



Universidade Estadual Paulista - “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - Campus de Registro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

(Zoologia) - Instituto de Biociências de Botucatu (IBB)

Dissertação de mestrado

**EFEITOS TÓXICOS DA AMÔNIA SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA, MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS E
RESPOSTA IMUNE DO PITU *Macrobrachium acanthurus*
(CARIDEA: PALAEMONIDAE)**

Esthephany Konesuk Santos Miranda

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Bertini

Registro (SP)

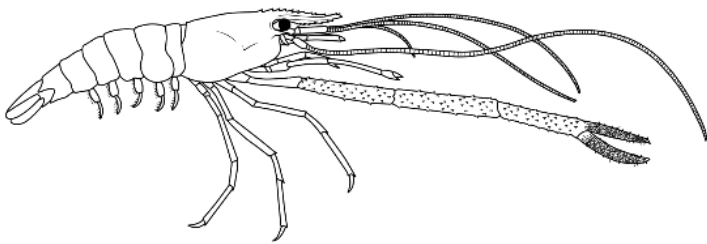
Abril/2024

**EFEITOS TÓXICOS DA AMÔNIA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA,
MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS E RESPOSTA IMUNE DO PITU**
Macrobrachium acanthurus (CARIDEA: PALAEMONIDAE)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Esthephany Konesuk Santos Miranda

Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Giovana Bertini*



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu/SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Registro (SP)

Abril/2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Miranda, Esthephany Konesuk Santos.

Efeitos tóxico da amônia sobre a sobrevivência, morfologia das brânquias e resposta imune do pitu *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) / Esthephany Konesuk Santos Miranda. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Giovana Bertini

Capes: 20400004

1. Amônia. 2. Histologia. 3. Hemócitos. 4. *Macrobrachium carcinus*.


Palavras-chave: CL50-96h; Camarão-de-água-doce; Hemócitos; Histologia das brânquias.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ESTHEPHANY KONESUK SANTOS MIRANDA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 08:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ESTHEPHANY KONESUK SANTOS MIRANDA, intitulada **Efeitos tóxicos da amônia sobre a sobrevivência, morfologia das brânquias e resposta imune do pitu *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Dra. GIOVANA BERTINI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Agronomia e Recursos naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, UNESP- Campus Registro, Profa. Dra. TÂNIA MARCIA COSTA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista - UNESP, Profa. Dra. ALESSANDRA DA SILVA AUGUSTO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista - UNESP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO.

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Dra. GIOVANA BERTINI

Documento assinado digitalmente
 GIOVANA BERTINI
Data: 23/02/2024 13:15:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e inspiração, Prof^ª Dr^ª Giovana Bertini, por toda a dedicação, esforço e parceria para me orientar desde a graduação, e que os próximos anos sejam cada vez mais prósperos e que consigamos atingir juntas mais conquistas.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP, por subsidiar meus estudos pela bolsa de mestrado (Nº 08/2022) que foi essencial para realizar todas as atividades exigidas para receber minha certificação.

À Prof^ª Dr^ª Daniela Garçon, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), que desde o começo se mostrou disponível para nos ajudar nos experimentos e retirar todas as dúvidas durante este período.

À UNESP de Registro e ao LABCRUST (Laboratório de Biologia e Cultivo de Crustáceos) que vem me dando a base para realizar meus estudos desde a graduação e de onde tenho orgulho de dizer que sou formada.

Ao IEaMar (Instituto de Estudos Avançados do Mar) que recentemente foi inaugurado na Unesp de Registro trazendo diversos equipamentos que foram essenciais para obter e analisar meus resultados.

Ao Laboratório de Carcinicultura (Labcar) da UFPR-setor de Palotina e aos alunos de pós graduação, principalmente à Claudia Caramelo, que me ensinou as técnicas e análises que apliquei no trabalho e pelo apoio durante o período em que visitei o laboratório.

À Dr^ª Cláudia Caramelo Brazão e Prof^ª Dr^ª Daniela Garçon pelas valiosas sugestões dadas no momento da qualificação deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente a Maria Luiza, pela amizade e ajuda durante as coletas e execução dos experimentos que tornaram todo o estresse de repetir o mesmo experimento um milhão de vezes mais leve.

Agradeço a minha família por todo apoio, amor e incentivo que me deram durante estes anos de mestrado.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho do qual me orgulho de ter realizado em conjunto a tantos pesquisadores que são inspiração para mim.

A vida não é fácil para ninguém. Mas... O que importa? É necessário preservar e, acima de tudo, confiar em nós próprios. Temos de sentir que somos dotados para realizar uma determinada tarefa e que temos de a alcançá-la, custe o que custar!

Amelie Curie

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Panorama da carcinicultura.....	1
1.2 Qualidade de água na produção aquícola	3
1.3 Efeito da amônia sobre os animais	5
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Coleta dos camarões	9
3.2. Delineamento Experimental - Teste de Tolerância à amônia	10
3.3. Parâmetros de qualidade da água.....	11
3.4. Análise histológica das brânquias	14
3.5 Análises estatísticas	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Sobrevivência e concentração letal mediana (CL ₅₀).....	18
4.2. Contagem Total de Hemócitos (CTH).....	21
4.3. Análise de brânquias: índice do órgão (<i>Iorg</i>)	22
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE 1	48

Resumo

Macrobrachium acanthurus é um camarão-de-água-doce comum na região do Vale do Ribeira, onde é explorado pela pesca artesanal. Tendo em vista sua importância regional e o potencial de cultivo para atender o mercado de iscas vivas, este trabalho teve por objetivo determinar os efeitos tóxicos da amônia em sua sobrevivência através da concentração letal mediana (CL_{50-96h}), descrever as alterações na morfologia das brânquias através de análises histológicas e verificar a resposta imune por meio da contagem de total de hemócitos (CTH) nas fases juvenil e adultos. Para isso os bioensaios foram realizados em pH 8 e temperatura de 26°C para os dois grupos etários seguindo um delineamento completamente casualizado com três réplicas para cada tratamento (concentrações de amônia total) de 0 (controle), 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ para juvenis e adultos (machos e fêmeas ovíferas). As CL_{50-96h} de amônia foram calculadas através da análise de regressão entre log das concentrações de amônia total e a mortalidade dos exemplares, o nível seguro foi determinado como 10% do valor da CL₅₀. Para avaliar a ocorrência de alterações morfológicas nas brânquias foi realizada a análise histológica de acordo com o índice do órgão (*Iorg*) que representa o grau de lesão do órgão. A CTH foi realizada pela retirada de uma amostra da hemolinfa de cinco camarões de cada réplica dos tratamentos. As fêmeas ovíferas obtiveram o maior valor de CL_{50-96h} e nível de segurança de amônia total com valores de 59,2 mg L⁻¹ e 5,9 mg L⁻¹, respectivamente, seguida por juvenis com 54,5 mg L⁻¹ e 5,4 mg L⁻¹ e por macho com 50,4 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹. A amônia demonstrou ser significativamente nociva para as brânquias de juvenis e adultos de *M. acanthurus*, corroborando com os dados observados de mortalidade dos animais. Para o controle e os tratamentos de 20 e 40 mg L⁻¹ (abaixo da CL₅₀) foram observadas alterações de menor fator de importância e possíveis de serem revertidos com o fim da exposição à amônia, como infiltração e aglomerado de hemócitos e inchaço das lamelas. Já nos tratamentos de 60 e 80 mg L⁻¹ (acima da CL₅₀) ocorreu uma maior frequência de danos irreversíveis como pontos de necrose e a ruptura das lamelas branquiais. Para a análise da CTH com adultos foi verificado que para as concentrações abaixo da CL₅₀ a quantidade de hemócitos permaneceu inalterada em relação ao controle, mas nas concentrações acima da CL₅₀ ocorreu um aumento na quantidade de hemócitos presente na hemolinfa dos animais, este resultado pode estar associado a resposta imune inata dos indivíduos ao agente estressor. Os dados de efeito e tolerância de amônia apresentados neste trabalho são de grande relevância para preencher o pacote tecnológico de produção de *M. acanthurus* tendo como foco impulsionar a produção brasileira de espécies nativas de água doce.

Palavras-chave: CL_{50-96h}, Histologia das brânquias, Hemócitos, Camarão-de-água-doce.

Abstract

Macrobrachium acanthurus is a freshwater shrimp common in the Vale do Ribeira region, where it's exploited by artisanal fisheries. Considering it's regional importance and the cultivation potential to serve the live bait market, this work aimed to determine the toxic effects of ammonia on their survival through the median lethal concentration (LC_{50-96h}), describing the changes in gill morphology through histological analyzes and verify the immune response through total hemocyte counts (THC) in the juvenile and adult stages. For this purpose, bioassays were carried out at pH 8 and a temperature of 26°C for the two age groups following a completely randomized design with three replicates for each treatment (total ammonia concentrations) of 0 (control), 20, 40, 60 and 80 mg/L for juveniles and adults (males and ovigerous females). Ammonia LC_{50-96h} were calculated through regression analysis between log of total ammonia concentrations and specimen mortality, the safe level was determined as 10% of the LC₅₀. To evaluate the occurrence of morphological changes in the gills, histological analysis was performed according to the organ index (*Iorg*), which represents the degree of organ damage. THC was performed by removing a hemolymph sample from five shrimp from each treatment replicate. Ovigerous females obtained the highest LC_{50-96h} value and ammonia safety level with values of 59.2 mg/L and 5.9 mg/L, respectively, followed by juveniles with 54.5 mg/L and 5.4 mg/L and for males with 50.4 mg/L and 5.0 mg/L. Ammonia proved to be significantly harmful to the gills of juveniles and adults of *M. acanthurus*, corroborating the observed data on animal mortality. For the control and treatments of 20 and 40 mg/L (below LC₅₀), changes of minor importance and possible to be reversed with the end of exposure to ammonia were observed, such as infiltration and clustering of hemocytes and swelling of the lamellae. In treatments of 60 and 80 mg/L (above LC₅₀), there was a greater frequency of irreversible damage such as points of necrosis and rupture of the gill lamellae. For the THC analysis, it was found that for concentrations below LC₅₀ the quantity of hemocytes remained unchanged in relation to the control, but at concentrations above LC₅₀ there was a increase in the quantity of hemocytes present in the hemolymph of the animals, this result may be associated with the innate immune response of individuals to the stressor. The ammonia effect and tolerance data presented in this work are of great relevance to complete the technological package to produce *M. acanthurus*, focusing on boosting the Brazilian production of native freshwater species.

Keywords: LC_{50-96h}, Gill histology, Hemocytes, Freshwater shrimp.



1. INTRODUÇÃO

1.1 Panorama da carcinicultura

Sustentabilidade é um termo que vem sendo amplamente utilizado ao decorrer dos anos, vindo da urgência do ser humano em adaptar suas necessidades básicas dentro dos limites impostos pela natureza (Valenti *et al.* 2018; Verma, 2019). Em função da constante degradação ambiental, o desenvolvimento sustentável tem entrado em pauta visando garantir a qualidade de vida das gerações futuras (Geraldo & Pinto, 2019). Neste contexto, em 2015 a Organização das Nações Unidas (ONU) criou a chamada Agenda 2030 onde foram elaborados 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) que tem como propósito incentivar os países a seguirem estes modelos de desenvolvimento sustentável para proteger o meio ambiente e o clima, acabar com a pobreza e a fome no mundo, visando a qualidade de vida das pessoas. Foi estimado que no ano pós pandemia (2022) em média 735 milhões de pessoas enfrentaram a fome, com um aumento de 19,9% em relação a 2019 (FAO *et al.*, 2023). Mesmo com o objetivo global de erradicar a fome no mundo, é previsto que em 2030 quase 600 milhões de pessoas no mundo ainda sofrerão subnutrição crônica (FAO *et al.*, 2023). Desta forma, há uma urgência em produzir alimento de forma rápida e segura para afastar este cenário da realidade.

A produção em sistemas aquícolas são empreendimentos altamente visados como uma alternativa sustentável de produção de alimentos devido suas características de otimizar o uso de recursos naturais e de capital, aumentando a produtividade e reduzindo o impacto ambiental (New *et al.*, 2000; FAO, 2018; Valenti *et al.* 2018). Além disso, este meio produtivo engloba as ODS's de número 2 - fome zero e agricultura sustentável; nº 8 - trabalho decente e crescimento econômico; nº 12 - consumo e produção responsáveis e nº 14 - vida na água. Segundo dados da FAO (2022) no ano de 2020 a carcinicultura foi responsável pela produção de 11 milhões de toneladas de crustáceos em peso vivo de alimento, sendo que o camarão marinho *Penaeus vannamei* se destacou como o mais produzido, sendo responsável por pouco mais da metade da produção total (51,7%), seguida por espécies de lagostins, caranguejos e demais camarões marinhos e dulcícolas. Dentre os camarões dulcícolas, destacam-se as espécies *Macrobrachium rosenbergii* e *Macrobrachium nipponense* que foram responsáveis por 2,6 e 2% da produção global de crustáceos, respectivamente. Tal fato evidencia o potencial

produtivo das espécies deste gênero dentro da carcinicultura e a necessidade de investir em pacotes tecnológicos de produção.

No Brasil a produção de camarão vem aumentando ao longo dos anos, sendo que em 2022 totalizou uma produção de 113,3 milhões de quilos, com crescimento de 5,9% em relação ao ano anterior (IBGE PPM, 2022). Entretanto, a produção brasileira segue o mesmo cenário mundial voltado majoritariamente para a espécie marinha *P. vannamei*, exótica no país, com produção principalmente na região nordeste (Rocha, 2022). A carcinicultura dulcícola brasileira ainda é pouco desenvolvida, mas é um dos setores da aquicultura que vem apresentando notável crescimento nos últimos anos, onde os camarões do gênero *Macrobrachium* são as principais espécies alvo deste nicho (New & Nair, 2012). Atualmente a produção está voltada para a espécie exótica *M. rosenbergii* por apresentar um grande porte e crescimento rápido (Ismael & New, 2000). No entanto, espécies nativas como *Macrobrachium acanthurus*, *Macrobrachium carcinus* e *Macrobrachium amazonicum*, apresentam destacada importância socioeconômica e interesse para produção em sistemas de cultivo desde a década de 1980 (Coelho *et al.*, 1982; Valenti, 1985; Kutty *et al.*, 2000).

Dentre as espécies nativas, *M. acanthurus* conhecido como camarão-canela ou pitu, apresenta distribuição geográfica ampla (Carolina do Norte, nos Estados Unidos, até o Rio Grande do Sul, no Brasil) podendo ser encontrado em rios, estuários e pequenas lagoas que deságuam no Oceano Atlântico (Tamburus *et al.*, 2012; Anger, 2013; Pileggi *et al.*, 2014). Este camarão é muito comum na bacia do Rio Ribeira de Iguape (SP), onde é fortemente explorado pela pesca artesanal, tanto para consumo humano quanto para o mercado de iscas vivas e pesca esportiva, atividade muito comum na região (Bertini & Valenti, 2010). Essa atividade pode provocar redução dos estoques naturais, comprometendo esse recurso pesqueiro e afetar seu ciclo reprodutivo, justificando a necessidade de desenvolver técnicas de produção para evitar sua sobrepesca e assegurar o desenvolvimento dos seus estoques (Bertini *et al.*, 2014; Bertini & Baeza, 2014; Rodrigues *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2021).

Pelo alto interesse econômico que *M. acanthurus* apresenta existem vários estudos efetuados com este camarão relacionados, principalmente, com a biologia populacional e reprodutiva (Albertoni *et al.*, 2002; Tamburus *et al.*, 2012; Bertini & Baeza, 2014; Bertini *et al.*, 2014), desenvolvimento embrionário (Müller *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2017) e desenvolvimento larval (Choudhury, 1970; Quadros, *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2017). Além desses, outros trabalhos abordaram o estudo de tecnologias e parâmetros adequados para

auxiliar na propagação dessa espécie em cativeiro (Choudhury, 1971; Ismael & Moreira, 1997; Cunha & Oshiro, 2010; Costa *et al.*, 2016 e 2017; Rodrigues *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018 e 2021).

O camarão-canela é descrito como uma espécie resistente e com boas adaptações metabólicas à temperatura e baixo teor de oxigênio (Dobkin *et al.*, 1975; Bernardi, 1990), alta capacidade osmorregulatória (Gasca-Leyva *et al.*, 1991; Gonzales-Pena *et al.*, 1998), alta fecundidade (Granados-Berber, 1984; Valenti *et al.*, 1989), resistência a doenças e alto valor econômico (Gasca-Leyva *et al.*, 1991). Apesar de não ser uma espécie de grande porte como seus congêneres *M. carcinus* e *M. rosenbergii*, há estudos que mostram que *M. acanthurus* é capaz de atingir tamanhos aceitáveis pelo mercado em seis meses de produção (Gasca-Leyva *et al.*, 1991), onde os machos podem atingir até 158 mm de comprimento total, enquanto as fêmeas atingem 108 mm (Valenti *et al.*, 1987; Albertoni *et al.*, 2002). Este camarão possui ainda características ideais para o mercado de iscas vivas no qual o foco são espécies de menor porte, tal como o camarão marinho *Litopenaeus schmitti*, onde buscam animais com 90 a 100 mm comprimento total e no máximo 120 mm (De Barros *et al.*, 2014).

