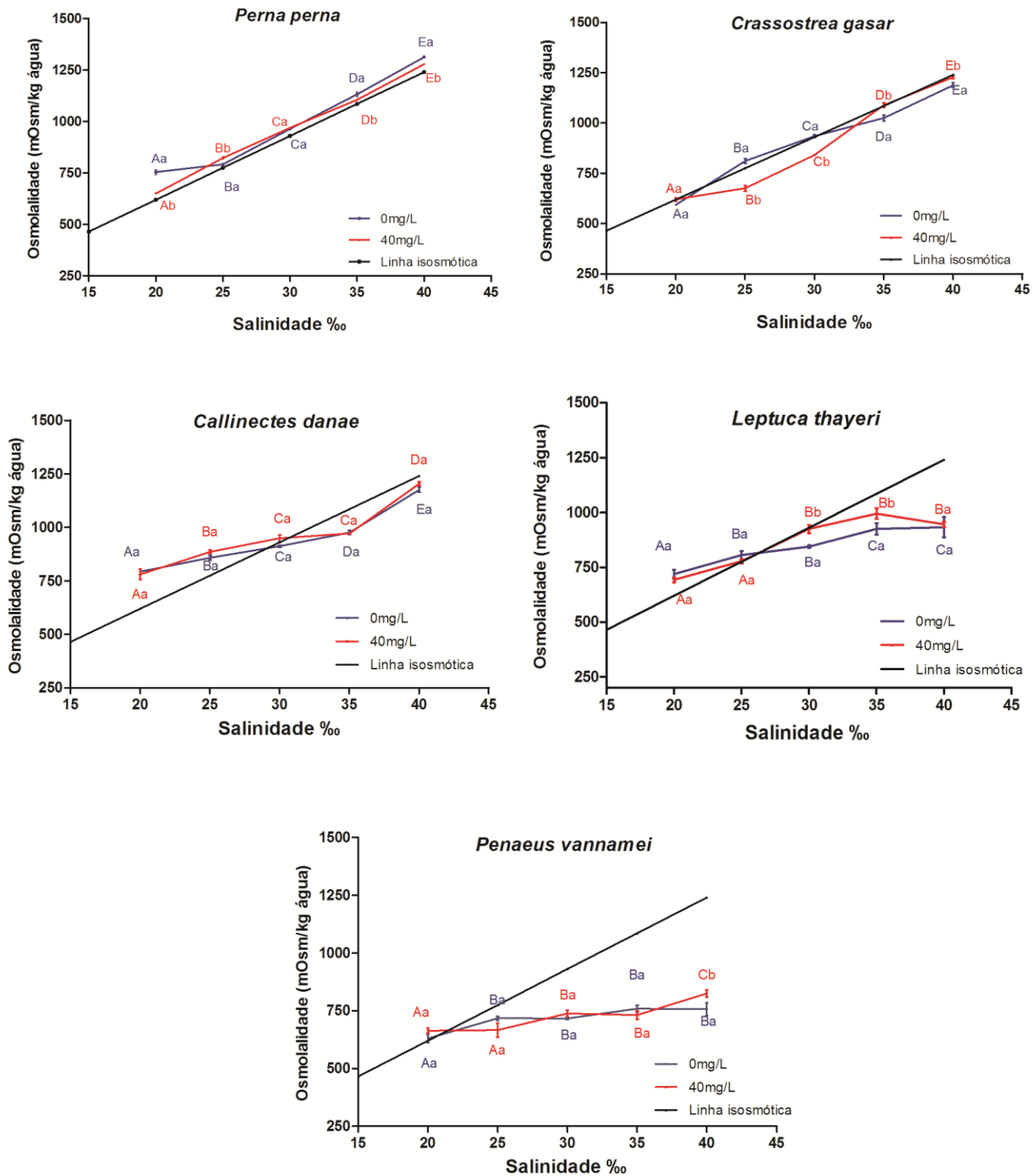


Figura 6: Osmolalidade da hemolinfa (mOsm/Kg água) de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*, expostos a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L) e diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) por 10 dias. (Média ± SE, N = 8) (P < 0,05). Linha isosmótica: 1 de salinidade equivale a 31 mOsm/kg água.

Tabela1: Capacidade Osmorregulatória de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*, expostos a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L) e diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e por 10 dias.

	0 mg/L	40 mg/L
<i>Perna perna</i>	0,70	0,78
<i>Crassostrea gasar</i>	0,74	0,71
<i>Callinectes danae</i>	0,48	0,53
<i>Leptuca thayeri</i>	0,27	0,32
<i>Penaeus vannamei</i>	0,16	0,20

3.2 CONSUMO DE OXIGÊNIO

A exposição ao microplástico causou alterações no consumo de oxigênio de todas as espécies e tais efeitos foram dependentes da salinidade (Tabela 2; Figura7). Não conseguimos encontrar um padrão de aumentos e reduções no consumo de oxigênio de animais expostos ao microplástico em função do seu habitat natural porque as respostas foram espécie-específica. De forma geral, a ostra *C. gasar* foi a menos afetada pelo microplástico (alteração somente na salinidade de 20) e *L. thayeri* foi a mais afetada (alterações em todas as salinidades). No mexilhão, *P. perna*, ocorreram reduções nas salinidades mais baixas (20 e 30) e aumentos nas superiores (35 e 40), mas na ostra *C. gasar* ocorreu alteração de +102% apenas na água salobra de 20. No siri *C. danae* ocorreram alterações nas salinidades intermediárias de 25 (-33%) e 30 (+118%) após exposição ao microplástico. No caranguejo chama-maré *L. thayeri* a exposição ao microplástico causou aumentos no consumo de oxigênio nas salinidades mais baixas (20 e 25) e reduções elevadas (30 a 40). No camarão, *P. vannamei*, a exposição ao microplástico causou reduções na água salobra (20 e 25) e aumento na água do mar (35).

Tabela 2. Resultados da ANOVA de dois fatores no consumo de oxigênio de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* *Penaeus vannamei*, expostos a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L) por 10 dias.