1.2 Qualidade de água na produção aquícola

O cultivo de espécies nativas é muito discutido na literatura visto que o risco de escape de espécies exótica em ambiente natural é altamente danoso para a diversidade uma vez que as espécies exóticas podem competir com as nativas fazendo com que ocorra alterações de habitat, na estrutura da comunidade, hibridização de espécies, perda de patrimônio genético, introdução de doenças e parasitas, entre outros fatores (Gazola-Silva, 2007; Silva, 2011; Da Silva, 2015). Apesar de todos os trabalhos publicados como incentivo à produção de espécies nativas, ainda existem poucas informações para iniciar a criação de *M. acanthurus* em sistemas aquícolas no Brasil. Neste contexto, a qualidade da água é essencial para o sucesso da carcinicultura e de outras atividades aquícolas (Kubitza, 2003). Por isso, é preciso tomar medidas para preservar o bem-estar dos animais, de modo a prevenir doenças e aumentar a produtividade, sendo que as variáveis d'água mais relevantes para tal é o oxigênio dissolvido e os compostos nitrogenados.

Os compostos nitrogenados apresentam grande importância no ambiente aquático natural e artificial, sendo essenciais para a manutenção da vida de vários microrganismos

aquáticos (Romano & Zeng, 2013). Em sistemas de produção sua ocorrência está associada à decomposição da matéria orgânica no ambiente, oriundo majoritariamente da excreta dos animais e das sobras de ração (Tomasso, 1994). Suas principais funções estão relacionadas aos processos metabólicos e na formação de proteínas, por serem componentes básicos da biomassa (Dutra *et al.*, 2017). O nitrogênio se apresenta na forma de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3), amônio (NH_4^+), óxido nitroso (N_2O), nitrogênio molecular (N_2), nitrogênio orgânico dissolvido (ureia, peptídeos, purinas, aminas, aminoácidos etc.) e nitrogênio orgânico particulado (bactérias, fitoplâncton, zooplâncton e detritos) (Vieira *et al.*, 2006).

A amônia por ser um importante poluente ambiental está entre os parâmetros mais relevantes para monitorar a qualidade da água (Yue *et al.*, 2010). De acordo com a Resolução CONAMA n°430 de 13/05/2011, que diz respeito sobre as condições e padrões para lançamento de efluentes, a concentração máxima de amônia total que pode ser lançada no ambiente é de 20 mg L^{-1} , ressaltando a importância do controle deste parâmetro em águas de cultivo. O uso de amônia como parâmetro de qualidade da água se deve por impactar importantes processos fisiológicos e fisiopatológicos como crescimento, metamorfose, regulação osmótica, imunidade, reprodução, metabolismo, sobrevivência e excreção em camarões e demais crustáceos (Hong *et al.*, 2007; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2017). Nos estudos de Romano & Zeng (2013) e Zhao *et al.* (2020) há uma ampla revisão sobre o assunto enfocando os fatores que influenciam a toxicidade da amônia e as consequências fisiológicas, do estresse causado pela amônia no crescimento, bioquímica e imunidade dos decápodes.

Em ambientes aquáticos a amônia pode ser encontrada sob duas formas, ionizada ou íon amônio (NH_4^+) e não ionizada (NH_3) e a soma das duas representa a amônia total. A forma não ionizada é particularmente mais tóxica para os animais aquáticos, uma vez que o gás pode se difundir facilmente através das bicamadas lipídicas (brânquias) adentrando na hemolinfa dos crustáceos (Weihrauch *et al.*, 2004; Kir & Kumlu, 2006). As duas formas da amônia existem em um equilíbrio químico, onde a proporção de NH_3 em relação a amônia total depende de fatores como a salinidade, temperatura e pH (Emerson *et al.*, 1975; Lin & Chen, 2001). Embora poucos estudos tenham investigado a influência do pH na toxicidade da amônia em crustáceos, os resultados são consistentes, mostrando que quanto mais básico pH mais letal será o efeito da amônia (Straus *et al.*, 1991; Romano & Cheng, 2013). Isso provavelmente se deve ao fato da forma NH_3 se tornar mais prevalente (Armstrong *et al.*, 1978; Noor-Hamid *et al.*, 1994).

Os crustáceos dependem da qualidade da água para sobreviver e estão cada vez mais sujeitos a águas contaminadas ou de baixa qualidade (Silva & Martinez, 2007; Ribeiro *et al.*, 2020). A exposição a contaminantes ou a alteração dos parâmetros físicos e químicos da água provoca respostas de estresse nesses organismos (Camargo & Alonso, 2006), tornando a realização de estudos que revelem o efeito tóxico da amônia sobre os organismos aquáticos de suma importância. Uma maneira de se obter essas informações é por meio de estudos de toxicidade aguda a partir da avaliação da CL₅₀ (concentração letal mediana), por apresentarem resposta com maior reprodutibilidade e confiança (Zagatto & Bertolotti, 2008). Além disso, de acordo com o estudo realizado para peixes por Sprague (1971) é importante determinar o nível de segurança deste tóxico, que corresponde a concentrações abaixo de 10% do valor estabelecido para a CL₅₀ onde a amônia não irá surtir efeitos negativos para os animais analisados. Os testes de CL₅₀ têm sido efetuados em várias espécies de camarões peneídeos de importância econômica (Ostrensky & Wasielesky, 1995; Lin & Chen, 2001; Kir & Kumlu, 2006), camarões-de-água-doce do gênero *Macrobrachium* (Armstrong *et al.*, 1978; Straus *et al.*, 1991; Dutra *et al.*, 2016) e em braquiúros (Hong *et al.*, 2007; Romano & Zeng, 2007; Romano & Zeng, 2010) onde é possível verificar que de modo geral os valores de CL₅₀ determinados estão por volta de 30 a 40 mg L⁻¹ de amônia total, conseqüentemente apresentando um nível de segurança entre 3 e 4 mg L⁻¹.

1.3 Efeito da amônia sobre os animais

As brânquias são órgãos multifuncionais de grande importância para os crustáceos, pois elas são responsáveis pelas trocas gasosas, excreção de nitrogenados, desintoxicação, osmorregulação e equilíbrio ácido-base (Péqueux, 1995; Weihrauch *et al.*, 2002 e 2004; Salas *et al.*, 2007). Pelo fato de as brânquias estarem em contato direto com o meio externo este órgão se torna altamente vulnerável a poluentes aquáticos, o que o torna um mecanismo ideal para entender como estes compostos podem influenciar a sua morfologia (Salas *et al.*, 2007; Romano & Zeng, 2010). Assim, quando os níveis de amônia excedem os limites de tolerância dos animais podem causar danos diretos aos tecidos branquiais, bem como afetar a respiração, metabolismo, imunidade, regulação osmótica, excreção, muda e crescimento (Rebelo *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2018). As alterações na fisiologia e morfologia das brânquias pela exposição aguda à amônia foi demonstrado para vários crustáceos, entre eles o caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Rebelo *et al.*, 2000), o siri *Portunus pelagicus* (Romano & Zeng, 2010) e o camarão *M. amazonicum* (Dutra *et al.*, 2017;

Brazão *et al.*, 2021). Tais autores demonstraram por meio de análises histológicas que as brânquias sofrem alterações prejudiciais incluindo necrose, tumefação celular, dano epitelial, colapso das lamelas e inflamação (infiltração de hemócitos). A identificação dessas lesões são uma ótima adição a estudos de CL₅₀ já que dessa forma é possível verificar o estresse sofrido pelos animais e uma das causas de sua morte.

Os níveis elevados de amônia geram um ambiente estressante para os animais aquáticos os induzindo a produzir uma resposta imune (Spriggs *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016), pois altos níveis de amônia diminuem a imunidade e aumentam a suscetibilidade a patógenos (Qiu *et al.*, 2018). A hemolinfa é caracterizada por se constituir em um fluido de coloração azul-esverdeada, capaz de atingir diretamente todos os tecidos dos crustáceos, composto por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração líquida, o plasma (Maldonado *et al.*, 2004). Dentre as funções dos hemócitos estão a resposta inflamatória de defesa contra agentes externos e de coagulação (Barbieri & Ostrensky, 2002). Níveis elevados de amônia reduzem a capacidade de transporte de oxigênio pela hemocianina, que se acredita ser um dos principais mecanismos pelos quais a amônia causa toxicidade em camarões (Chand & Sahoo, 2006). Assim, a ação dos efeitos tóxicos da amônia tem sido investigada na hemolinfa dos crustáceos, que constitui o principal sistema imune desses organismos.

A influência do estresse na resposta imune dos crustáceos tem sido demonstrada em vários estudos com camarões expostos a concentrações de amônia (Chen *et al.*, 2019b; Zhang *et al.*, 2018; Fajardo *et al.*, 2019; Long *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020), nitrito (Zheng *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020), hipóxia (Chen *et al.*, 2019a; Zheng *et al.*, 2022), variação de salinidade (Esparza *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2020) ou temperaturas (Duan *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020) e situação de cativeiro (Dong *et al.*, 2018). Tais estudos evidenciam alterações nos componentes celulares e humorais do sistema imunológico dos animais. Além disso, vários autores concordam que um aumento da CTH poderia conferir maior proteção contra doenças em crustáceos decápodes (Truscott & White, 1990; Le Moullac *et al.*, 1998; Le Moullac & Haffner, 2000). As alterações na contagem de hemócitos em várias espécies de decápodes expostos à amônia mostram que este fator é altamente espécie-específico, onde para muitas o mecanismo leva à diminuição da CTH após a exposição ao composto (Le Moullac & Haffner, 2000; Hu *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Verghese *et al.*, 2007; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008; Yue *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020). Em alguns casos, no entanto, como no estudo de Romano e Zeng (2010), os valores da CTH

aumentaram com a exposição da amônia para *Portunus pelagicus*, mas, manteve-se inalterada para *P. vannamei* (Liu & Chen, 2004) e *M. rosenbergii* (Cheng & Chen, 2002).

No geral, pouca atenção tem sido dada aos camarões-de-água-doce em relação aos efeitos tóxicos da amônia em sua fisiologia em comparação com os peneídeos de grande interesse econômico, destacando os estudos realizados com as espécies *M. amazonicum* (Dutra *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2017; Brazão *et al.* 2021), *M. rosenbergii* (Armstrong *et al.*, 1978; Straus *et al.*, 1991; Cheng & Chen, 2000; Cheng & Chen, 2002; Cheng *et al.*, 2002) e *M. nipponense* (Wang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2023). Além disso, as respostas fisiológicas destes animais podem exibir variações de acordo com o sexo, ciclo de muda, estratégia reprodutiva e estágio ontogenético (Augusto & Masui, 2014). Portanto, dada a elevada importância de *M. acanthurus* por se tratar de uma espécie nativa com grande potencial de cultivo e a falta de dados sobre sua tolerância em relação a amônia total, este trabalho propõe determinar os efeitos deste composto em sua ontogenia avaliando o efeito na sobrevivência, ocorrência de danos ao órgão branquial e alterações em sua resposta imune.

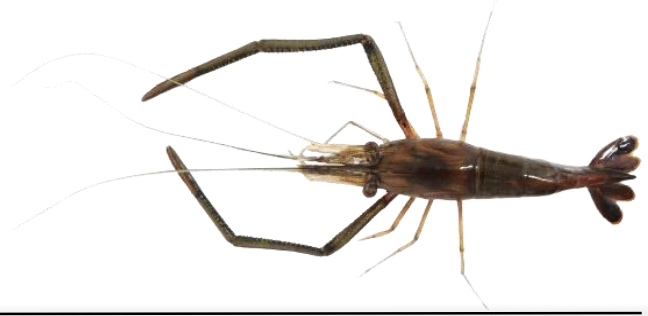


2. OBJETIVOS

O presente estudo visa avaliar o efeito tóxico da amônia na sobrevivência, morfologia das brânquias e resposta imune do camarão-de-água-doce *M. acanthurus*.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar o efeito da amônia total na sobrevivência de diferentes estágios ontogenéticos de *M. acanthurus*;
- Aferir a concentração letal mediana (CL₅₀) assim como a concentração segura de amônia para juvenis e adultos;
- Avaliar a ocorrência de alterações morfológicas nas brânquias dos indivíduos submetidos à exposição de amônia por meio de análises histológicas;
- Avaliar o efeito tóxico da amônia sobre a quantidade de hemócitos presente na hemocianina dos indivíduos adultos de *M. acanthurus*.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos camarões

Para a realização dos experimentos, a coleta dos camarões foi realizada durante os meses do verão (Novembro/2022 a Março/2023) no rio Ribeira de Iguape, Iguape (SP) (24°41' 20.320" S; 47°34'0.443" O). A temperatura média no local de coleta foi de 26,9°C, pH de 7,2 e salinidade de 0,1 ppt. As coletas foram direcionadas para cada grupo etário (juvenis e adultos) utilizando-se uma peneira com malha de 3mm entre-nós (80cm diâmetro), que foi passada sob a vegetação marginal do rio com esforço de duas pessoas até atingir o número suficiente de animais para a condução dos bioensaios (Figura 1).



Figura 1. Método de coleta dos exemplares de *Macrobrachium acanthurus* através de peneira no rio Ribeira de Iguape, Iguape, SP, para realização dos bioensaios em laboratório. A) Exemplar de fêmeas ovígera de *M. acanthurus*; B) Processo de seleção *M. acanthurus* através da medida do comprimento da carapaça do animal; C) Coleta dos indivíduos através da peneira na vegetação marginal do rio; D) Exemplar de macho de *M. acanthurus*.

Após a coleta os animais foram transferidos para isopores contendo água do próprio local de amostragem e, em seguida, transportados para o laboratório, onde foram aclimatados por 24h em caixas de polietileno com capacidade para 60L (32,5 x 38,5 x 62cm) providas com água doce proveniente de abastecimento público previamente decloradas com tiosulfato de sódio, aeração constante, fotoperíodo natural (12 horas claro e 12 horas escuro) e mantidos em jejum 24 horas antes do início dos experimentos.

Os exemplares foram identificados de acordo com Melo (2003). Juvenis foram determinados de acordo com Bertini & Baeza (2014), ou seja, indivíduos menores que 9 mm de comprimento de carapaça (CC = distância tomada desde a parte posterior da órbita ocular até a parte mediana posterior da carapaça), os quais foram mensurados sob estereomicroscópio com a ocular micrométrica, não havendo separação dos sexos. Desta forma os juvenis apresentaram um CC médio de $5,7 \pm 1,1$ mm (máx.= 8,6 mm; mín.= 3,4 mm). Os adultos foram separados em machos e fêmeas, onde os machos tiveram CC médio de $15,1 \pm 1,0$ mm (máx.= 17,2 mm; mín.= 12,6 mm) e as fêmeas de $13,8 \pm 1,1$ mm (máx.= 16,4 mm; mín.= 11,8 mm). As fêmeas foram padronizadas como ovígeras com ovos no estágio inicial de desenvolvimento embrionário, de modo a evitar que elas sofressem mudas durante o experimento.

3.2. Delineamento Experimental - Teste de Tolerância à amônia

A metodologia utilizada na avaliação do efeito toxicológico da amônia foi realizada de acordo com o descrito por Peltier & Weber (1985) para CL_{50} em 96 h em sistema de água estático com animais em jejum.

Para a determinação dos tratamentos (concentrações de amônia total) foram realizados testes preliminares para cada fase (jovens e adultos) para inferir qual a concentração de amônia causa 100% de mortalidade e, a partir desta, foram determinadas cinco concentrações: 0 (controle), 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ para juvenis e adultos.

O delineamento experimental foi completamente casualizado realizado em triplicatas. Foram utilizados 10 camarões por réplica em cada tratamento, totalizando 150 indivíduos machos, fêmeas ovígeras e juvenis, que foram distribuídos aleatoriamente nas unidades experimentais. Para os adultos, as unidades experimentais foram caixas de polietileno com volume útil de 18L de água, já para os juvenis foram utilizadas caixas com volume útil de 4L de água. As unidades experimentais foram preparadas através da adição da massa específica de

cloreto de amônio P.A. (NH₄Cl) necessária para atingir as concentrações de amônia total de cada tratamento (Figura 2).