	Concentração de microplástico (MP)				Salinidade				MP x Salinidade				Residual	
	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS
<i>Perna perna</i>	1	0,00161	5,66	0,020	4	0,00097	3,43	0,012	4	0,02380	0,0059	<0,001	80	0,00029
<i>Crassostrea gasar</i>	1	0,00004	0,95	0,334	4	0,00039	8,55	<0,001	4	0,00020	4,355	0,004	48	0,00005
<i>Callinectes danae</i>	1	0,0149	6,42	0,015	4	0,9000	38,61	<0,001	4	0,0141	6,044	<0,001	49	0,00233
<i>Leptuca thayeri</i>	1	0,161	1,33	0,257	4	0,272	2,24	0,085	4	0,856	7,066	<0,001	34	0,121
<i>Penaeus vannamei</i>	1	0,248	2,44	0,123	4	0,276	2,713	0,037	4	0,627	6,179	<0,001	66	0,102

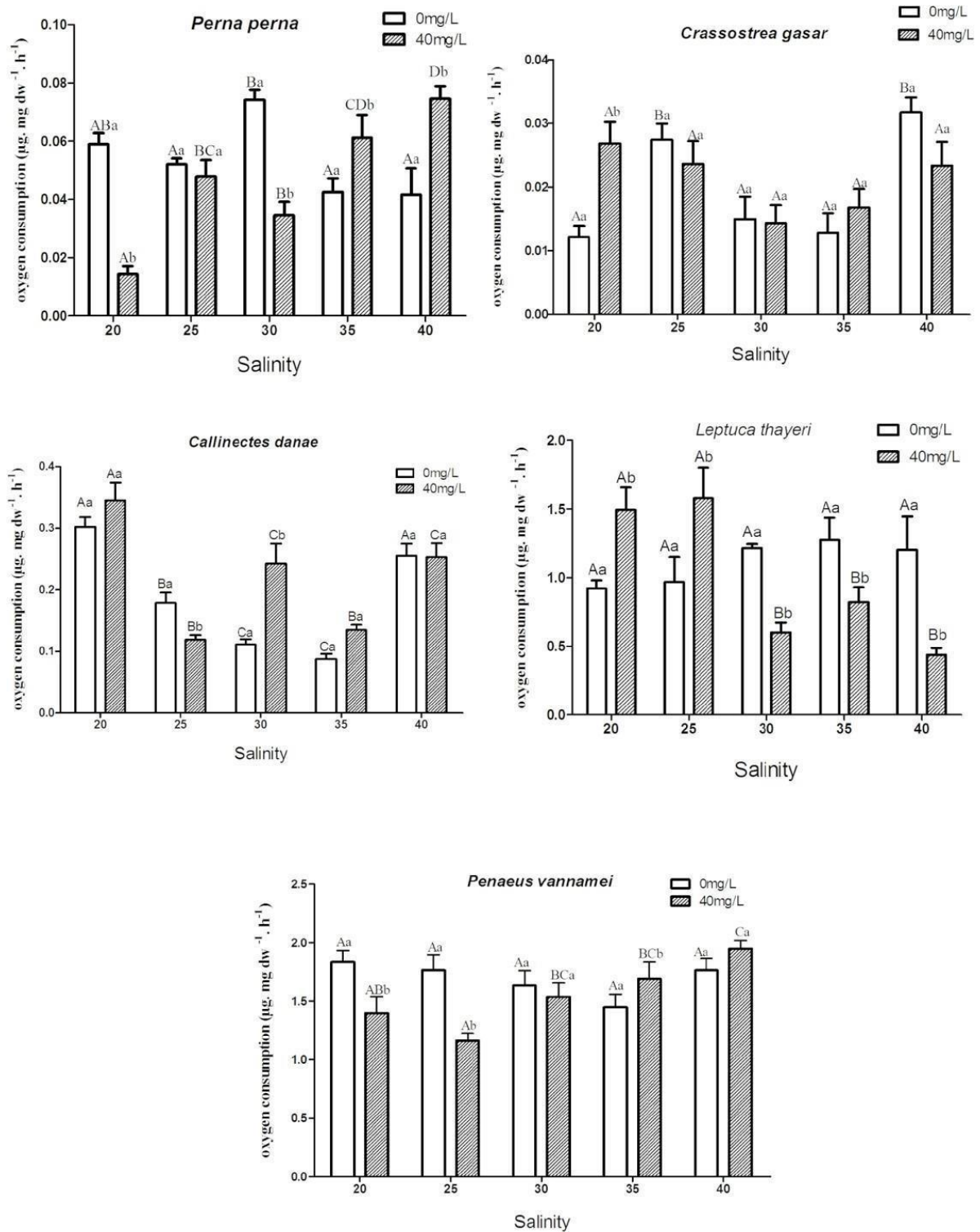


Figura 7: Consumo de oxigênio de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*, expostos a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L), por 10 dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e a mesma concentração de microplástico. Diferentes

letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes concentrações na mesma salinidade (Média \pm SE, N =8) (P < 0,05).

3.3 EXCREÇÃO DE AMÔNIA

Nos animais expostos ao microplástico e mantidos em diferentes salinidades, ocorreram algumas alterações na excreção de amônia (Tabela 3 e Figura 8). Nós não conseguimos observar um padrão de alterações relacionado ao habitat natural ou grupo taxonômico. Enquanto o mexilhão *P. perna* exposto ao microplástico apresentou aumentos e reduções na excreção de amônia em várias salinidades, a ostra *C. gasar* apresentou alteração apenas na salinidade 20 (-74%). Em *C. danae*, o microplástico causou aumentos em salinidades específicas (20, 30 e 35) e em *L. thayeri* não ocorreram alterações na excreção de amônia. Em *P. vannamei* a exposição ao microplástico causou alterações nas salinidades de 30 (+42%) e 35 (+65%).

Tabela 3. Resultados da ANOVA de duas vias na excreção de amônia de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*, expostos a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L) por 10 dias.