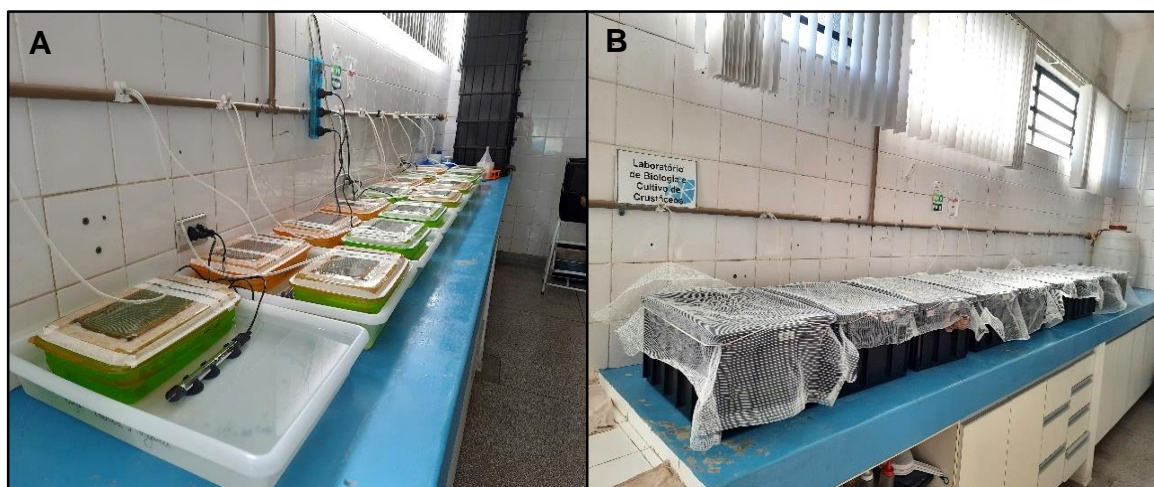


Figura 2. Unidades experimentais dos bioensaios realizados com juvenis (A) e adultos (B) de *Macrobrachium acanthurus*.

As observações e anotações da mortalidade foram realizadas a cada 12h de experimento, sendo que nas primeiras 8h os organismos foram observados a cada uma hora. O critério para avaliação da mortalidade foi a ausência de qualquer tipo de movimento ou reação a estímulos mecânicos dos camarões por meio de bastão de vidro.

3.3. Parâmetros de qualidade da água

No início e final do experimento foram determinadas as concentrações de nitrito e amônia total (Bendschneider & Robinson, 1952; UNESCO, 1983) por meio de análises colorimétricas e leitura em espectrofotômetro. Para determinar a concentração de amônia não ionizada/tóxica foi realizado o cálculo determinado por Emerson *et al.* (1975):

$$NH_3^- = \frac{[NH_3 + NH_4^+]}{1 + 10^{(pKa-pH)}}$$

Onde:

NH₃ = amônia não ionizada

NH₄⁺ = amônia ionizada

[NH₃ + NH₄⁺] = amônia total

pKa = - log Ka, calculado como pKa = 0,09018 + 2729,92 / T;

T = temperatura em ° Kelvin;

As variáveis temperatura e pH foram controladas durante todo o período experimental de modo que estivessem na faixa de $26\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $8,0\pm 0,2$, respectivamente, de modo a estar dentro do indicado para as espécies do gênero (Sampaio *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2002). O controle do pH foi realizado através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) (Chen & Kou, 1993) sempre que o pH estava abaixo de 7,8, e a temperatura foi controlada através de termostato e ar-condicionado. Estes parâmetros foram monitorados com um aparelho multiparâmetro (YSI-ProPlus).

Desta maneira, no bioensaio dos juvenis a temperatura média foi de $25,9\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, OD de $7,4\pm 0,3\text{ mg L}^{-1}$ e pH de $8,1\pm 0,1$; já para os experimentos com indivíduos adultos a temperatura média foi de $25,9\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, OD de $5,6\pm 0,1$ e pH de $8,0\pm 0,1$ para machos, e para fêmeas foi de $25,7\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, OD de $5,7\pm 0$ e o pH de $7,9\pm 0,1$. Os valores médios para cada tratamento podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros médios de qualidade de água \pm desvio padrão por tratamento e grupo ontogenético de *Macrobrachium acanthurus*.

Estágio ontogenético	Tratamento	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	OD (mg L^{-1})	pH	NH_4^+	NH_3
Juvenis	Controle	$25,8\pm 0,2$	$7,0\pm 0,1$	$7,9\pm 0,0$	$0,1\pm 0$	0 ± 0
	20 mg L^{-1}	$25,9\pm 0,1$	$7,6\pm 0,1$	$8,1\pm 0,0$	$19\pm 0,1$	$1,3\pm 0,0$
	40 mg L^{-1}	$26,0\pm 0,2$	$7,6\pm 0,0$	$8,2\pm 0,0$	$36\pm 0,4$	$1,6\pm 0,1$
	60 mg L^{-1}	$25,8\pm 0,1$	$7,3\pm 0,1$	$8,0\pm 0,0$	$61\pm 1,4$	$3,6\pm 0,2$
	80 mg L^{-1}	$25,9\pm 0,3$	$7,6\pm 0,0$	$8,2\pm 0,0$	$79\pm 0,6$	$6,5\pm 0,5$
Machos	Controle	$25,8\pm 0,1$	$5,7\pm 0,1$	$7,9\pm 0,0$	$0,2\pm 0$	$0,0\pm 0$
	20 mg L^{-1}	$26,1\pm 0,1$	$5,5\pm 0,1$	$8,0\pm 0,0$	$19\pm 0,3$	$1,2\pm 0,1$
	40 mg L^{-1}	$26,1\pm 0,0$	$5,6\pm 0,0$	$8,0\pm 0,0$	$42\pm 0,7$	$2,4\pm 0,2$
	60 mg L^{-1}	$26,0\pm 0,0$	$5,6\pm 0,0$	$7,9\pm 0,0$	$62\pm 0,4$	$3,2\pm 0,1$
	80 mg L^{-1}	$25,7\pm 0,1$	$5,7\pm 0,0$	$7,9\pm 0,0$	$79\pm 1,0$	$3,3\pm 0,2$
Fêmeas	Controle	$25,7\pm 0,1$	$5,7\pm 0,0$	$7,9\pm 0,0$	$0,3\pm 0$	$0,0\pm 0$
	20 mg L^{-1}	$25,8\pm 0,1$	$5,7\pm 0,0$	$8,0\pm 0,0$	$19\pm 0,2$	$1,1\pm 0,0$
	40 mg L^{-1}	$25,6\pm 0,0$	$5,7\pm 0,0$	$7,9\pm 0,0$	$39\pm 0,8$	$1,8\pm 0,1$
	60 mg L^{-1}	$25,6\pm 0,1$	$5,7\pm 0,0$	$7,9\pm 0,0$	$60\pm 0,6$	$2,5\pm 0,0$
	80 mg L^{-1}	$25,6\pm 0,0$	$5,7\pm 0,0$	$7,9\pm 0,0$	$81\pm 0,8$	$3,3\pm 0,1$

3.4. Contagem total de hemócitos (CTH)

A coleta da hemolinfa foi realizada apenas para os animais adultos devido à dificuldade de retirar o material dos animais juvenis. Para isto, durante o período experimental foram coletados 5 camarões por réplica dos tratamentos quando estes estavam moribundos (sem apresentar comportamento de fuga rápida, mas com movimento de seu escafognatito) e para aqueles que sobreviveram ao fim das 96 horas experimentais foi realizada a insensibilização em gelo para coleta do material na região do pericárdio através de uma seringa estéril de 1mL e agulha de 13x0.45mm. O material coletado foi imediatamente transferido para um eppendorf contendo solução anticoagulante modificada de Alsever a 4°C (27 mM de citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7.0, suplementado com 4% de formol 37%), mantendo uma proporção de 1:9 de hemolinfa:anticoagulante (Vieira *et al.*, 2016) (Figura 3).

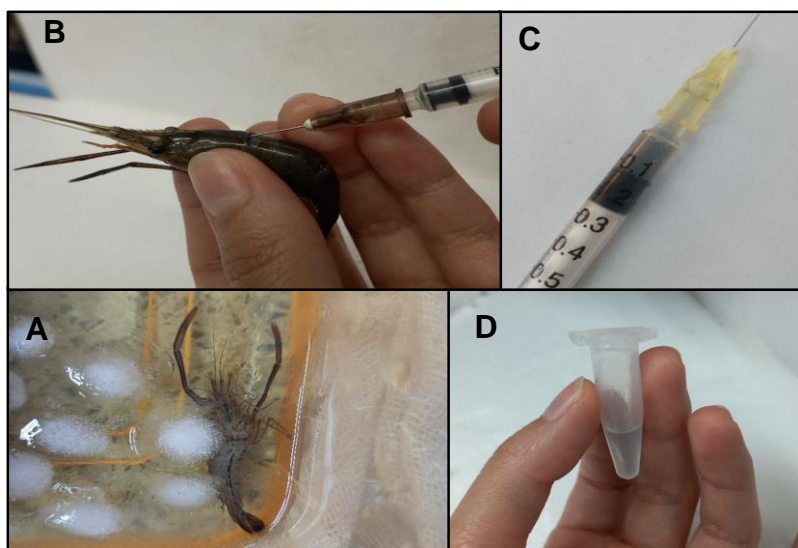


Figura 3. Processo de coleta da hemolinfa dos exemplares adultos de *Macrobrachium acanthurus* para a realização da análise de contagem total de hemócitos (CTH). A) Insensibilização do animal em gelo; B) Coleta da hemolinfa na região do pericárdio do animal; C) Hemolinfa recém coletada; D) Solução de hemolinfa e anticoagulante para ser analisada.

A hemolinfa coletada foi armazenada em geladeira a 4°C para a futura realização da CTH em uma câmara de Neubauer sob microscópio com duas réplicas de cada uma das quatro seções de 0,1 mm³ sendo contadas. A média foi denominada pela contagem da câmara de Neubauer. Desta forma, a CTH (células.mL⁻¹) foi calculada como:

$$CTH.mL^{-1} = \frac{N^{\circ}TCC}{N^{\circ}QC} \times FD \times 10.000$$

Onde:

CTH/mL⁻¹: contagem total de hemócitos por mililitro;

N° TCC: número total de células contadas;

N° QC: número de quadrante contados;

FD: fator de diluição;

10.000: fator de conversão da câmara de Neubauer.

3.4. Análise histológica das brânquias

Os mesmos 5 exemplares utilizados para a coleta da hemolinfa foram utilizados para a análise de brânquias. Para isso o cefalotórax dos animais (juvenis e adultos) foi seccionado e fixado em solução Alfac por 48 horas (Lightner & Bell, 1998; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001). Após este período as brânquias foram dissecadas e transferidas para álcool 70%, e reservadas até o momento do processamento histológico (Shukla *et al.*, 2019) (Figura 4).

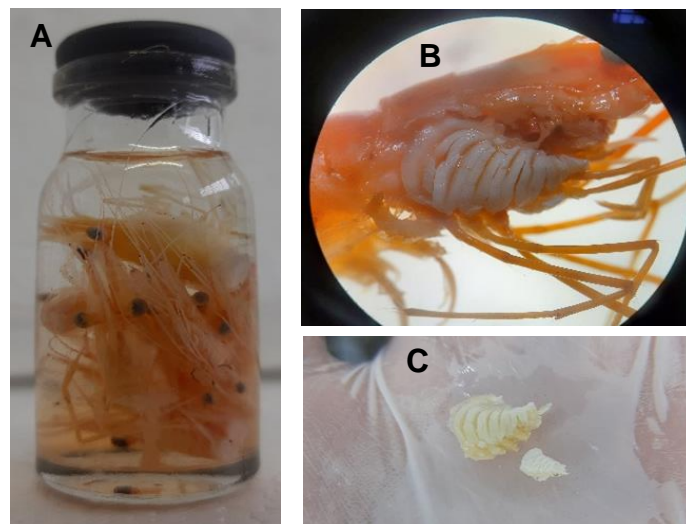


Figura 4. Armazenamento do cefalotórax dos exemplares juvenis e adultos de *Macrobrachium acanthurus* e retirada do arco branquial para posterior realização da análise histológica. A) Cefalotórax dos animais fixado em álcool 70%; B) Arco branquial de *M. acanthurus* visto em estereomicroscópio; C) Arco branquial dissecado para realização do processamento histológico.

Para a preparação das lâminas histológicas, as brânquias de cada um dos 5 indivíduos de cada réplica dos tratamentos foram colocadas em cassetes histológicos com papel de filtro e imersas em uma série de álcool graduado (70%, 80%, 90% e absoluto I e II) e diafanizadas em xilol (dois banhos). A inclusão foi realizada em parafina e os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo semi-automático Leica onde foram preparadas 5 lâminas em diferentes profundidades para cada órgão analisado. As secções de 5µm de espessura foram colocadas em um banho histológico (48°C) e recolhidas em lâminas de vidro e colocadas em estufa à 37°C por cerca de 4 horas e, após este período, foram submetidas à coloração pela técnica Hematoxilina de Harris - Eosina Aquosa (Tolosa *et al.*, 2003) (Figura 5).

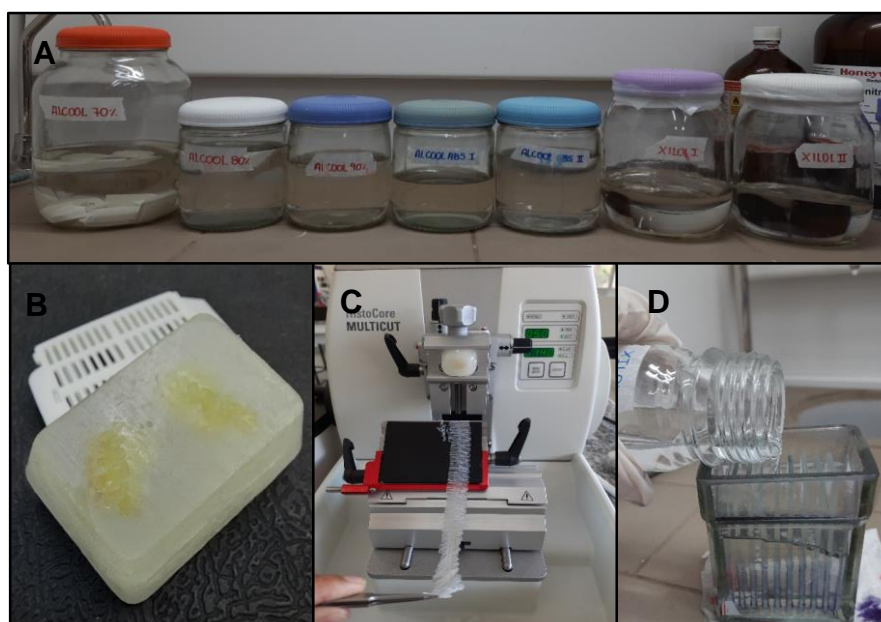


Figura 5. Processamento das brânquias de adultos e juvenis de *Macrobrachium acanthurus* para realização dos cortes histológicos e coloração do tecido. A) Série graduada de álcool e xilol; B) Arco branquial desidratado e emblocado em parafina; C) Corte do arco branquial em micrótomo semi-automático Leica; D) Hidratação dos cortes histológicos para montagem em bálsamo do Canadá.

Após corar, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica em microscópio LEICA DM4B equipado com câmera de 20 megapixels e visualizadas no software LAS v 4.12.

As alterações nas brânquias foram avaliadas de acordo com o índice de órgão (I_{org}) (Bernet *et al.*, 1999) adaptado para invertebrados de acordo com Costa *et al.* (2013) e utilizado para camarões-de-água-doce (Dutra *et al.*, 2017; Brazão *et al.*, 2021). As alterações foram classificadas de acordo com o tipo de padrão de reação (1–4), sendo atribuído a cada alteração um fator de importância (w) de acordo com o grau de reversibilidade, no qual: 1 = alterações facilmente reversíveis; 2 = alterações moderadas, reversíveis com o fim da exposição, e 3 = alteração irreversível com perda parcial ou total da função orgânica (Tabela 2). O valor do escore (a) foi atribuído de acordo com o grau de distribuição e intensidade do dano ao órgão, onde: “0” = Inalterado; “1–2” = ocorrência leve; “3–4” = ocorrência moderada e “5–6” = ocorrência severa. De acordo com as classificações apresentadas, o Índice de Órgão (I_{org}) foi calculado com a seguinte fórmula:

$$I_{org} = \sum_{alt} (a.w)$$

Onde:

I_{org} = Índice de órgão;

alt= alterações;

a= valor de pontuação;

w= fatores de importância.