	Concentração de microplástico				Salinidade				MP x Salinidade				Residual	
	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS	F	P	DF	MS
<i>Perna perna</i>	1	0,0000003	0,04	0,840	4	0,000067	8,13	<0,001	4	0,00015	17,57	<0,001	80	0,00001
<i>Crassostrea gasar</i>	1	0,114	1,56	0,218	4	1,365	18,70	<0,001	4	0,226	3,10	0,025	44	0,0730
<i>Callinectes danae</i>	1	0,996	44,36	<0,001	4	1,195	53,22	<0,001	4	0,253	11,29	<0,001	42	0,224
<i>Leptuca thayeri</i>	1	0,00064	3,16	0,085	4	0,00058	2,89	0,038	4	0,0001	0,47	0,756	32	0,00002
<i>Penaeus vannamei</i>	1	0,00026	1,09	0,301	4	0,00217	8,80	<0,001	4	0,00152	6,16	<0,001	66	0,00025

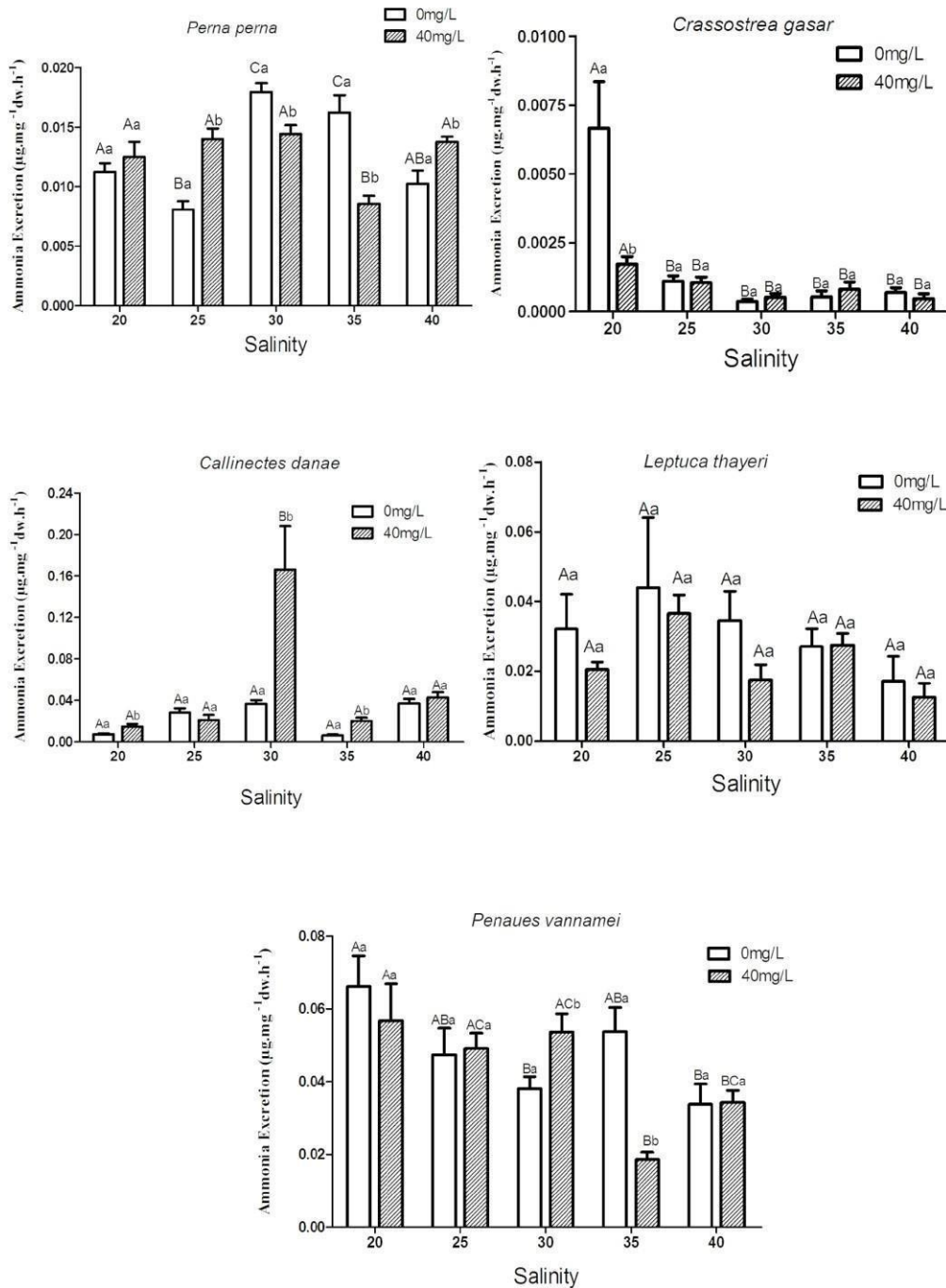


Figura 8: Excreção de amônia ($\mu\text{g NH}_3\text{-H mg DW}^{-1} \text{h}^{-1}$) de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*, expostos a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L) por 10 dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e a mesma concentração. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes concentrações na mesma salinidade (Média \pm SE, N =8) ($P < 0,05$).

3.4 TIPO DE SUBSTRATO ENERGÉTICO OXIDADO

O tipo de substrato energético oxidado pelos animais expostos ao microplástico em diferentes salinidades é mostrado na Tabela 4. De forma geral os animais oxidaram predominantemente proteínas, exceto *L. thayeri* que oxidou principalmente uma mistura de proteína e lipídio. Nessa espécie, algumas mudanças foram observadas após exposição ao microplástico como a troca de apenas proteína por uma mistura de proteína/lipídio na salinidade de 25 e uma mistura de proteína/lipídio por apenas proteína na salinidade de 30.

Tabela 4. Substrato energético oxidado de *Perna perna*, *Crassostrea gasar*, *Callinectes danae*, *Leptuca thayeri* e *Penaeus vannamei*, expostos a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e a duas concentrações de microplástico (0 e 40 mg/L) por 10 dias (Média ± SE, N= 8).

	0 mg/L					40 mg/L				
	20	25	30	35	40	20	25	30	35	40
<i>Perna perna</i>	3,0 ± 0,4 ^{Aa} P	3,3 ± 0,4 ^{Aa} P	2,2 ± 0,4 ^{ABa} P	1,6 ± 0,4 ^{Ba} P	2,96 ± 0,4 ^{ABa} P	1,0 ± 0,5 ^{Ab} P	1,8 ± 0,4 ^{Ab} P	1,4 ± 0,7 ^{Aa} P	4,2 ± 0,4 ^{Bb} P	2,8 ± 0,4 ^{Aa} P
<i>Crassostrea gasar</i>	1,3 ± 0,1 ^{Aa} P	20,9 ± 1,0 ^{Ba} P+L	17,7 ± 1,9 ^{Ba} P+L	10,2 ± 2,9 ^{Ca} P	24,5 ± 2,6 ^{Ba} P+L	7,9 ± 2,3 ^{Ab} P	9,6 ± 1,9 ^{Ab} P	16,5 ± 2,9 ^{Ba} P	6,7 ± 2,9 ^{Aa} P	38,9 ± 2,6 ^{Ca} P+L
<i>Callinectes danae</i>	20,2 ± 0,9 ^{Aa} P+L	3,1 ± 0,9 ^{Ba} P	2,0 ± 1,0 ^{Ca} P	7,5 ± 1,2 ^{Da} P	3,8 ± 0,9 ^{Ba} P	11,2 ± 0,9 ^{Ab} P	3,1 ± 1,0 ^{Ba} P	1,8 ± 1,4 ^{Ba} P	3,9 ± 1,0 ^{Cb} P	2,8 ± 0,8 ^{CBa} P
<i>Leptuca thayeri</i>	23,3 ± 6,6 ^{Aa} P+L	14,8 ± 7,7 ^{Aa} P	21,9 ± 7,7 ^{Aa} P+L	26,7 ± 6,6 ^{Aa} P+L	30,5 ± 7,8 ^{Aa} P+L	22,9 ± 6,6 ^{Aa} P+L	33,3 ± 5,4 ^{Aa} P+L	14,2 ± 7,6 ^{Aa} P	20,9 ± 6,6 ^{Aa} P+L	17,9 ± 6,6 ^{Aa} P+L
<i>Penaeus vannamei</i>	13,4 ± 3,3 ^{Aa} P	16,6 ± 2,7 ^{Aa} P	20,1 ± 2,5 ^{Aa} P+L	19,3 ± 2,5 ^{Aa} P+L	29,2 ± 2,9 ^{Ba} P+L	10,8 ± 2,7 ^{Aa} P	11,6 ± 2,3 ^{Ab} P	14,4 ± 2,2 ^{Ab} P	42,7 ± 2,5 ^{Bb} P+L	26,9 ± 3,3 ^{Ca} P+L

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre diferentes salinidades e a mesma concentração. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre diferentes concentrações e na mesma salinidade. Os dados são apresentados como Média ± Erro Padrão da Média. ($P \leq 0,05$). P= Proteínas; L= Lipídios; P+L= Mistura Proteína + Lipídio.

4. DISCUSSÃO

Os microplásticos representam uma ameaça global aos ecossistemas aquáticos e pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a sua biodisponibilidade, além disso, causam diferentes efeitos na biodiversidade, nos ecossistemas e nos organismos (Chouchene et al., 2023). Nós verificamos aqui que a exposição dos invertebrados ao microplástico do tipo PET pode afetar os mecanismos fisiológicos dependendo da salinidade em que o animal se encontra. Os mecanismos afetados são importantes para a homeostase dos moluscos e crustáceos estudados porque determinam sua distribuição na natureza (osmorregulação) ou estão relacionados com a energética do animal (consumo de oxigênio, excreção e tipo de substrato energético oxidado). As alterações observadas podem estar relacionadas com o efeito do microplástico ao nível celular e tecidual (como lesões branquiais e intestinais), bioquímico (alteração das reações intra- e extracelulares), comportamental (presença do microplástico no aquário) e até mesmo devido à interação química do microplástico com o sal presente na água.

A manutenção da homeostase osmótica e iônica intra- e extracelular é fundamental para o funcionamento normal das células e conseqüentemente para a sobrevivência e deslocamento dos organismos em diferentes ambientes (Lima et al., 2009). A salinidade tem efeitos importantes nos padrões osmorregulatórios, por isso as salinidades testadas no presente estudo (20, 25, 30, 35 e 40), são aquelas naturalmente encontradas nos ambientes das espécies avaliadas. Nesse sentido, o efeito combinado do microplástico e da salinidade sob os mecanismos osmorregulatórios ainda são pouco conhecidos (Watts et al., 2016; Capparelli et al., 2023). Nossos resultados mostram os mesmos padrões osmorregulatórios tanto na ausência quanto na presença do microplástico, exceto em *P. perna* (salinidade 20) e *L. thayeri* (salinidades 30 e 35). Portanto, para a maioria das espécies avaliadas aqui (*C. gasar*, *C. danae*, *P. vannamei*), a presença do microplástico na água não afetou de forma importante a osmolalidade da hemolinfa. A ausência de efeitos dos microplásticos sob a capacidade osmorregulatória também foi observado em *M. rapax* (Capparelli et

al., 2023) e *C. maenas* (Watts et al., 2016), possivelmente devido a uma regulação iônica eficiente.

Enquanto *P. perna* perdeu a capacidade hiperosmorregulatória (absorção de sal), *L. thayeri* perdeu a capacidade hiporregulatória (secreção de sal) na presença do microplástico (Figura 6). A perda da capacidade osmorregulatória nessas duas espécies expostas ao microplástico pode estar relacionada à diminuição do consumo do oxigênio nas brânquias, canalização da energia para outros mecanismos fisiológicos ativos, diminuição da taxa de ingestão e consequente redução na disponibilidade de substrato energético, alterações no transporte de íons através das membranas (Ramaglia et al., 2018, Rivera-Ingraham and Lignot, 2017; Urzúa and Urbina, 2017). Como já mencionado, a osmorregulação é um processo que depende de energia (ATP) obtida durante a respiração celular (Sokolova et al., 2012a; Rivera-Ingraham and Lignot, 2017; Urzúa and Urbina, 2017). Reduções na captação do oxigênio nas brânquias podem afetar a produção de energia nas mitocôndrias. Além disso, a energia produzida pode ter sido canalizada para outros processos regulatórios mais limitantes e dependentes de ATP. David et al., 2018 observou que ostras de mangue *Crassostrea rhizophorae* que vivem em estuários contaminados reduzem a capacidade de regular a água em diferentes tecidos. No caranguejo *C. maenas* expostos ao microplástico também ocorre redução da concentração de sódio da hemolinfa e no consumo de oxigênio (Watts et al., 2016). No mexilhão osmoconformador *Mytilus galloprovincialis* exposto ao microplástico poliestireno foram detectadas alterações nos processos osmorregulatórios, principalmente devido a um aumento de aminoácidos livres e outros osmólitos relacionados ao metabolismo energético (Capello et al., 2021). A escassez de informações sobre os efeitos sinérgicos dos microplásticos a outros estressores na osmorregulação dificulta uma melhor compreensão de tais achados.