O índice representa o grau de lesão do órgão. Portanto, um índice com valor alto representa um alto grau de lesão orgânica (Dutra *et al.*, 2017).

Tabela 2. Instrumentos de avaliação histopatológica das brânquias de juvenis e adultos de *Macrobrachium acanthurus*. Fator de importância (w) variando de 1 a 3 para cada alteração em seu respectivo padrão de reação e alteração, segundo Dutra *et al.* (2017).

Padrão de reação	Característica da reação	Descrição	Alteração	Fator (w)
1	Distúrbios hemocíticos	Condição patológica de fluxo da hemolinfa e fluidos dos tecidos	Aglomerção de hemócitos	1
2	Danos regressivos	Condição patológica que apresenta redução funcional ou perda de um órgão e/ou estrutura	Espessamento da lamela	1
			Espessamento do epitélio lamelar	1
			Fusão lamelar	2
			Edema	2
			Necrose	3
			Descamação da cutícula lamelar	3
3	Danos progressivos	Condição patológica causando aumento da atividade celular e/ou do tecido	Hiperplasia	2
4	Inflamação	Fluido intersticial contendo alta concentração de proteínas e restos celulares que vão além dos vasos da hemolinfa	Infiltração de hemócitos	2

3.5 Análises estatísticas

As concentrações letais medianas (CL_{50-96 h}) de amônia foram calculadas usando o programa Graph Prism 5.0 onde a relação entre a concentração de amônia e a mortalidade foi então submetida à análise de regressão linear. O nível de segurança da concentração letal mediana de amônia foi determinado multiplicando o valor obtido no teste de toxicidade por um fator de aplicação de 0,1 (Sprague, 1971).

Os resultados obtidos na análise das brânquias (*I_{org}*) e CTH foram submetidos aos pressupostos de normalidade e homogeneidade (Sokal & Rohlf, 2012) para ser aplicada a análise de regressão e análise de variância (One-Way ANOVA) e teste Tukey ($\alpha=0,05$).



4. RESULTADOS

4.1. Sobrevivência e concentração letal mediana (CL₅₀)

Durante o período experimental foi observado que houve diferença no padrão de mortalidade de juvenis e adultos em relação às diferentes concentrações de amônia total. Tanto para juvenis quanto para adultos foi verificado 100% de mortalidade dos exemplares na maior concentração de amônia total (80 mg L⁻¹) mas para juvenis ocorreu em 36h experimentais e para adultos no final das 96 horas experimentais. Já na menor concentração de amônia total (20 mg L⁻¹) não foi observada a mortalidade de nenhum exemplar para ambos grupos etários. As porcentagens de sobrevivência de juvenis e adultos podem ser observadas na tabela 3 e figura 6. Verificou-se que o padrão de sobrevivência média foi similar entre adultos e juvenis para todos os tratamentos, com exceção da concentração de 60 mg L⁻¹ de amônia total, onde, os machos apresentaram menor sobrevivência que juvenis e fêmeas ovígeras (Tabela 3 e Figura 6).

Tabela 3. Sobrevivência de juvenis e adultos (machos e fêmeas) de *Macrobrachium acanthurus* submetidos a concentrações crescentes de amônia total (mg L⁻¹) após o período de 96h. (dp= desvio padrão), n amostral= 10 indivíduos por réplica.

Tratamento	Estágio ontogenético	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média± dp	% sobrevivência
Controle	Juvenis	10	10	10	10±0	100
	Fêmeas	10	10	10	10±0	100
	Machos	9	9	9	9±0	90
20 mg L ⁻¹	Juvenis	10	10	10	10±0	100
	Fêmeas	10	10	10	10±0	100
	Machos	10	10	10	10±0	100
40 mg L ⁻¹	Juvenis	8	9	9	9±0,6	90
	Fêmeas	9	9	10	9±0,6	90
	Machos	8	9	9	9±0,6	90
60 mg L ⁻¹	Juvenis	1	4	6	4±2,5	40
	Fêmeas	4	4	6	5±1,1	50
	Machos	2	4	0	2±2,0	20
80 mg L ⁻¹	Juvenis	0	0	0	0±0	0
	Fêmeas	0	0	0	0±0	0
	Machos	0	0	0	0±0	0

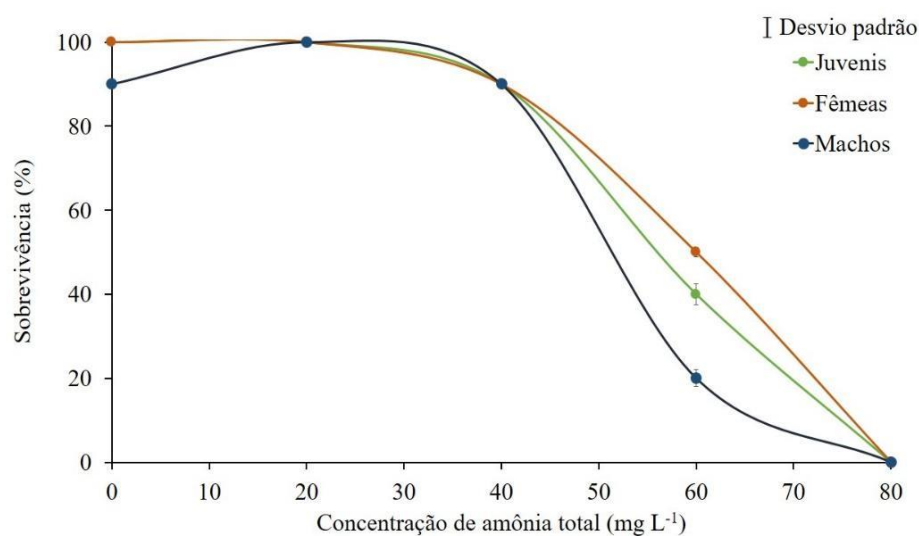


Figura 6. Sobrevivência de juvenis, machos e fêmeas adultos de *Macrobrachium acanthurus* submetidos a concentrações crescentes de amônia total (mg L⁻¹) após o período de 96h.

Através da análise de regressão dos dados foi determinada a CL₅₀-96h mediante a plotagem dos dados de mortalidade vs logaritmo da dose de amônia total para juvenis e adultos de *M. acanthurus* (Figuras 7). Observou-se que as fêmeas apresentaram maior valor de CL₅₀ com 59,2 mg L⁻¹, seguido pelos juvenis com CL₅₀ de 54,5 mg L⁻¹ e dos machos com CL₅₀ 50,4 mg L⁻¹. Os valores determinados para cada estágio ontogenético podem ser conferidos na tabela 4, assim como seus respectivos intervalos de confiança, nível seguro de amônia e r².

Tabela 4. Valores da concentração letal mediana (CL₅₀), intervalo de confiança e nível seguro de amônia total e não ionizada determinado para juvenis e adultos de *Macrobrachium acanthurus* após exposição por 96h.

Estágio de vida	CL ₅₀ -96h (mg L ⁻¹)		Intervalo de confiança (mg L ⁻¹ amônia total)	Nível de segurança (mg L ⁻¹)		r ²	
	Amônia total	Amônia não ionizada		Amônia total	Amônia não ionizada		
Juvenil	-	54,5	3,85	50,2 a 59,1	5,4	0,38	0,94
Adultos	Machos	50,4	2,87	46,7 a 54,5	5,0	0,29	0,96
	Fêmeas	59,2	2,68	57,3 a 61,2	5,9	0,27	0,98

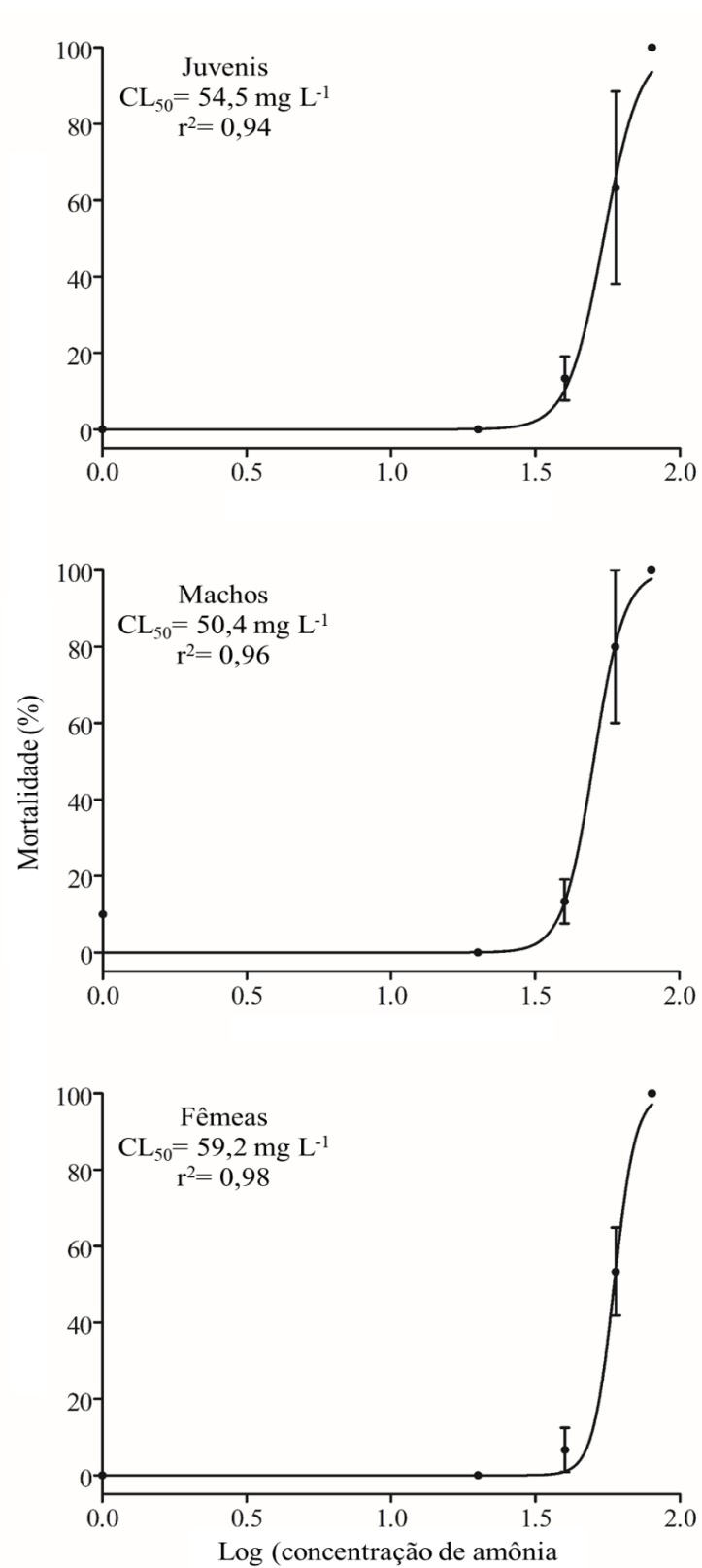


Figura 7. Análise de regressão linear com plotagem dos dados de porcentagem de mortalidade vs log das concentrações de amônia total para determinar a CL_{50} *Macrobrachium acanthurus*.

4.2. Contagem Total de Hemócitos (CTH)

Foi verificado que as altas concentrações de amônia total influenciaram na quantidade de hemócitos presentes na hemolinfa de adultos de *M. acanthurus*. Os valores médios, mínimos e máximos encontrados para machos e fêmeas referentes a CTH por tratamento podem ser conferidos na tabela 5. Para ambos os sexos foi verificado que a CTH dos indivíduos submetidos aos tratamentos que estão abaixo do valor determinado para CL₅₀ (20 e 40 mg L⁻¹ de amônia total) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (p>0,05). Já para as concentrações que estão acima da CL₅₀ (60 e 80 mg L⁻¹) foi observada diferença significativa em relação ao controle (Kruskal-Wallis, p<0,01) (Figura 8).

A distribuição dos dados de CTH de ambos os sexos indicou uma distribuição linear positiva (F=30,4; p<0,05; r²=0,38), ou seja, conforme há o aumento da concentração de amônia a tendência é que ocorra um aumento nos valores de CTH. Os machos apresentaram CTH maior que as fêmeas (p<0,05) consequentemente resultando em um valor de intercepto maior que das fêmeas, porém ambos apresentam o mesmo ângulo de inclinação da reta indicando que a CTH de ambos cresce na mesma proporção.

Tabela 5. Valores médios ± desvio padrão (dp); mínimo e máximo da CTH de machos e fêmeas adultas de *Macrobrachium acanthurus* sob efeito de diferentes concentrações de amônia total.

Tratamento	CTH machos			CTH fêmeas		
	CTH ± dp	Mínimo	Máximo	CTH ± dp	Mínimo	Máximo
Controle	319.500 ± 256.990	123.750	1.035.000	258.750 ± 226.801	22.500	742.500
20 mg L ⁻¹	380.250 ± 361.283	123.750	1.473.750	198.750 ± 127.539	33.750	495.000
40 mg L ⁻¹	339.750 ± 243.939	67.500	1.023.750	195.750 ± 119.195	56.250	438.750
60 mg L ⁻¹	1.416.750 ± 900.226	202.500	2.767.500	719.250 ± 255.213	371.250	1.395.000
80 mg L ⁻¹	1.089.750 ± 816.612	337.500	2.632.500	666.000 ± 334.438	348.750	1.440.000

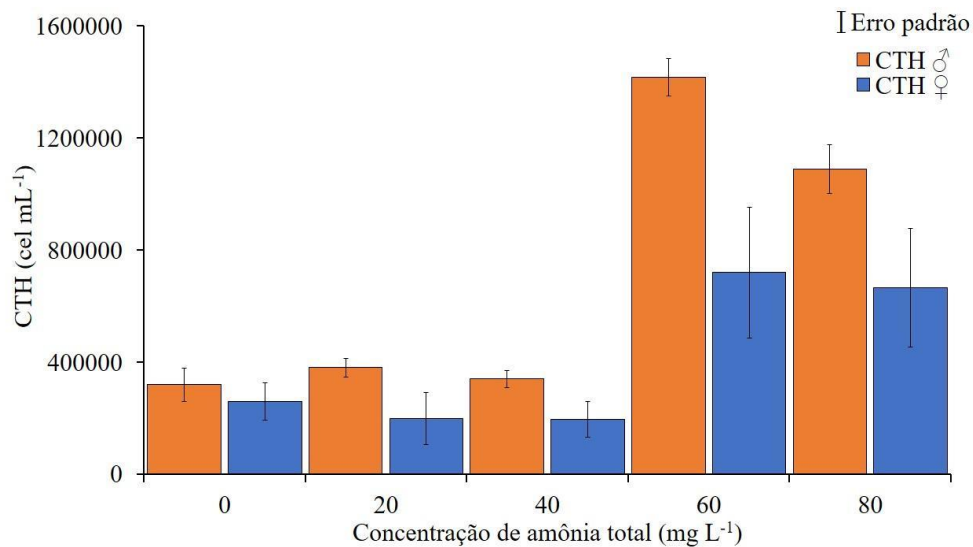


Figura 8. Contagem total de hemócitos (CTH) de machos e fêmeas adultas de *Macrobrachium acanthurus* sob o efeito de diferentes concentrações de amônia total.

4.3. Análise de brânquias: índice do órgão (*Iorg*)

Por meio da análise histológica das brânquias foi possível observar que os danos causados pela amônia às lamelas branquiais foram progressivos conforme o aumento das concentrações deste composto para juvenis e adultos. De modo geral tem-se que para os animais do controle houve poucos danos às brânquias onde os mais frequentes foram os danos de baixo fator de importância como aglomerados de hemócitos nas extremidades das lamelas branquiais, inchaço da lamela e reações de inflamação com a infiltração de hemócitos. Para os tratamentos de 20 e 40 mg L⁻¹ (abaixo da CL₅₀) foram encontrados uma maior frequência de lesões que são possíveis de serem revertidas com o término da exposição à amônia, como a fusão lamelar, presença de edemas e hiperplasia das lamelas branquiais. No entanto, também começam a surgir danos de caráter irreversível (ocorrência leve de pontos de necrose). Por fim nas concentrações de 60 e 80 mg L⁻¹ (acima da CL₅₀) foi observado uma grande frequência de danos moderados e irreversíveis como a ocorrência severa de edemas, infiltração de hemócitos, fusão lamelar, necrose e a descamação da cutícula lamelar. Todas as alterações encontradas nas brânquias dos animais podem ser verificadas na figura 9.