O consumo de oxigênio é um importante parâmetro fisiológico a ser medido diante de situações que impõem desafio à homeostase porque está relacionado ao fornecimento de energia necessário para o enfrentamento das adversidades ambientais (Waller et al., 2017; Augusto et al., 2020; Mantoan et al., 2021). Aqui nós observamos que a presença do microplástico afeta o

metabolismo de todas as espécies avaliadas. Nós não conseguimos observar um padrão de respostas em função do ambiente que a espécie vive ou do grupo taxonômico a qual pertence, embora *C. gasar* tenha sido a espécie que menos alterou o seu metabolismo em função da presença do microplástico (Figura 7). Algumas espécies expostas ao microplástico aumentaram o consumo de oxigênio em salinidades elevadas (*P. perna*, *P. vannamei*), mas outras apresentaram essa mesma resposta em salinidades reduzidas (*C. gasar* e *L. thayeri*).

O efeito do microplástico no consumo de oxigênio já foi observado em diferentes grupos como cnidários (Ge et al., 2023), moluscos (Pedersen et al., 2020; Fabra et al., 2021), crustáceos (Isinibilir et al., 2020; Svetlichny et al., 2021, Shi et al., 2022), anelídeos (Green et al., 2016) e peixes (Ding et al., 2020; Stienbarger et al., 2021) expostos ao microplástico. As brânquias são um dos órgãos que mais acumulam microplásticos em seus tecidos devido ao contato direto e contínuo com o meio externo (Lu et al., 2016; Ding et al., 2018; Capparelli et al., 2023). Reduções no consumo de oxigênio observadas aqui podem estar relacionadas aos danos branquiais causados pelos microplásticos como infiltração de hemócitos, edema e lesões nas lamelas e mucosas (Hu et al., 2020; Teng et al., 2021; Zheng and Wang 2023). O acúmulo do microplástico nas brânquias em sinergia com a salinidade pode causar danos aos processos respiratórios, principalmente devido ao fato das brânquias serem extremamente sensíveis a contaminantes ou a presença de substâncias estranhas (ou seja, microplásticos) (Wang et al., 2013; Van Cauwenberghe et al., 2015). Além disso, mudanças na salinidade também alteram a permeabilidade da superfície branquial, influenciando assim a suscetibilidade aos efeitos tóxicos do microplásticos (Capparelli et al., 2023). Aumentos da taxa metabólica pode ser consequência de uma respiração mais rápida devido ao aumento da demanda energética (Hebel et al., 1997; Woods et al., 2020). No camarão *P. vannamei* exposto ao microplástico foram observados danos nos filamentos branquiais, deformação dos vasos sanguíneos branquiais e aumento do número de células sanguíneas (Xing et al., 2023). No peixe *Oryzias melastigma* a exposição a diferentes tamanhos de microplásticos causou alterações histopatológicas associadas a ionócitos, incluindo inchaço, desnaturação, necrose e apoptose

celular (Zheng and Wang 2023). Além dos danos estruturais, as lesões branquiais podem aumentar a produção de radicais livres e, conseqüentemente, o estresse oxidativo (Mao et al. 2018). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e as defesas antioxidantes e podem danificar tecidos (Betteridge, 2000). Alterações do metabolismo no camarão *Neocardina heteropoda* expostos ao microplástico do tipo poliestireno parecem estar relacionadas ao aumento do estresse oxidativo (Kučera et al.,2022).

A ostra *C. gasar* foi a espécie que menos apresentou alterações na sua taxa metabólica quando exposta ao microplástico. Esse fato também foi observado em outros estudos com ostras expostas ao microplástico (Fabra et al., 2021; Sui et al., 2021). Uma das hipóteses para a maior resiliência desses animais é que as ostras são organismos particularmente seletivos, possuindo estrutura branquial complexa, as partículas cujas características físicas se assemelham às dos alimentos (por exemplo, tamanho e forma), são absorvidas e as não selecionadas são eliminadas no manto (Fabra et al., 2021), ou seja, elas conseguem eliminar alguns microplásticos evitando que sejam absorvidos.

EXCREÇÃO DE AMÔNIA

A taxa de excreção de amônia é um indicador do catabolismo proteico, do estado nutricional e reprodutivo e da exposição dos animais aquáticos a ambientes estressantes (Griffiths and Griffiths, 1987, Weihrauch et al. 2017). A excreção de amônia pode aumentar devido ao uso de aminoácidos livres como efetores osmóticos e reduzir devido a utilização de proteínas básicas como tampões, reduzindo o catabolismo proteico (Hans et al. 2014; Fehsenfeld and Weihrauch 2016). Assim como nas respostas metabólicas, nós não conseguimos estabelecer entre as espécies estudadas uma relação entre as respostas fisiológicas observadas e seu habitat natural ou grupo taxonômico. Dentre as cinco espécies avaliadas, a excreção de amônia alterou pouco ou permaneceu inalterada, respectivamente, na ostra *C. gasar* e no caranguejo entre-marés *L. thayeri*, mas as demais espécies apresentaram aumentos ou reduções em