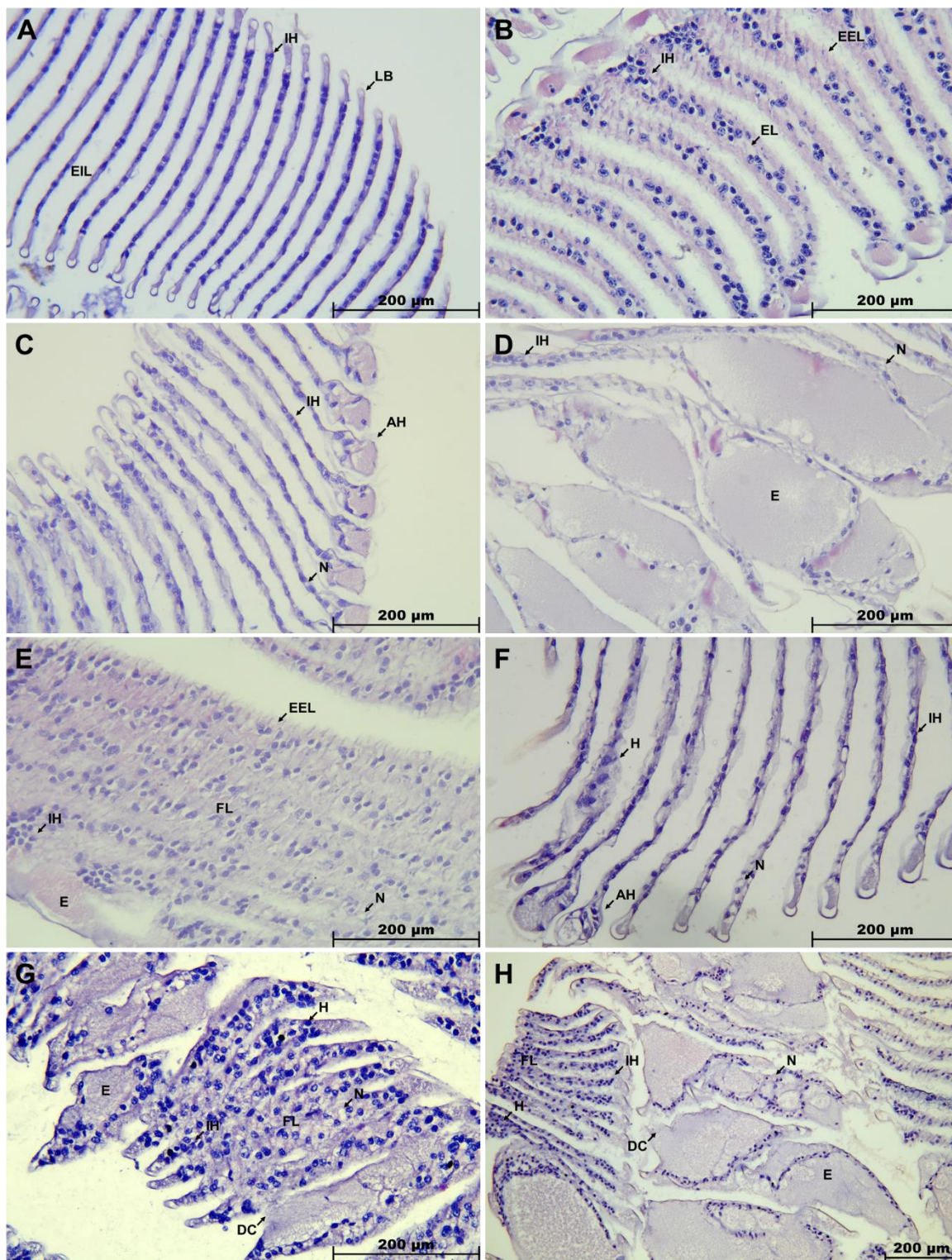


Figura 9. Aspecto microscópico das brânquias de juvenis e adultos de *Macrobrachium acanthurus* expostos à concentrações de amônia durante 96 horas e coradas por Hematoxilina de Harris e Eosina aquosa com aumento de 20x. A e B) Brânquia sem exposição à amônia (controle). C e D) Brânquia exposta a 20 mg L⁻¹ de amônia total. E) Brânquia exposta a 40 mg L⁻¹ de amônia total. F) Brânquia exposta a 60 mg L⁻¹ de amônia total. G) Brânquia exposta a 80

mg L⁻¹ de amônia total. H) Brânquia exposta a 80 mg L⁻¹ de amônia total (10x). Lamela branquial (LB); Espaço inter-lamelar (EIL); Infiltração hemocítica (IH); Aglomerado de hemócitos (AH); Necrose (N); Fusão lamelar (FL); Espessamento lamelar (EL); Descamação da cutícula (DC); Espessamento do epitélio lamelar (EEL); Edema (E); Hiperplasia (H).

Os dados de *Iorg* de juvenis e adultos de *M. acanthurus* foram submetidos a uma análise de regressão onde foi possível determinar que existe uma relação linear positiva entre os valores de *Iorg* e as concentrações de amônia ($p < 0,05$). Conforme há o aumento das concentrações de amônia total foi observado o aumento dos danos nas brânquias dos indivíduos resultando em um aumento da pontuação do *Iorg*. Foi possível constatar que existem diferenças significativas entre os valores de *Iorg* em relação às diferentes concentrações de amônia para juvenis e adultos ($p < 0,05$). A figura 10 demonstra o aumento dos valores do *Iorg* para cada estágio de vida com as diferenças estatísticas entre os tratamentos. Observou-se que a maior concentração de amônia total (80 mg L⁻¹) exerceu os maiores danos ao órgão branquial, enquanto os tratamentos controle para todos os estágios ontogenéticos foram os que apresentaram as menores quantidade de danos.

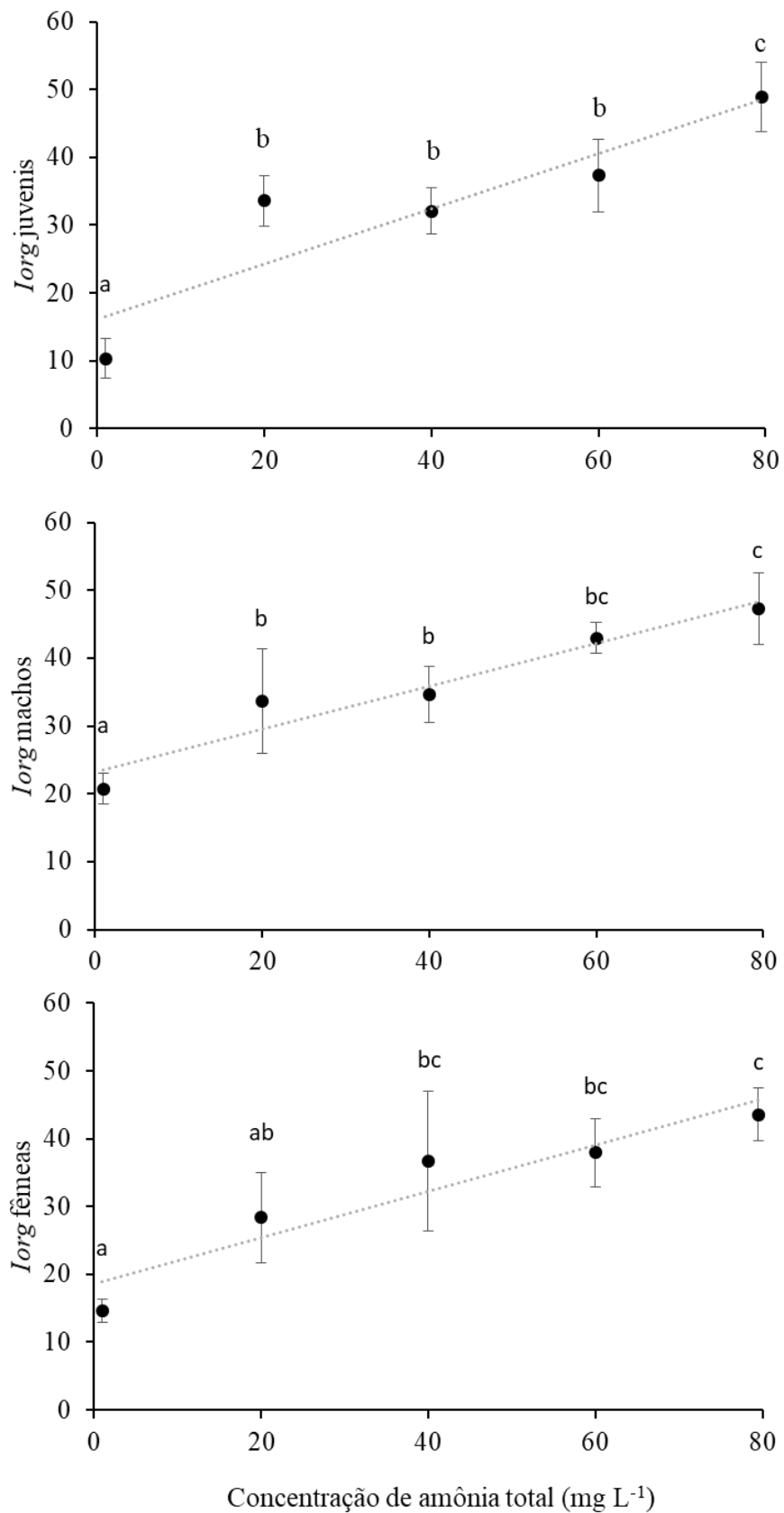


Figura 10. Índice do órgão (*Iorg*) (média±desvio padrão) de juvenis, machos e fêmeas de *Macrobrachium acanthurus* submetidos a concentrações crescentes de amônia total.



5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram como elevadas concentrações de amônia são prejudiciais para *M. acanthurus*, afetando sua resposta imunológica e a morfologia de suas brânquias, e que o aumento da temperatura e ambientes com pH básico podem potencializar a sua toxicidade. Foi possível verificar que juvenis, machos e fêmeas ovígeras apresentaram respostas diferentes após a exposição à amônia total. A determinação da CL_{50} pode variar dependendo de fatores como o estágio de vida, tamanho corpóreo dos indivíduos e até mesmo a capacidade osmorregulatória intrínseca da espécie, além das alterações nos parâmetros físico-químicos da água (Arana, 2010; Romano & Zeng, 2013; Augusto & Masui, 2014).

Dentro de uma produção aquícola os estágios iniciais de vida são altamente críticos para se ter bons índices produtivos. Assim, a alta resistência dos juvenis de *M. acanthurus* à amônia total é um fator muito importante para o início da produção da espécie. O valor obtido para a CL_{50-96h} (56,6 mg L⁻¹ amônia total) foi superior ao determinado para as demais espécies estudadas de palemonídeos de interesse econômico, tal como *M. amazonicum* (Dutra *et al.*, 2016; Brazão *et al.*, 2021), *M. nipponense* (Li *et al.*, 2022) e *M. rosenbergii* (Straus *et al.*, 1991) (Tabela 7). Dentre as espécies marinhas apenas no estudo de Chen *et al.* (1990a) com *Penaeus monodon* foi encontrado valor próximo ao obtido para juvenis de *M. acanthurus*, todavia deve-se levar em consideração que em água salgada a amônia possui uma menor solubilidade o que leva a obtenção de uma concentração menor de amônia não ionizada em relação ao obtido no presente estudo, afetando diretamente na mortalidade dos animais.

Entre os indivíduos adultos observou-se que a CL_{50} das fêmeas ovígeras foi maior que a de machos, indicando que as respostas fisiológicas podem ser distintas entre os sexos. Resultados semelhantes já foram obtidos para a espécie congênere *M. amazonicum* onde o consumo de oxigênio para machos foi maior do que o determinado para fêmeas ovígeras e não ovígeras, enquanto a excreção de amônia foi maior em machos e fêmeas não ovígeras em relação às fêmeas ovígeras (Augusto & Masui, 2014). Este resultado pode ainda estar associado ao tamanho corpóreo dos animais já que os machos foram maiores que as fêmeas, consequentemente apresentando uma maior relação superfície corporal/volume (Romano & Zeng, 2013), além do comportamento mais agressivo e territorialista comum em machos das

espécies deste gênero (Karplus *et al.*, 1992; Balasundaram *et al.*, 2004; Brazão *et al.*, 2021; Santos, 2022), esse comportamento pode fazer com que os animais fiquem mais agitados e consequentemente fazendo com que seu metabolismo fique mais acelerado. Em relação às demais espécies de camarões há uma escassez de dados sobre o efeito da amônia para indivíduos adultos (Tabela 7). Dentre os estudos realizados observa-se que os valores de CL₅₀ obtidos para *M. amazonicum* (Dutra *et al.*, 2016; Freitas, 2021) e para o peneídeo *Penaeus paulensis* (Ostrensky & Wasielesky, 1995) são menores do que o determinado para *M. acanthurus* (Tabela 7).

Há diversos relatos sobre os efeitos observados nos animais expostos a altas concentrações de amônia, com detecção de mudanças em seus processos fisiológicos resultando em um aumento do consumo de oxigênio (Wang *et al.*, 2003; Barbieri, 2010), alterações na excreção de nitrogênio (Barbieri, 2010; Romano & Zeng, 2013), redução do desenvolvimento o que afeta o desempenho zootécnico (Armstrong *et al.*, 1978; Cavalli *et al.*, 2000; Mallasen & Valenti, 2005), aumento nas taxas de mortalidade dos animais que levam a grandes perdas produtivas (Allan *et al.*, 1990; Ostrensky & Wasielesky, 1995), entre outros. No entanto, mesmo em concentrações mais baixas que a determinada pela CL₅₀, a amônia ainda pode apresentar efeitos “sub-letais”, no qual não é observado mortalidade, mas ainda assim afeta suas funções metabólicas, consequentemente interferindo em seu desempenho zootécnico. De acordo com Sprague (1971) as concentrações de amônia devem ficar abaixo de 10% do valor da CL₅₀ para que os animais possam manter seu bem-estar. Sendo assim, para que não sejam observados os efeitos sub-letais para juvenis e adultos de *M. acanthurus* recomenda-se que os valores de amônia total estejam abaixo de 5,0 mg L⁻¹, visando não afetar todos os estágios ontogenéticos, estando dentro da concentração determinada como concentração máxima para despejo de efluentes com amônia segundo a Resolução CONAMA n°430 de 13/05/2011.

Os crustáceos não possuem imunidade adquirida, apenas imunidade inata o que torna importante para sua sobrevivência uma rápida resposta imunológica através da produção/liberação de hemócitos em sua hemolinfa (Johansson *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2011). Para os indivíduos adultos de *M. acanthurus* a exposição à amônia gerou alterações na contagem total de hemócitos (CTH). Para ambos os sexos foi constatado que os animais submetidos às concentrações de amônia abaixo da CL₅₀ (20 e 40 mg L⁻¹), onde não houve 100% de mortalidade até o fim das 96 horas experimentais, a CTH dos animais permaneceu inalterada em relação ao controle, enquanto nas concentrações acima da CL₅₀ (60 e 80 mg L⁻¹), onde os animais morreram durante as 96 horas experimentais, ocorreu o aumento no número de

hemócitos. Este resultado pode estar associado a rápida resposta do sistema imunológico dos animais ao agente estressor (amônia total), tendo como consequência o aumento da quantidade de hemócitos. Presume-se que nos tratamentos de 60 e 80 mg L⁻¹ os animais não foram capazes de realizar o balanço químico da amônia, levando-os à morte durante as 96 horas experimentais, enquanto nos tratamentos controle, 20 e 40 mg L⁻¹, os animais sobreviveram até o fim do período experimental, resultando na estabilização do número de hemócitos devido à sua adaptação ao ambiente. Resultado semelhante foi descrito para os exemplares adultos de *M. amazonicum* em que os animais submetidos a concentrações de até 36 mg L⁻¹ de amônia apresentaram valores de CTH menores em relação às concentrações maiores (72 mg L⁻¹) (Dutra *et al.*, 2022). Para juvenis de *P. pelagicus* também foi descrito que nas primeiras horas de exposição a 50 mg L⁻¹ de amônia total ocorreu um acréscimo da CTH dos animais, mas com o passar do tempo (96h experimentais) ocorreu a queda deste valor. É provável que este mesmo cenário tenha ocorrido para *M. acanthurus*, no qual os animais que sobreviveram até o fim das 96h se adaptaram ao ambiente e ocorreu a consequente queda na CTH.