função da salinidade. Diferentes respostas na excreção de amônia já foram observadas em animais expostos ao microplástico como nos bivalves *Ruditapes philippinarum* (Jiang et al. 2022) e *Mytilus coruscus* (Sui et al., 2023), no camarão *P. vannamei* (Han et al., 2022) e nos peixes *Sebastes schlegelii* (Yin et al., 2019) e *Oryzias melastigma* (Zheng and Wang 2023). De forma geral, o acúmulo de microplásticos nas brânquias e os danos histológicos causados podem alterar o transporte de amônia através das membranas, inclusive os transportadores de NH₃ - (Yin et al., 2019; Zheng and Wang 2023). Visto que excreção e respiração ocorrem nas brânquias, alguns autores já associaram respostas no consumo de oxigênio e excreção de amônia em animais aquáticos expostos ao microplástico. Por exemplo, no peixe- pedra *S. schlegelii* o estresse respiratório interferiu na excreção de amônia após a exposição ao microplástico (Yin et al., 2019) e no bivalve *M. coruscus* a exposição ao microplástico poliestireno também causou aumento na excreção de amônia relacionado ao aumento do consumo de oxigênio (Sui et al., 2023). Esse tipo de resposta ocorre porque os microplásticos causam um estado de estresse nos organismos, que para a manutenção da homeostase aumenta seu metabolismo, resultando em uma digestão mais eficiente e um maior catabolismo proteico (Gruhn, 2020). Outra hipótese é que os aminoácidos livres, conhecidos efetores osmóticos intracelulares, estariam sendo usados para a manutenção dos processos de regulação osmótica (Weihrauch and Allen, 2018). Assim como *C. gasar* (alteração apenas em 20S) ou *L. thayeri*, outros animais como o caranguejo *Petrolisthes laevigatus* (Urbina et al. 2023) e a água-viva *Rhopilema esculentum* também não alteram a excreção dos compostos nitrogenados após exposição ao microplástico. Os autores sugerem que os organismos forneceram combustível suficiente aos tecidos, evitando o aumento da utilização de proteínas para obtenção de energia.

A relação entre a amônia excretada e o oxigênio consumido (razão O: N) pelos animais é considerado um indicador do tipo de substrato energético que está sendo oxidado (proteína e/ou lipídios) nas mitocôndrias para fornecer energia (Mayzaud and Conover 1988; Führer et al. 2012; Sui et al., 2023). Em determinadas situações os animais podem trocar de substrato energético como estratégia para obter mais energia, como é o caso da oxidação de lipídios, ou porque estão oxidando suas próprias proteínas corporais durante o jejum (Wang

et al., 2021). No presente trabalho verificamos que as espécies estudadas oxidam principalmente proteínas e que a presença do microplástico afeta pouco tal resposta. O caranguejo entre-marés *L. thayeri* é a única espécie que oxida predominantemente uma mistura de proteína e lipídios e que mudou o tipo de substrato energético em duas das salinidades (25 e 30) (ver Tabela 4). Embora as proteínas sejam fundamentais para a construção celular, diversos organismos a utilizam como fonte de energia (Zhao et al. 2017). Porém diversos fatores podem influenciar o tipo de substrato energético oxidado como dietas, sexo, estágios ontogenéticos e até mesmo exposição a contaminantes (Gauquelin et al. 2007; McGaw and Penney 2014; Augusto and Masui 2014). Ainda são pouco conhecidos os efeitos dos microplástico e das salinidades, porém a alteração do substrato energético pode ocorrer para que os animais mantenham a energia necessária para a manutenção da homeostase. O caranguejo entre-marés se alimenta da matéria orgânica presente sedimento. Em *L. thayeri*, as trocas de tipo de substrato energético podem sugerir um déficit energético, talvez por uma falsa sensação de saciedade devido à ingestão de microplástico.

Como visto, a salinidade é um fator importante no que tange aos efeitos dos microplásticos da fisiologia dos invertebrados aqui avaliados. Entretanto o meio em que o plástico está inserido também pode alterar significativamente o seu comportamento e seus processos bioquímicos. A presença do sal na água pode afetar a floculação, sedimentação e a agregação das partículas (Barletta et al., 2019). Em um estudo feito com diferentes salinidades foi observado alterações na cristalinidade (alinhamento de segmentos das cadeias de polímeros) do material, esses resultados sugeriram que, o comportamento químico dos plásticos progrediu de maneira diferente devido às diferentes salinidades da água (Dong et al.,2022). Além disso, diversos estudos já relataram que a variação de salinidade afetou a toxicidade de vários tipos de produtos químicos ambientais, principalmente pela sua alta capacidade de adsorção de substâncias (Hall and Anderson, 1995; Borecka et al., 2016; Rebolledo et al., 2018). No entanto, os efeitos dos microplásticos em diferentes salinidades ainda não estão claros.

Nossos resultados sugerem que as concentrações ambientais de microplásticos em combinação com as salinidades ambientais, podem afetar os

invertebrados marinhos, alterando os padrões fisiológicos analisados. A exposição ao microplástico modificou o metabolismo de diferentes maneiras, causando depressões metabólicas ou maior necessidade de energia para a manutenção da homeostase. As alterações no consumo de oxigênio podem causar prejuízos no crescimento, reprodução, comportamento, osmorregulação, dentre outros. A ostra *C. brasiliiana* foi a espécie que menos teve efeito nos parâmetros fisiológicos avaliados.

5. CONCLUSÃO

Verificamos que os efeitos do microplástico na fisiologia dos invertebrados são bastante dependentes da salinidade, mas não encontramos um padrão de alterações nos mecanismos fisiológicos dos animais expostos ao microplástico em função do seu habitat natural ou grupo taxonômico porque as respostas foram espécie-específicas. De forma geral, o consumo de oxigênio foi o parâmetro mais afetado pela presença de microplástico na água. Visto que o consumo de oxigênio é um importante mecanismo fisiológico associado ao fornecimento de energia para os organismos, tal resposta pode afetar aspectos importantes da biologia dos animais como o crescimento, reprodução, migração, fitness, dentre outros. No entanto, embora a osmorregulação seja um dos mais importantes mecanismos fisiológicos relacionados à permanência ou migração das espécies em diferentes gradientes salínicos, a presença do microplástico não afetou o padrão osmorregulatório dos animais. De forma geral, a ostra *C. brasiliiana* foi a espécie menos afetada pelo microplástico, mostrando ser resiliente no que tange aos mecanismos observados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Sid-Cheikh M., Rowland S.J., Stevenson K., Rouleau,C., Henry T.B., Thompson R.C. 2018. Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 52, 14480–14486.

- Anbumani S., Kakkar P. 2018. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25:14373-96.
- Andrady A.L. 2017. The plastic in microplastics: A review. *Mar. Pollut. Bull.*, 119(1), 12-22.
- Augusto A, New MB, Santos MR, Amorim RV, Valenti WC 2020. Energy budget and physiology in early ontogenetic stages of the Amazon river prawn. *Aquac Rep* 18:100446
- Augusto A., Masui DC (2014) Sex and reproductive stage differences in the growth, metabolism, feed, fecal production, excretion and energy budget of the Amazon River prawn (*Macrobrachium amazonicum*). *Mar Freshw Behav Physiol* 47(6), 373-388.
- Avio C.G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., d'Errico, G., Pauletto M., Bargelloni L., Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ. Pollut.*, 198, 211-222.
- Azra M.N., Noor MI, Eales J., Sung YY., Ghaffar MA 2022. What evidence exists for the impact of climate change on the physiology and behaviour of important aquaculture marine crustacean species in Asia? A systematic map protocol. *Environ. Evid.*, 11(1):1-8.
- Bergmann M, Collard F, Fabres, J, Gabrielsen GW, Provencher JF, Rochman, CM, vanSebile E., Tekman, MB 2022. Plastic pollution in the Arctic. *Nat. Rev. Earth Environ.*, 3(5), 323-337.
- Besseling E, Wang B, Lurling M, Koelmans AA 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environ. Sci. Technol.*, 48(20), 12336-12343
- Betteridge DJ. 2000. What Is Oxidative Stress? *Metabolism*, 49 (Suppl. 1), 3–8.
- Borecka M., Białk-Bielińska A., Haliński L.P., Pazdro K., Stepnowski P., Stolte S. 2016. The influence of salinity on the toxicity of selected sulfonamides and trimethoprim towards the green algae *Chlorella vulgaris*. *J. Hazard. Mater.*, 308, 179-186.
- Burge C.A., Hershberger P.K. 2020. Climate change can drive marine diseases. *Marine disease ecology*, 83-94.

- Byrne M, Foo SA., Ross PM., Putnam, HM. 2020. Limitations of cross-and multigenerational plasticity for marine invertebrates faced with global climate change. *Glob Chang Biol.*, 26(1), 80-102
- Capparelli MV., Abessa D.M., McNamara JC. 2016. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 185, 102-111.
- Cappello T., De Marco G., Conti G.O., Giannetto A., Ferrante, M., Mauceri, A., Maisano, M. 2021. Time-dependent metabolic disorders induced by short-term exposure to polystyrene microplastics in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 209, 111780.
- Cundell A.M. 1973. Plastic materials accumulating in Narragansett Bay. *Mar. Pollut. Bull.*, 4(12), 187-188.
- Cunningham E.M., Cuthbert R.N., Coughlan N.E., Kregting L., Cairnduff V., Dick JT. 2021. Microplastics do not affect the feeding rates of a marine predator. *Sci. Total Environ.*, 779, 146487.
- Ding J., Huang Y., Liu, S., Zhang S., Zou H., Wang Z., Zhu, W., Geng J. 2020. Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless? *J. Hazard. Mater.*, 396, 122693.
- Dinh K.V., Konestabo H.S., Borgå K., Hylland K., Macaulay S.J., Jackson M.C., Verheyen J., Stoks R. 2022. Interactive effects of warming and pollutants on marine and freshwater invertebrates. *Curr. Pollut. Rep.*, 8(4), 341-359.
- Dong J., Li L., Liu Q., Yang M., Gao Z., Qian P., Gao K., Deng, X. 2022. Interactive effects of polymethyl methacrylate (PMMA) microplastics and salinity variation on a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Chemosphere*, 289, 133240.
- Du Y., Zhao J., Teng J., Ren J., Shan E., Zhu X., Zhang W., Wang L., Hou C., Wang, Q. 2023. Combined effects of salinity and polystyrene microplastics exposure on the Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Oxidative stress and energy metabolism. *Mar. Pollut. Bull.*, 193, 115-153.

- Espinel-Velasco N., Hoffmann L., Agüera A., Byrne M., Dupont S., Uthicke S., Webster, N.S., Lamare, M. 2018. Effects of ocean acidification on the settlement and metamorphosis of marine invertebrate and fish larvae: a review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 606, 237-257
- Faleiros R.O., Garçon D.P., Lucena M.N., McNamara J.C., Leone F.A. 2018. Short- and long-term salinity challenge, osmoregulatory ability, and (Na⁺, K⁺)-ATPase kinetics and α -subunit mRNA expression in the gills of the thinstripe hermit crab *Clibanarius symmetricus* (Anomura, Diogenidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 225, 16-25
- Freire C.A., Cuenca A.L. Leite R.D., Prado A.C., Rios L.P., Stakowian N., Sampaio F.D. 2020. Biomarkers of homeostasis, allostasis, and allostatic overload in decapod crustaceans of distinct habitats and osmoregulatory strategies: an empirical approach. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 248, 110750.
- Freire C.A., Togni V.G., Hermes-Lima M. 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 160(2), 291-300.
- Frias J.P.G.L., Roisin N. 2019. Microplastics: finding a consensus on the definition. *Mar. Pollut. Bull.*, 138 (2019): 145-147.
- Gigault J., Ter Halle A., Baudrimont M., Pascal P.Y., Gauffre F., Phi T.L., Hadri H.E., Grass B., Reynaud, S. (2018). Current opinion: what is a nanoplastic? *Environ. Pollut.*, 235, 1030-1034.
- González-Soto N., Hatfield J., Katsumiti A., Duroudier N., Lacave J.M., Bilbao E., Orbea A., Navarro E., Cajaraville M.P. 2019. Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo [a] pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Sci. Total Environ.*, 684, 548-566.
- Green D.S., Boots B., Sigwart J., Jiang S., Rocha C. 2016. Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. *Environ. Pollut.*, 208, 426-434.