Por outro lado, estudos com outras espécies de decápodes foi observado comportamento contrário ao obtido no presente estudo, ou seja, houve diminuição na CTH após a submissão à amônia, tal como para *M. amazonicum* a 2,0 mmol L⁻¹ (Pinto *et al.*, 2016), *Penaeus stylirostris* (Le Moullac & Haffner, 2000) e *Panulirus homarus* (Verghese *et al.*, 2007) a 3 mg L⁻¹, *Penaeus japonicus* a 0,5 mg L⁻¹ (Jiang *et al.*, 2004) e *P. vannamei* a 20 mg L⁻¹ (Liu *et al.*, 2020). A submissão dos animais à amônia pode ainda não surtir efeito na CTH, como observado para *P. vannamei* (Liu & Chen, 2004) e *M. rosenbergii* (Cheng & Chen, 2002) após a exposição dos animais a 20 e 3,18 mg L⁻¹ de amônia total, respectivamente, sendo que para *M. acanthurus* em concentrações de até 20 mg L⁻¹ também não houve diferença significativa em relação ao controle indicando um resultado semelhante à estas espécies. Tais dados mostram que as alterações na quantidade de hemócitos é altamente espécie-específico variando de acordo com a espécie foco do estudo, período de exposição e concentração de amônia a qual os animais são submetidos.

Por estar em contato direto com o meio externo, a brânquia é altamente influenciada por agentes estressores. Dentre as funções deste órgão está a excreção da amônia, no entanto, este composto pode se tornar um efetivo agente estressor para *M. acanthurus*, como demonstrado nas respostas inflamatórias deste órgão nos animais expostos desde as concentrações mais baixas até as mais altas. Estudos de exposição de animais aquáticos a metais pesados (Kaoud & Rezk, 2011; Soegianto *et al.*, 2013), radiação (Stalin *et al.*, 2013 a,b) e agrotóxicos (Saravana

Bhavan & Geraldine, 2000; Chang *et al.*, 2006) demonstram que as brânquias são a principal via de absorção destes animais onde as alterações observadas são reflexos de uma adaptação ao estresse causado pela exposição à substância tóxica, levando ao espessamento do epitélio de forma a aumentar a distância entre o interior e o exterior (Mallatt, 1985; Negro *et al.*, 2011). Ao ser submetida de forma contínua a estes compostos, as brânquias dos animais sofrem diversas alterações em sua estrutura que comprometem sua função levando à falência do órgão (Rebelo *et al.*, 2000).

Tanto em juvenis como em adultos de *M. acanthurus* foi detectado que conforme há o aumento das concentrações de amônia total também ocorre o aumento dos danos nas brânquias dos animais. No tratamento controle (0 mg L⁻¹ amônia total) o mais comum foi observar lesões de infiltração de hemócitos, caracterizada como uma resposta inflamatória, que segundo estudos (Werner, 2010; Vegad, 2015) é um tipo de lesão muito comum aos animais por se tratar de uma reação básica de defesa. Nas concentrações mais baixas também observou-se maior frequência de danos reversíveis e moderados (aglomerado de hemócitos; espessamento lamelar; fusão lamelar; edemas; hiperplasia e infiltração de hemócitos), mas nas concentrações mais altas foram encontrados os danos mais graves e irreversíveis, tal como presença de necrose e descamação da cutícula lamelar em grande frequência. Estas lesões refletem o efeito direto que altas concentrações de amônia possuem sobre as brânquias dos organismos aquáticos (Lease *et al.*, 2003; Karasu & Köksal, 2005). Essa mesma tendência foi observada para os exemplares de *M. amazonicum* (Dutra *et al.*, 2017), *C. granulata* (Rebelo *et al.*, 2000) e *P. pelagicus* (Romano & Zeng, 2007) após a exposição à amônia, onde conforme aumentou a concentração de amônia mais danos foram observados nas brânquias dos animais. Para *P. pelagicus* (Romano & Zeng, 2010) foi demonstrado que após a exposição a 10 e 40 mg L⁻¹ de amônia total por um período de 48h foi possível realizar a recuperação total das brânquias se os exemplares fossem transferidos para uma água sem a presença do composto em até 96 horas. Romano & Zeng (2010) sugeriram que tal fato seja possível devido ao aumento da quantidade de hemócitos nas brânquias. Acredita-se que essa recuperação das lamelas branquiais também pode ser possível para os exemplares de *M. acanthurus* que foram submetidos às concentrações abaixo da CL₅₀, visto que nestas concentrações há a predominância de danos de baixo fator de importância e reversíveis de acordo com a classificação dos danos proposta por Costa *et al.* (2013).

A partir dos resultados obtidos através das análises de brânquias e hemolinfa foi possível identificar as possíveis causas da mortalidade obtida pela exposição à amônia e como a dose

progressiva deste composto influencia nos aspectos da saúde e desenvolvimento do camarão *M. acanthurus*.

Tabela 7. Concentração letal mediana (CL₅₀) de amônia total e não ionizada determinada para demais espécies de crustáceos decápodes nos estágios juvenil e adultos.

Espécie	Ciclo de vida	Sexo	CL ₅₀ -96h amônia total (mg L ⁻¹)	CL ₅₀ -96h NH ₃ (mg L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Salinidade (‰)	Autores
<i>Macrobrachium acanthurus</i>			56,6	3,5	8,2	25,9	-	Presente estudo
<i>Macrobrachium amazonicum</i>			21,7	0,8	7,8	25,1	-	Dutra <i>et al.</i> (2016)
<i>Macrobrachium amazonicum</i>			29,9	-	7,9 a 8,2	23,4 a 24,4	-	Brazão <i>et al.</i> (2021)
<i>Macrobrachium nipponense</i>			27,8	-	7,9	22,4	-	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>			-	2,0 (72h)	9,0	29,0	3	Straus <i>et al.</i> (1991)
<i>Penaeus chinensis</i>	Juvenis		37,7	1,5	7,9	26,0	33	Chen <i>et al.</i> (1990 b)
<i>Penaeus monodon</i>			53,4	1,0	7,6	24,5	20	Chen <i>et al.</i> (1990 a)
<i>Penaeus paulensis</i>			38,7	1,1	7,8	25,0	28	Ostrensky e Wasielesky (1995)
<i>Penaeus penicillatus</i>			24,9	1,0	8,1	21,0	25	Jiann & Chi (1991)
			29,8	1,1			34	
<i>Penaeus vannamei</i>			24,4	1,2			15	Lin & Chen (2001)
			35,4	1,6	8,0	23,0	25	
			39,5	1,6			35	
<i>Macrobrachium acanthurus</i>		Macho	50,4	2,3	7,9	25,7	-	Presente estudo
<i>Macrobrachium acanthurus</i>		Fêmea	59,5	2,8	7,9	25,6	-	
<i>Macrobrachium amazonicum</i>			36,6	1,1	7,7	25,9	-	Dutra <i>et al.</i> (2016)
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	Adultos		49,3	1,4	7,6 a 8,0	24,2 a 28,4	-	Freitas (2021)
<i>Penaeus paulensis</i>			42,5	1,1	7,7	25,0	28	Ostrensky & Wasielesky (1995)



6. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo constatamos que os exemplares juvenis, machos e fêmeas ovíferas de *M. acanthurus*, apresentam uma alta tolerância à amônia quando comparados às demais espécies de camarões dulcícolas e marinhos. O conhecimento dessa característica é favorável para desenvolver seu cultivo em sistemas aquícolas onde concentrações abaixo de 5,0 mg L⁻¹ de amônia total não irão afetar a sobrevivência dos animais. A obtenção destes resultados é de grande importância para gerar informações sobre a espécie e para fomentar a produção de *M. acanthurus* tendo como foco impulsionar a produção brasileira de espécies nativas de água doce. No entanto, estudos adicionais podem ser efetuados para preencher o pacote tecnológico da espécie buscando avaliar a possibilidade de recuperação dos animais após submissão a amônia total e quais são os efeitos deste composto em exposições crônicas, além de avaliar se fêmeas não ovíferas apresentam respostas diferentes das ovíferas.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertoni, E., Palma-Silva, C., Esteves, F. 2002. Distribution and growth in adults of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19: 61-70.

Allan, G.L., Maguire, G.B. & Hopkins, S.J. 1990. Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved oxygen levels. *Aquaculture*, 91: 265–280.

Anger, K. 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology*, 33(2): 151-183.

Arana, L.V. 2010. Qualidade da água em aquicultura princípios e práticas. Florianópolis: UFSC.

Armstrong, D.A., Chippendale, D., Knight, A.W. & Colt, J.E. 1978. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin*, 154: 15–31.

Augusto, A. & Masui, D. C. 2014. Sex and reproductive stage differences in the growth, metabolism, feed, fecal production, excretion and energy budget of the Amazon River prawn (*Macrobrachium amazonicum*). *Marine and freshwater behaviour and physiology*, 47(6): 373-388.

Balasundaram, C., Jeyachitra, P. & Balamurugan, P. 2004. Shelter preference in *Macrobrachium* spp. with reference to aquaculture. *Acta Ethologica*, 7: 95–101.

Barbieri, E. 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture*, 306: 329–333.

Barbieri, R.C. & Ostrensky, A.N. 2002. Reprodução, maturação e larvicultura. Camarões marinhos. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 258p.

Bendschneider, K. & Robinson, R. J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Journal Marine research*, 11: 87-96.

Bernardi, N. 1990. Temperature influence upon food ingestion and spontaneous locomotion of the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Thermal Biology*, 15: 33–36.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25–34.

Bertini, G. & Baeza, J.A. 2014. Fecundity and fertility in a freshwater population of the neotropical amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* from the southeastern Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 58(3): 207-217.

Bertini, G. & Valenti, W.C. 2010. Importância econômica dos camarões-de-água-doce. Pp. 155-170. In: SILVA, R.B. & MING, L.C. (Eds.). *Polo de Biotecnologia da Mata Atlântica: Relatos de Pesquisas e Outras Experiências Vividas no Vale do Ribeira*. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia. Jaboticabal SP, Brazil, 313p.

Bertini, G., Baeza, J.A. & Perez, E. 2014. A test of large-scale reproductive migration in females of the amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) from south-eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, 65: 81-93.

Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E., East, I. & Subasinghe, R.P., 2001. Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases. In: FAO Fish. Tech. Pap. No. 402. FAO, Rome. Supplement 2. (236 pp.).

Brazão, C.C., Kracizy, R.O., Dutra, F.M., Oliveira, A.P., Silva, R.I. & Ballester, E.L.C. 2021. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles, *Aquaculture*, 533: 736204.

Camargo, J.A. & Alonso, A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.

Cavalli, R.R., Berghe, E.V., Lavens, P., Thuy, N.T.T., Wille, M. & Sorgellos, P. 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125: 333–343.

Chand, R.K. & Sahoo, R.K. 2006. Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 258: 150–156.

Chang, C.C., Lee, P.P., Hsu, J.P., Yeh, S.P. & Cheng, W. 2006. Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. *Aquaculture* 253: 653–666.

- Chang, Z.W., Chiang, P.C., Cheng, W. & Chang, C.C. 2015. Impact of ammonia exposure on coagulation in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118: 98–102.
- Chen, J., Lui, P., Lei, S. 1990a. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture*, 89: 127–137.
- Chen, J., Ting, Y., Lin, J., Lin, M. 1990b. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Marine Biology*, 107: 427–431.
- Chen, J.C. & Kou, Y.Z. 1993. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 109(2): 177-185.
- Chen, S., Xie, S., Chen, M., Mi, Z., He, Q., Yang, F. & Tian, L. 2019a. Hypoxia-induced changes in survival, immune response and antioxidant status of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with graded levels of dietary myo-inositol. *Aquaculture Nutrition*, 25(2): 518-528.
- Chen, S., Yu, Y., Gao, Y., Yin, P., Tian, L., Niu, J. & Liu, Y. 2019b. Exposure to acute ammonia stress influences survival, immune response and antioxidant status of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pretreated with diverse levels of inositol. *Fish & Shellfish Immunology*, 89: 248-256.
- Cheng, W. & Chen, J.C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(4): 387-391.
- Cheng, W. & Chen, J.C. 2002. Effects of environmental factors on the immune responses of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and other decapod crustaceans. *Journal Fisheries Society of Taiwan*, 29(1): 1-20.
- Cheng, W., Liu, C.H., Hsu, J.P. & Chen, J.C. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish Shellfish Immunology*, 13: 351–365.
- Choudhury, P.C. 1970. Complete larval development of the palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) reared in the laboratory. *Crustaceana*, 18(2): 113-132.
- Choudhury, P.C. 1971. Laboratory rearing of larval of the palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836). *Crustaceana*, 21(2): 113-126.
- Coelho, P.A., Ramos-Porto, M. & Soares, C.M.A. 1982. Biologia e cultivo de camarões de água doce. Centro de Tecnologia, Departamento de Oceanografia. Recife, Universidade

Federal de Pernambuco, *Série Aquicultura*, 1: 53p.

Costa, P.M., Carreira, S., Costa M.H. & Caeiro, S. 2013. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquatic Toxicology*, 126: 442–454.

Costa, T.V., Yoshii-Oshiro, L.M., López-Greco, L.S., Melo, E.P., Mattos, L.A. & Bambozzi-Fernandes, A. 2016. Determinación del voltaje y el tamaño del animal óptimos para la extracción de espermatozoides en el camarón de agua dulce *Macrobrachium acanthurus* (Palaemonidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2): 422-428.

Costa, T.V., Yoshii-Oshiro, L.M., Mattos, L.A., López-Greco, L.S., Melo, E.P. & Flor, H.R. 2017. Toxicity, freezing and cold storage test of native species semen. *Boletim do Instituto de pesca*, 43(3), 334-346.

Cui, Y., Ren, X., Li, J., Zhai, Q., Feng, Y., Xu, Y. *et al.* 2017. Effects of ammonia-N stress on metabolic and immune function via the neuroendocrine system in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 64: 270–275.

Cunha, C.H. & Oshiro, L.M.Y. 2010. The influence of eyestalk ablation on the reproduction of the freshwater *Macrobrachium acanthurus* shrimp in captivity. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(3): 217-221.

Da Silva, L.M.A. 2015. Estrutura populacional e crescimento relativo do camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em duas regiões do estado do Amapá, foz do Rio Amazonas, Brasil. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 5(2): 52-57.

De Barros, L.C., Alves, P.M.F., Da Silva, N.J.R. & Henriques, M.B. 2014. Cadeia produtiva do camarão branco utilizado como isca viva na pesca amadora da baixada santista, estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, 44(6): 23-35.

Díaz, F., Sierra, E., Re, A.D. & Rodríguez, L. 2002. Behavioural thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman). *Journal of Thermal Biology*, 27(5): 423-428.

Dobkin, S., Van Montfrans, J. & Holland, D.H. 1975. Selective breeding of the fresh and brackish-water *Macrobrachium acanthurus*. *Proceedings of the World Mariculture Society*. 6: 33–36.

Dong, J., Zhao, Y. Y., Yu, Y. H., Sun, N., Li, Y. D., Wei, H. & Li, L. 2018. Effect of stocking density on growth performance, digestive enzyme activities, and nonspecific immune parameters of *Palaemonetes sinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 73: 37-41.

Duan, Y., Wang, Y., Zhang, J. & Xiong, D. 2018. Elevated temperature disrupts the mucosal structure and induces an immune response in the intestine of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Dendrobranchiata: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology*, 38(5): 635-640.

Dutra, F.M., Forneck, S.C., Brazão, C.C., Freire, C.A. & Ballester, E.L. C. 2016. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862. *Aquaculture*, 453: 104-109.

Dutra, F.M., Juvenal, J.R., Forneck, S.C., Brazão, C.C. & Ballester, E.L.C. 2022. Gill and haematological alterations in *Macrobrachium amazonicum* adults in acute exposure to ammonia and nitrite isolated and combined. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 2(5): 414-424.

Dutra, F.M., Rönnau, M., Sponchiado, D., Forneck, S.C., Freire, C.A. & Ballester, E.L.C. 2017. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology*, 187: 115-123.

Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K. & Widdicombe, S. 2011. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. *Fish & shellfish immunology*, 30(6): 1209-1222.

Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E. & Thurston, R.V. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effects of pH and temperature. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 32: 2379–2383.

Esparza-Leal, H. M., Ponce-Palafox, J. T., Cervantes-Cervantes, C. M., Valenzuela-Quiñónez, W., Luna-González, A., López-Álvarez, E. S., ... & Gómez-Peraza, R. L. 2019. Effects of low salinity exposure on immunological, physiological and growth performance in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 50(3): 944-950.

Fajardo, C., Martínez-Rodríguez, G., Costas, B., Mancera, J. M., Fernández-Boo, S., Rodolfo, H. & De Donato, M. 2022. Shrimp immune response: A transcriptomic perspective. *Reviews in Aquaculture*, 14(3): 1136-1149.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO. 2023. The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural–urban continuum. Rome, FAO. Disponível em:<<https://doi.org/10.4060/cc3017en>>.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the Sustainable Development Goals. Rome. Disponível em:<www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>.

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. Disponível em:<<https://doi.org/10.4060/cc0461en>>.

Freitas, R.S. 2021. Toxicidade aguda e crônica por amônia do camarão de água-doce *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. Dissertação (Mestrado Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba/MG.