- Hall L.W., Anderson R.D. 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25(4), 281-346.
- Han X., Zheng Y., Dai C., Duan H., Gao M., Ali M.R., Sui, L. 2021. Effect of polystyrene microplastics and temperature on growth, intestinal histology and immune responses of brine shrimp *Artemia franciscana*. *J. Oceanol. Limnol* 39(3), 979-988
- Isinibilir M., Svetlichny L., Mykitchak T., Türkeri E.E., Eryalçın K.M., Doğan O., Can G., Yüksel E., Kideys A.E. 2020. Microplastic consumption and its effect on respiration rate and motility of *Calanus helgolandicus* from the Marmara Sea. *Front. Mar. Sci.*, 7, 603321.
- Jiang B., Kauffman A.E., Li, L., McFee W., Cai, B., Weinstein, J., Lead, J.R., Chatterjee S., Scott, G., Xiao, S. 2020 Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: A review. *Environ. Health Prev. Med.*, 25, 29.
- Kershaw P., Katsuhiko S., Lee S., Woodring D. 2011. Plastic debris in the ocean. United Nations Environment Programme.
- Lee Y.H., Kim M.S., Lee Y., Kim D.H., Lee J.S. 2023. Nanoplastics induce epigenetic signatures of transgenerational impairments associated with reproduction in copepods under ocean acidification. *J. Hazard. Mater.*, 449, 131037.
- Lemos D., Phan V.N., Alvarez G. 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Pérez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 261(1), 55-74.
- Medeiros I.P.M., Faria S.C., Souza, M.M. 2020. Osmoionic homeostasis in bivalve mollusks from different osmotic niches: Physiological patterns and evolutionary perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr.*, 240, 110582.
- Miljö A. 2001. Marine Litter--Trash that Kills. Swedish Environmental Protection Agency.

- Mohrig D. 2020. Deep-ocean seafloor islands of plastics. *Science*, 368(6495), 1055- 1055.
- Morris R.J. 1980. Plastic debris in the surface waters of the South Atlantic. *Mar.Pollut. Bull.*, 11(6), 164-166.
- Ospar Commission. 2014. Regional Action Plan for Prevention and Management of Marine Litter in the North-East Atlantic. OSPAR Commission: London.
- Pandori L.L., Sorte C.J. 2019. The weakest link: sensitivity to climate extremes across life stages of marine invertebrates. *Oikos*, 128(5), 621-629.
- Paul-Pont I., Tallec K., Gonzalez-Fernandez C., Lambert C., Vincent D., Mazurais D., Zambonino-Infante J.L., Brotons G., Lagarde F., Fabioux C., Soudant P., Huvet A. 2018. Constraints and Priorities for Conducting Experimental Exposures of Marine Organisms to Microplastics. *Front. Mar. Sci.*, 5, 1–22.
- Rebolledo U.A., Nandini S., Sánchez O.E., Sarma S.S.S. 2018. Combined effects of temperature and salinity on the demographic response of *Proales similis* (Beauchamp, 1907) and *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786)(Rotifera) to mercury. *Chemosphere*, 202, 312-321.
- Rist S.E., Assidqi K., Zamani N.P., Appel D., Perschke M., Huhn M., Lenz, M. 2016. Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 111(1-2), 213-220.
- Scott P.G. 1972. Plastics packaging and coastal pollution. *Int J Environ Stud*, 3(1-4), 35-36
- Shi W., Guo H., Wang J., Han X., Cai W. 2022. Adverse Effects of Co-Exposure to Cd and Microplastic in *Tigriopus japonicus*. *Int. J. Environ. Res. Public. Health Int. J Env Res Pub He* 19(20), 13215.
- Stienbarger C.D., Joseph J., Athey S.N., Monteleone B., Andrady, A.L., Watanabe, W.O., Seaton P., Taylor A.R. Brander, S.M. 2021. Direct ingestion, trophic transfer, and physiological effects of microplastics in the early life stages of *Centropristis striata*, a commercially and recreationally valuable fishery species. *Environ Pollut* 285, 117653.

- Sui Y., Zheng L., Chen Y., Xue Z., Cao Y., Mohsen M., Nguyen H., Zhang S., Lv L., Wang, C. 2022. Combined effects of short-term exposure to seawater acidification and microplastics on the early development of the oyster *Crassostrea rivularis*. *Aquaculture*, 549, 737746.
- Tai T.C., Sumaila U.R., Cheung W.W. 2021. Ocean acidification amplifies multi-stressor impacts on global marine invertebrate fisheries. *Front. Mar. Sci.* 8, 596-644.
- Ul Ahad I., Bartnik A., Fiedorowicz H., Kostecki J., Korczyk B., Ciach T., Brabazon D. 2014. Surface modification of polymers for biocompatibility via exposure to extreme ultraviolet radiation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 102(9), 3298- 3310.
- Urzúa Á., Urbina, M.A. 2017. Ecophysiological adaptations to variable salinity environments in the crab *Hemigrapsus crenulatus* from the Southeastern Pacific coast: sodium regulation, respiration and excretion. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 210, 35-43
- Van Cauwenberghe L., Devriese L., Galgani F., Robbens J., Janssen C.R. 2015. Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects. *Mar. Environ. Res*, 111, 5-17.
- Vargas-Chacoff L., Arjona F.J., Ruiz-Jarabo I., García-Lopez A., Flik G., Mancera, J.M. 2020. Water temperature affects osmoregulatory responses in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *J. Therm. Biol.*, 88, 102526.
- Vargas-Chacoff L., Martínez D., Oyarzún-Salazar R., Paschke K., Navarro J.M. 2021. The osmotic response capacity of the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus* is insufficient to cope with projected temperature and salinity under climate change *J. Therm. Biol.*, 96, 102835.
- Vivekanand A.C., Mohapatra., Tyagi V.K. 2021. Microplastics in aquatic environment: Challenges and perspectives. *Chemosphere*, 282, 131151.
- Wang H., Liang Y., Li S., Chang, J. 2013. Acute toxicity, respiratory reaction, and sensitivity of three cyprinid fish species caused by exposure to four heavy metals. *PloS one*, 8(6), e65282.

- Wang S., Carter C.G., Fitzgibbon Q.P., Smith G.G. 2021. The use of stoichiometric bioenergetics to elucidate metabolic energy substrate use and specific dynamic action in cultured juvenile spiny lobsters (*Sagmariasus verreauxi*) of different nutritional status. *Aquaculture*, 532, 736021.
- Weihrauch D., Allen G.J. 2018. Ammonia excretion in aquatic invertebrates: new insights and questions. *J. Exp. Biol.*, 221(2), jeb169219.
- Wilcox C., Van Sebille E., Hardesty B.D. 2015. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proceedings of the national academy of sciences*, 112(38), 11899-11904.