Fukuda, B., Bertini, G. & Almeida, L.C.F. 2017. Effect of salinity on the embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 61(1): 1-8.

Gasca-Leyva, J.F.E., Martinez-Palacios, C.A. & Ross, L.G. 1991. The respiratory requirements of *Macrobrachium acanthurus* (Weigmann) at different temperatures and salinities. *Aquaculture*, 93: 191–97.

Gazola-Silva, F. F., Melo, S. G. & Vitule, J. S. 2007. *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae): possível introdução em um rio da planície litorânea paranaense (PR, Brasil). *Acta Biológica Paranaense*, 36(1-4): 83-90.

Geraldo, G. & Pinto, M.D.S. 2019. Percursos da ciência da informação e os objetivos do desenvolvimento sustentável da agenda 2030/ONU. *Revista ACB: Biblioteconomia em Santa Catarina*, Florianópolis, 24(2): 373-389.

Gonzales-Pena, M.D.C., Bicudo, J.E. & Moreira, G.S. 1998. Consumo de oxigênio do camarão *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do litoral do Estado de São Paulo, Brasil. In: Resumos do Aquicultura Brasil '98, 2–6 novembro 1998, Recife, (Ed. by F.R. de Moraes, P.F. de Castro & E. de Souza Correia), p. 139. World Aquaculture Society (Latin American Chapter), Baton Rouge.

Granados-Berber A.A. 1984. Aspectos reproductivos del ‘camaron prieto’ *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) en la cuenca del Rio Gonzales, Tabasco, Mexico (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico*, 11: 1–22.

Hong, M., Chen, L., Sun, X., Gu, S., Zhang, L. & Chen, Y. 2007. Metabolic and immune responses in chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145: 363–369.

Hu, Y.B., Wang, Y. & Jiang, N.C. 2005. Effects of ammonia-N and nitrite-N on the hemocyte count and ultrastructure of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal-Zhejiang University-Sciences Edition*, 32(6): 691-699.

Huang, M., Xie, J., Yu, Q., Xu, C., Zhou, L., Qin, J. G., ... & Li, E. 2020. Toxic effect of chronic nitrite exposure on growth and health in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529: 735664.

IBGE PPM. 2022. Produção Pecuária Brasileira no ano de 2022. IBGE. Disponível em:<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/16459>>. Acessado em: 06 março 2024.

Ismael D. & New M.B. 2000. Biology. *In*: New, M.B. & Valenti, W.C. (Eds.). **Freshwater Prawn Culture: The Farming of *Macrobrachium rosenbergii***. Blackwell Publishing Ltd, cap. 3: 18-40.

Ismael, D. & Moreira, G.S. 1997. Effect of temperature and salinity on respiratory rate and development of early larval stages of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A(3): 871-876.

Jiang, G., Yu, R. & Zhou, M. 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 241: 61–75.

Jiann-Chu, C., & Chi-Yuan, L. 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(3): 477-482.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. & Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3): 45-52.

Kaoud, H.A. & Rezk, A. 2011. Effect of exposure to cadmium on the tropical freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *African Journal of Aquatic Science*, 36: 253–260.

Karasu, B.A.C. & Köksal, G. 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29: 339–344.

Karplus, I., Hulata, G. & Zafrir, S. 1992. Social control of growth in *Macrobrachium rosenbergii*. IV. The mechanism of growth suppression in runts. *Aquaculture*, 106(3-4): 275–283.

Kir, M. & Kumlu, M. 2006. Acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* postlarvae in relation to salinity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37: 231–235.

Kubitza, F. 2003. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. ESALQ/USP,

Jundiaí, Brasil, 229pp. Hargreaves JA (1998). *Aquaculture*, 166: 181-212.

Kumar, P., Thirunavukkarasu, A.R., Subburaj, R. & Thiagarajan G. 2015. Concept of Stress and Its Mitigation in Aquaculture. In: Perumal, S., Thirunavukkarasu, A.R., Pachiappan, P. (Eds.), *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*. Springer, India, pp. 95-10.

Kutty, M.N., Herman, F. & Le Menn, H. 2000. Culture of Other Prawn Species. In: NEW, M.B. & VALENTI, W.C (Eds.). **Freshwater Prawn Culture: The Farming of *Macrobrachium rosenbergii***. Blackwell Publishing Ltd, cap. 21, p. 393-410.

Le Moullac, G. & Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191(1-3): 121-131.

Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C. & Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 621–629.

Lease, H.M., Hansen, J.A., Bergman, H.L. & Meyer, J.S. 2003. Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134: 491–500.

Li, Y., Xu, W., Zhu, B., Jiang, Q., Ye, Y. & Zhao, Y. 2022. Comparison of detoxification capacity between broodstock and hybrid offspring in the gills of juvenile shrimp (*Macrobrachium nipponense*): Response to chronic ammonia stress. *Aquaculture Research*, 53(12): 4487-4496.

Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M. *et al.* 2016. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 54: 523–528.

Lightner, D.V. & Bell, T.A. 1998. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Baton Rouge, La: World Aquaculture Society, p. 1-114.

Lin, Y.C. & Chen, J.C. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259: 109–119.

Liu, C.H. & Chen, J.C. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16: 321–334.

- Liu, F., Li, S., Yu, Y., Sun, M., Xiang, J. & Li, F. 2020. Effects of ammonia stress on the hemocytes of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 239: 124759.
- Long, J., Cui, Y., Wang, R., Chen, Y., Zhao, N., Wang, C., ... & Li, Y. 2021. Combined effects of high salinity and ammonia-N exposure on the energy metabolism, immune response, oxidative resistance and ammonia metabolism of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 20: 100648.
- Lu, X., Kong, J., Luan, S., Dai, P., Meng, X., Cao, B. & Luo, K. 2016. Transcriptome analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under acute ammonia stress. *PloS one*, 11(10), e0164396.
- Maldonado, M., Rodríguez, J. & Blas, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista Aquatic*, 21: 78-91.
- Mallasen, M. & Valenti, W.C. 2005. Larval development of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* at different ammonia concentrations and pH values. *Journal of World Aquaculture Society*, 36: 32–41.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and their irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42: 630–648.
- Melo, G.A.S. 2003. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*, São Paulo, Edições Loyola, 289-415.
- Müller, Y.M.R., Pacheco, C., Simões-Costa, M.S., Ammar, D. & Nazari, E.M. 2007. Morphology and chronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). *Invertebrate Reproduction & Development*, 50: 67-74.
- Negro, L.E., Montagna, M. & Collins, P. 2011. Freshwater decapods and pesticides: an unavoidable relation in the modern world. In: Stoytchera, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World: Risks and Benefits*. InTech, Croatia (pp. 560).
- New, M.B. & Nair, C.M. 2012. Global scale of freshwater prawn farming. *Aquaculture Research*, 43: 960–969.
- New, M.B., D'Abramo, L.R., Valenti, W.C. & Singholka, S. 2000. Sustainability of freshwater prawn culture. *Freshwater Prawn Culture. The Farming of Macrobrachium rosenbergii*. Blackwell Science Ltd., Oxford, London, pp.429-433.

Noor-Hamid, S., Fortes, R.D. & Parado-Esteva, F. 1994. Effect of pH and ammonia on survival and growth of the early larval stages of *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 125: 67–72.

Ostrensky, A. & Wasielesky, JR.W. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132: 339–347.

Peltier, W.H. & Weber, C.L. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Report EPA-600/4–85/013. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 1–60.

Pileggi, L.G., Rossi, N., Wehrmann, I.S. & Mantelatto, F.L. 2014. Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). *ZooKeys*, 457: 109-131.

Pinto, M.R., Lucena, M., Faleiros, R.O., Almeida, E.A., McNamara, J.C. & Leone, F. A. 2016. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Toxicology*, 170: 13-23.

Qiu, L., Shi, X., Yu, S., Han, Q., Diao, X. & Zhou, H. 2018. Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress. *Frontiers in Physiology*, 9: 211.

Quadros, M.L.A., Maciel, C., Bastos, S. & Sampaio, I. 2004. Reprodução do Camarão Canela - *Macrobrachium acanthurus* em condições controladas de laboratório e montagem de um atlas para identificação de estágios larvais. *Revista Científica da Ufpa*, 4: 1-11.

Rebello, M.F., Rodriguez, E.M., Santos, E.A. & Ansaldo, M. 2000. Histopathological changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea: Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 125: 157–164.

Ribeiro, C.C., Lopes, V.H.P. & Bertini, G. 2020. Abundance and spatio-temporal distribution of the amphidromous shrimp *Macrobrachium olfersii* (Caridea: Palaemonidae) along the Ribeira de Iguape River (São Paulo, Brazil). *Nauplius*, 28: e2020017.

Rocha, C., Quadros, M., Maciel, M., Maciel, C. & Abrunhosa, F. 2017. Morphological changes in the structure and function of the feeding appendages and foregut of the larvae

and first juvenile of the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(4): 713-720.

Rocha, I. 2022. Carcinicultura: força do interior nordestino. *Seafood Brasil*, ISSN 2319-0450, 45: 52p.

Rodrigues, M.M., Almeida, L.C.F. & Bertini, G. 2018. Survival rate of *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) larvae in laboratory conditions under different salinities and diets. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 13(2): 121-130.

Rodrigues, M.M., Greco, L.S., De Almeida, L.C.F. & Bertini, G. 2021. Reproductive performance of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Palaemonidae) females subjected to unilateral eyestalk ablation'. *Acta Zoologica*, 00: 1-9.

Rodrigues, R.A., Vetorelli, M.P. & Araújo, P.F.R. 2017. Regime alimentar na larvicultura de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em sistema aberto. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 10(1): 17-30.

Rodríguez-Ramos, T., Espinosa, G., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Marrero, J., Borrelle, Y., Alonso, M.E. & Alonso, M. 2008. Effects of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture Research*, 274(1): 118–125.

Romano, N. & C. Zeng. 2010. Changes to the histological gill structure and haemolymph composition of early blue swimmer crab *Portunus pelagicus* juveniles during elevated ammonia-N exposure and post-exposure recovery. *Aquaculture Research*, 41: 468–480.

Romano, N. & Zeng, C. 2007. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 266: 246–254.

Romano, N. & Zeng, C. 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite and nitrate to Decapod Crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21: 1–21.

Salas, A.C., Mundo, R.R. S., Galván, T. G., López, J. H., Uriarte, A.B.P., Almazán, A.M. & Plascencia, G.Y. 2007. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(2): 459-472.

Sampaio, C.M.S., Silva, R.R., Santos, J.A. & Sales, S. P. 2007. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Brazilian Journal of Biology*, 67: 551-559.

Santos, L.V.R. 2022. Repertório comportamental e interações sociais de machos de *Macrobrachium acanthurus* (wiegmann, 1836) (Crustacea, Palaemonidae) em condições controladas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alagoas. Maceió/AL.

Saravana Bhavan, P. & Geraldine, P. 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*, 50: 331–339.

Shen, M., Cui, Y., Wang, R., Dong, T., Ye, H., Wang, S. & Li, Y. 2020. Acute response of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to high-salinity reductions in osmosis, metabolism, and immune-related enzyme activities. *Aquaculture International*, 28: 31-39.

Shukla, S., Tiwari, K.J., Lodhi, H.S., Shukla, S., Mishra, A. & Sharma, U.D. 2019. Histopathological alterations in gills of freshwater prawn, *Macrobrachium dayanum* (Crustacea: Decapoda) after acute and sub-acute exposure of lead nitrate. *Journal of Applied and Natural Science*, 11(2): 568-574.

Silva, A.G. & Martinez, C.B.R. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 23: 185-192.

Silva, B.B.D. 2011. Ecologia, pesca e dinâmica populacional do camarão-da-Amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) capturado na região das ilhas de Belém-Pará-Brasil. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) - Universidade Federal do Pará, Belém.

Soegianto, A., Winarni, D., Handayani, U. S., & Hartati. 2013. Bioaccumulation, elimination, and toxic effect of cadmium on structure of gills and hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium sintangese* (De Man, 1898). *Water, Air, & Soil Pollution*, 224, 1-10.

Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 2012. Biometry: Principle and practices of statistics in biological research, fourth ed. W.H. Freeman & Company, New York.

Sprague, J.B. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish-III: Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water Resource*, 5: 245-266.

Spriggs, K.A., Bushell, M. & Willis, A.E. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular Cell*, 40: 228–237.

- Stalin, A., Broos, K. V., Bukhari, A. S., Mohamed, H. S., Singhal, R. K., & Venu-Babu, P. 2013a. Effects of ^{60}Co gamma irradiation on behavior and gill histoarchitecture of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN). *Ecotoxicology and environmental safety*, 92: 155-160.
- Stalin, A., Broos, K. V., Bukhari, A. S., Mohamed, H. S., Singhal, R. K., & Venu-Babu, P. 2013b. Morphological and histological studies on freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) irradiated with ^{60}Co gamma radiation. *Aquatic toxicology*, 144, 36-49.
- Straus, D.L., Robinette, H.R., Heinen, J.M.T. 1991. Toxicity of un-ionized ammonia and high pH to post-larval and juvenile freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22: 128–133.
- Tamburus, A.F., Mossolin, E.C. & Mantelatto, F.L. 2012. Populational and Reproductive Aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Palaemonidae) From North Coast of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 16(1): 9-18.
- Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A. & Freitas Neto, A.G., 2003. Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. Manole, São Paulo, 341p.
- Tomasso, J. R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2: 291–314.
- Truscott, R. & White, K.N. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*, 4: 455-461.
- UNESCO. 1993. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.
- Valenti, W.C. 1985. Cultivo de Camarões de Água Doce. São Paulo, Nobel. p. 82.
- Valenti, W.C., Kimpara, J.M., Preto, B.D.L. & Moraes-Valenti, P. 2018. Indicators of sustainability to assess aquaculture systems. *Ecological indicators*, 88: 402-413.
- Valenti, W.C., Mello, J.T.C. & Lobão, V.L. 1987. Crescimento de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 47: 349-355.
- Valenti, W.C., Mello, J.T.C. & Lobão, V.L. 1989. Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6: 9-15.

- Vegad, J.L. 2015. A Textbook of Veterinary General Pathology. Cbs Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 589.
- Vergheese, B., Radhakrishnan, E.V. & Padhi, A. 2007. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 928–936
- Verma, K. 2019. Sustainable Development and Environmental Ethics. *International Journal on Environmental Sciences*, 10: 1-5.
- Vieira, F.D.N., Jatobá, A., Mouriño, J.L.P., Buglione Neto, C.C., Silva, J.S.D., Seiffert, W.Q. & Vinatea, L.A. 2016. Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45: 203-207.
- Vieira, M.S., Moura, M.A.M. & Gil, F.G. 2006. Qualidade de água de lagos e nascentes do parque Dr. Fernando Costa (Água Branca), São Paulo, SP. *Arquivo do Instituto de Biologia*, 73: 475-483.
- Wang, A. L., Wang, W. N., Wang, Y., Shang, L. X., Liu, Y. & Sun, R. Y. 2003. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na⁺/K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 220(1-4): 833-841.
- Wang, Z., Zhou, J., Li, J., Zou, J. & Fan, L. 2020. The immune defense response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to temperature fluctuation. *Fish & shellfish immunology*, 103: 103-110.
- Wei, S., Zhang, J., Chen, W., Shen, A., Zhou, D., Zheng, J. & Kong, Y. 2023. Adverse effects of chronic ammonia stress on juvenile oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) and alteration of glucose and ammonia metabolism. *Environmental Toxicology*, 38(3): 545-554.
- Weihrauch, D., Morris, S. & Towle, D.W. 2004. A review - ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *Journal of Experimental Biology*, 207: 4491–4504.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D. & Towle, D.A. 2002. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of Na⁺/K⁺-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2765–2775.
- Werner, P.R., 2010. Patologia Geral Veterinária Aplicada. Roca, São Paulo, 233–243.

Xu, Z., Guan, W., Xie, D., Lu, W., Ren, X., Yuan, J., & Mao, L. (2019). Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. *Developmental & Comparative Immunology*, 100, 103413.

Yu, J., Sun, J., Zhao, S., Wang, H. & Zeng, Q. 2019. Transcriptome analysis of oriental river Prawn (*Macrobrachium nipponense*) Hepatopancreas in response to ammonia exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 93: 223-231.

Yue, F., Pan, L., Xie, P. & Jian, L.I. 2010. Effects of ammonia exposure on prophenoloxidase system and immune parameters of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 17: 761–770.

Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. 2008. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. *Rima*.

Zhang, L., Pan, L., Xu, L. & Si, L. 2018. Effects of ammonia-N exposure on the concentrations of neurotransmitters, hemocyte intracellular signaling pathways and immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 75: 48-57.

Zhang, W., Jiang, Q., Liu, X., Pan, D., Yang, Y. & Yang, J. 2015. The effects of acute ammonia exposure on the immune response of juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Crustacean Biology*, 35(1): 76-80.

Zhang, W., Li, J., Chen, Y., Si, Q., Tian, J., Jiang, Q. & Yang, J. 2019. Exposure time relevance of response to nitrite exposure: Insight from transcriptional responses of immune and antioxidant defense in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquatic Toxicology*, 214: 105262.

Zhao, M., Yao, D., Li, S., Zhang, Y. & Aweya, J. J. 2020. Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(4): 2194-2211.

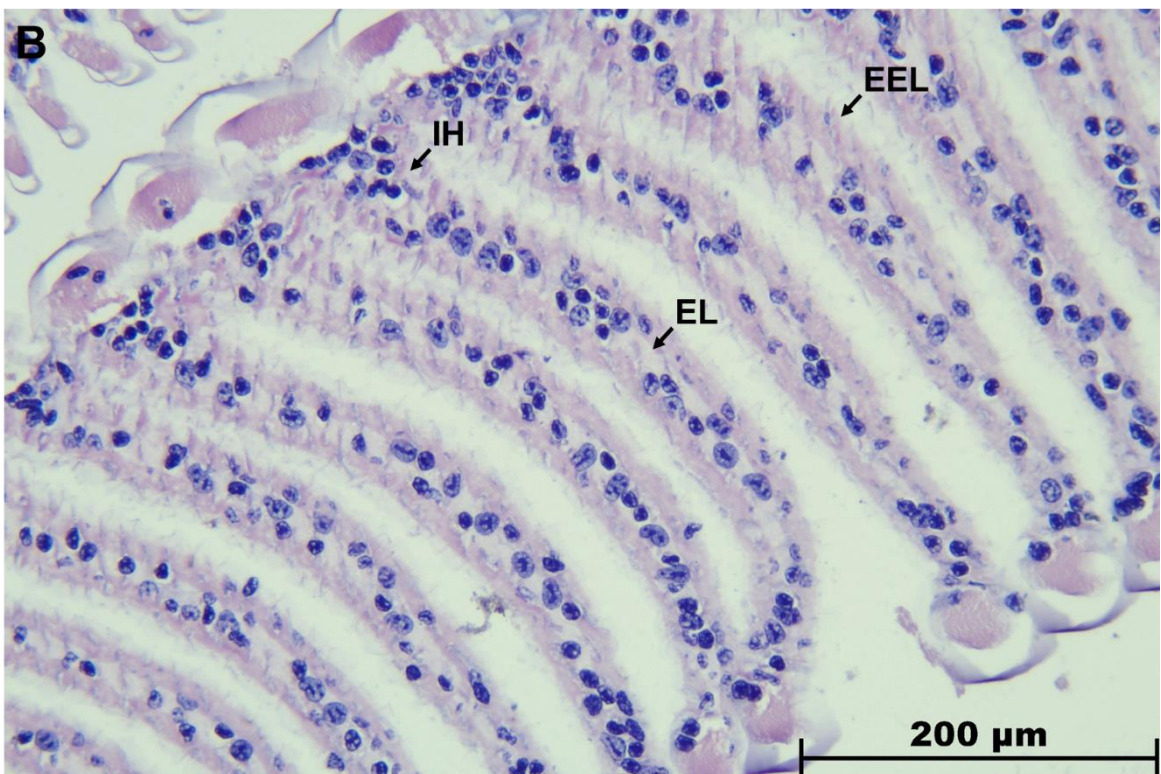
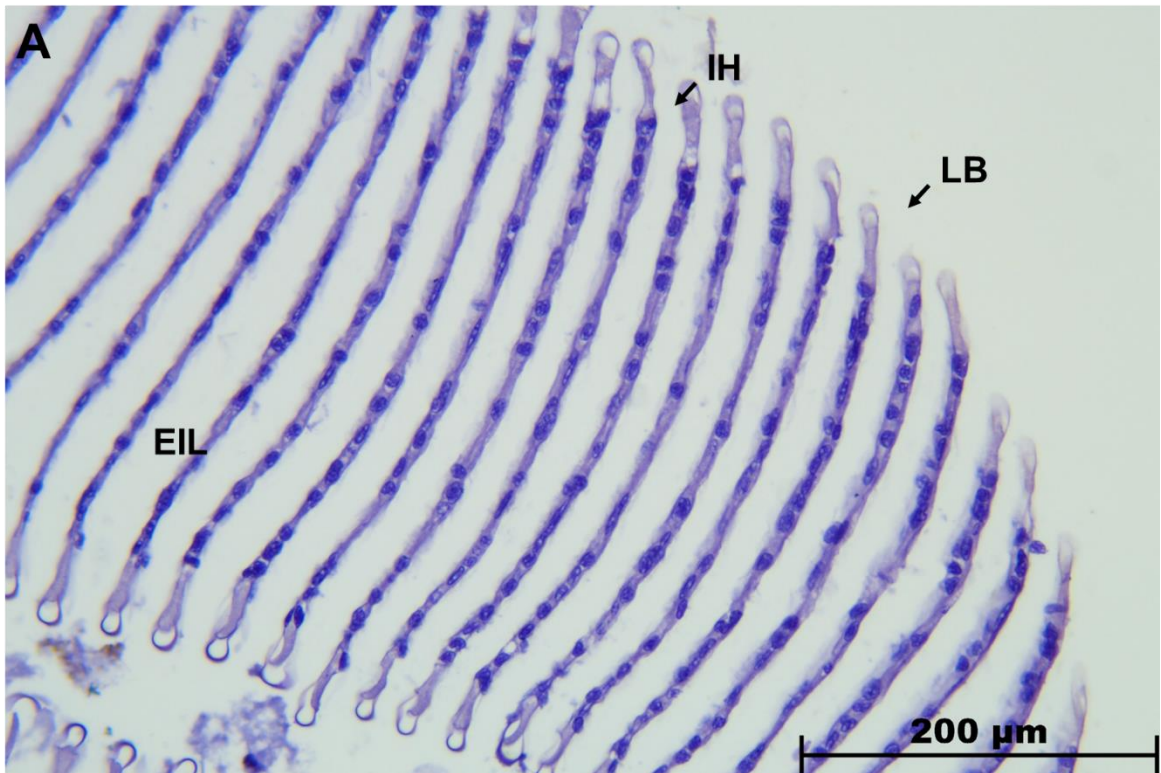
Zheng, C., Zhao, Q., Li, E., Zhao, D. & Sun, S. 2022. Role of hypoxia in the behaviour, physiology, immunity and response mechanisms of crustaceans: A review. *Reviews in Aquaculture*, 14(2): 676-687.

Zheng, J., Mao, Y., Su, Y. & Wang, J. 2016. Effects of nitrite stress on mRNA expression of antioxidant enzymes, immune-related genes and apoptosis-related proteins in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & shellfish immunology*, 58: 239-252.

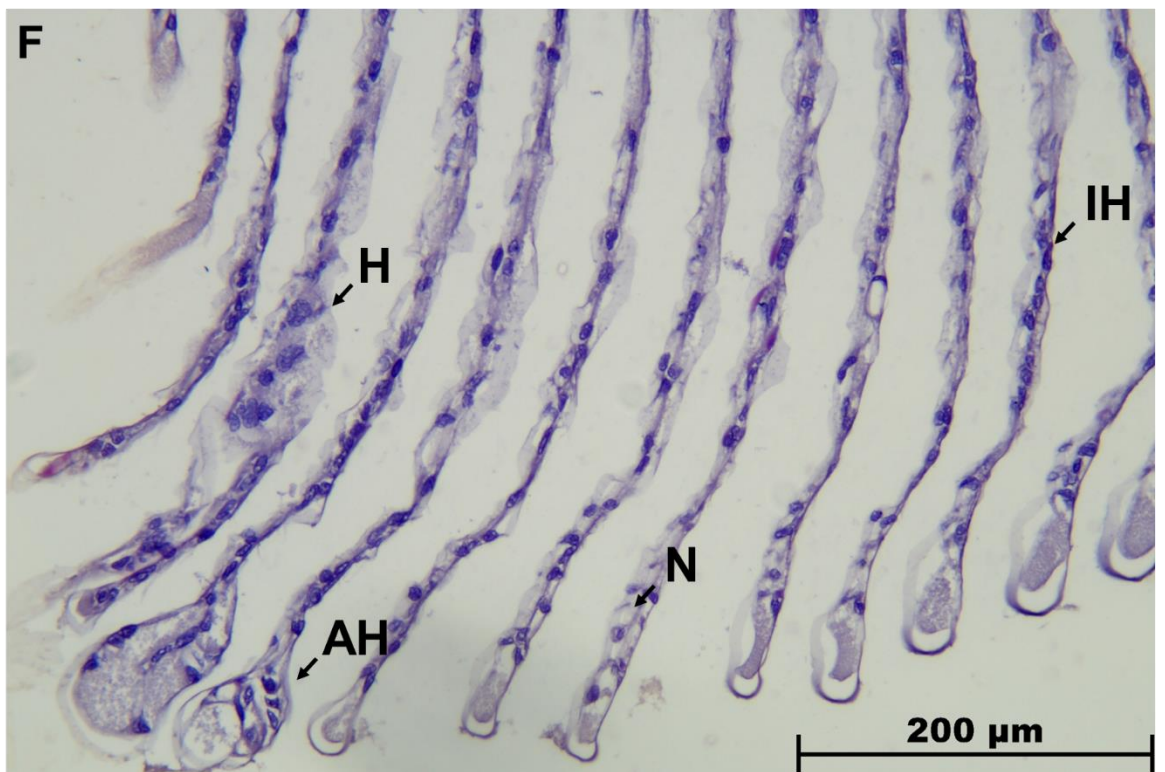
Zhou, K., Zhou, F., Huang, J., Yang, Q., Jiang, S., Qiu, L. *et al.* 2017. Characterization and expression analysis of a chitinase gene (PmChi-4) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogen infection and ambient ammonia nitrogen stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 62: 31–40.

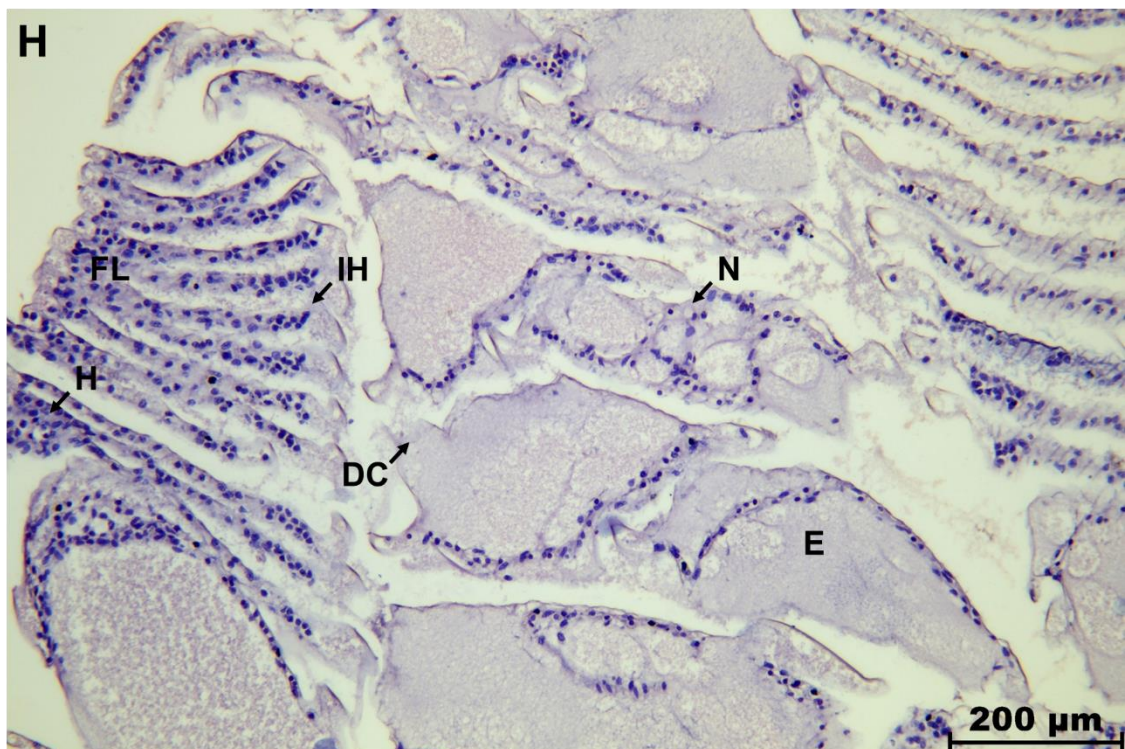
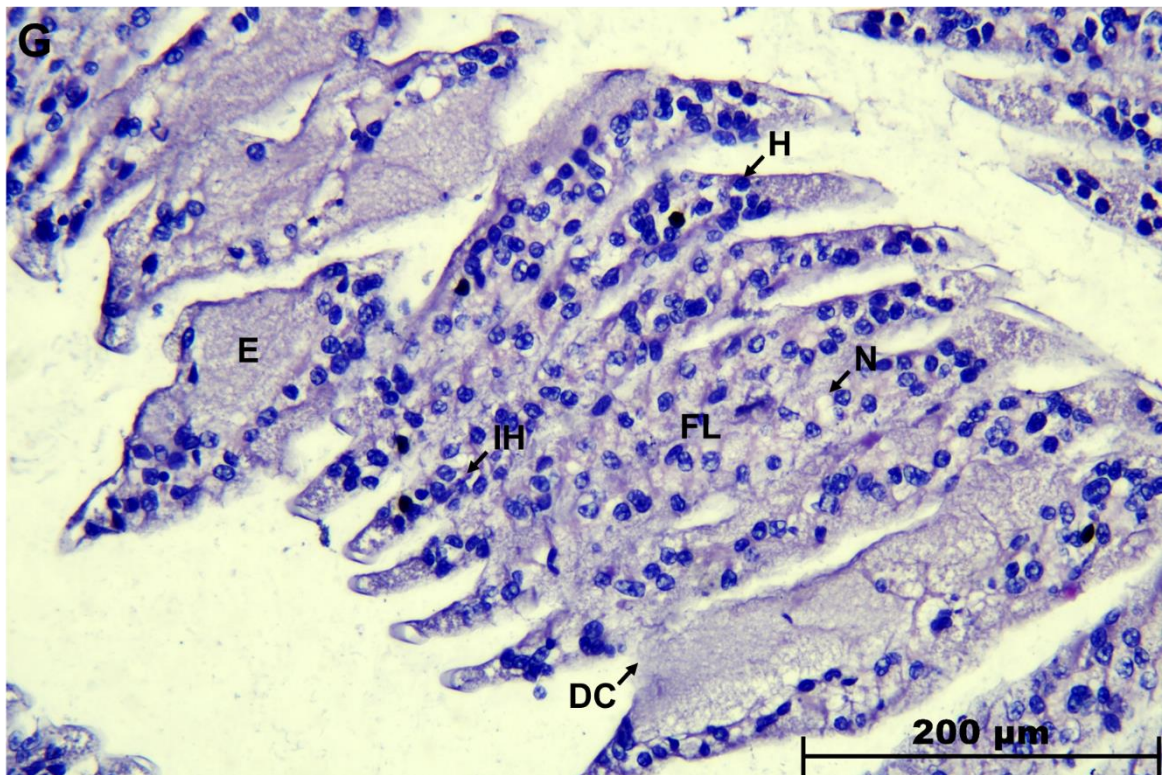
APÊNDICE 1

Imagens ampliadas das alterações observadas nas brânquias.









Aspecto microscópico das brânquias de juvenis e adultos de *Macrobrachium acanthurus* expostos à concentrações de amônia durante 96 horas e coradas por Hematoxilina de Harris e Eosina aquosa com aumento de 20x. A e B) Brânquia sem exposição à amônia (controle). C e

D) Brânquia exposta a 20 mg L⁻¹ de amônia total. E) Brânquia exposta a 40 mg L⁻¹ de amônia total. F) Brânquia exposta a 60 mg L⁻¹ de amônia total. G) Brânquia exposta a 80 mg L⁻¹ de amônia total. H) Brânquia exposta a 80 mg L⁻¹ de amônia total (10x). Lamela branquial (LB); Espaço inter-lamelar (EIL); Infiltração hemocítica (IH); Aglomerado de hemócitos (AH); Necrose (N); Fusão lamelar (FL); Espessamento lamelar (EL); Descamação da cutícula (DC); Espessamento do epitélio lamelar (EEL); Edema (E); Hiperplasia (H).