

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA KELVIANE COSTA GOMES

TOXICIDADE CRÔNICA DO NITRATO EM JUVENIS DE *Macrobrachium amazonicum*
(HELLER, 1862).

PALOTINA

2020



MARIA KELVIANE COSTA GOMES

TOXICIDADE CRÔNICA DO NITRATO EM JUVENIS DE *Macrobrachium amazonicum*
(HELLER, 1862).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Área de concentração: Produção de organismos aquáticos, Linha de Pesquisa: Manejo de Sistemas de Cultivo, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luís Cupertino Ballester.

Co-orientador: Dr. Plínio Schmidt Furtado.

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação em Publicação (CIP)

G633 Gomes, Maria Kelviane Costa
Toxicidade crônica do nitrato em juvenis de tilapia (Heller, 1 & 62) / Maria Kelviane Costa Gomes —
Palotina. 2020.
29f.

Orientador. Eduardo Luis Cupertino Baliester
Coorientador. Plínio Schmidt Furtado

Disertação (mestrado) — Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e
Desenvolvimento Sustentável.

1. Carcinicultura. 2. Cotoxicologia. 3. Nitrogenados. 4. Caramba-da-amazônia. 5. Manejo técnico. 6. Biotecnologia animal. I. Baliester,
Luis Cupertino. II. Furtado, Plínio Schmidt. III. Universidade
Federal do Paraná. I. m. Título.

CDU 639



MINISTERIO DA EDUCACAO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUACAO
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO AGRICULTURA E
DESENVOLVIMENTO SUSTENTAVEL 4000J 01607BP2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pela Congregação da Universidade Federal do Paraná para o Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a defesa da dissertação de Mestrado de MARIA KELVIANE COSTA GOMES intitulada: TOXICIDADE CROÔNICA DO NITRATO EM JUVENIS DE *Maorbraahium arnezonicum* HELPER, 1862, sob orientação do Prof. Dr. EDUARDO LUIS GUPERTINO BALLESTER, que após terem examinado a mesma e realizado a avaliação do trabalho, emitiram parecer pela sua aprovação e defesa. A outorga do título de Mestrado está sujeita à homologação do Colegiado, ao atendimento de todas as condições e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 31 de Janeiro de 2020.

EDUARDO LUIS GUPERTINO BALLESTER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CARLOS AUGUSTO RATA GAONA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO)

ISABEL VOLKWEIS ZADINI

Avaliador Externo (null)

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Maria do Carmo e Francisco Wellington e ao meu irmão Welleson.

Pessoas que me apoiam incondicionalmente em todas as minhas escolhas, dando-me força para seguir adiante.

À todos os colegas que contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, **a Deus**, pelo dom da vida, por me guiar em todas as coisas boas e as que colocou em meu caminho, por ter me dado força e perseverança para chegar até aqui.

Aos meus pais **Maria do Carmo e Wellington**, que em diversas vezes, com muito esforço e alguns sacrifícios sempre deram a mim e ao meu irmão as melhores condições para viver. Agradeço por todos os ensinamentos de valores, moral, conselhos, lições que já tive, e por todos os outros que ainda terei nesta constante educação que recebo. Obrigada por serem minha fortaleza e o maior exemplo de bondade, honestidade e dedicação que tenho em minha vida. Sou grata a vocês por esta pequena conquista e todas as outras que tive e terei.

Ao meu irmão **Welleson** pelo seu amor, apoio e carinho que me faz querer sempre ser uma pessoa melhor.

A **Universidade Federal do Paraná e CAPES** pelo apoio técnico-científico.

Aos meus orientadores **Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester e Dr. Plínio Schmidt Furtado**, por toda a confiança e oportunidade de realizar este projeto, pelo auxílio durante todas as etapas do meu mestrado, por todos os ensinamentos adquiridos que em muito contribuíram para minha formação através do conhecimento e lições ganhas em todos estes anos, trabalhando juntos e também pela amizade adquirida ao longo desse percurso.

Ao **Dr. Fabrício Dutra** pelo exemplo de pessoa e profissional, por toda a ajuda e disponibilidade prestada na realização e contribuições deste trabalho, nos momentos que mais precisei. Por acreditar no meu potencial e me encaminhar para as oportunidades de conhecimento. Com certeza, foram as minhas melhores experiências e me proporcionaram muitos conhecimentos.

A banca avaliadora composta pelos doutores **Dr^a. Izabel Zadinelo e Dr. Carlos Gaona** por terem aceitado participar na melhoria de meu trabalho de dissertação com suas sugestões e correções.

Aos professores **Dr^a. Adriana Fiorini e Dr. Milton Rönnau** pela disposição e contribuição para a minha formação.

As minhas amigas que mesmo distantes, sempre me apoiaram com carinho e energias positivas e as levo por toda a vida: **Mayara Maria, Patrycia Cabral, Joelma Costa, Iara Pimentel, Vanessa Lucas, Jacqueline Melo, Lana Leite, Caroline Lopes e Jeovana Oliveira**.

As minhas lindas amigas **Luciana Kelly Oliveira Silva, Aline Giombelli, Sabrina Fabrini, Rafaela Mocochinski, Lucinha Santos** por me incentivarem nos momentos em que desanimei. Obrigada pelas trocas de conhecimento e pelas conversas descontraídas.

Aos novos colegas e amigos do Laboratório de Carcinicultura da UFPR - Setor Palotina e os que fiz no decorrer da pós-graduação, pelos momentos de trabalho e de festas, pela ajuda na rotina do laboratório e pelos momentos de descontração que ficarão guardados pra sempre no meu coração: **Ademir Heldt, Ana Paula Oliveira, Ana Caroline, Laís de Lima, Matheus Coelho, Alisson Dias, Sandra Fornek, Estevan Silveira, Cláudia Caramelo, Marlise Mauerwerk, Letícia Pilz.**

Aos terceirizados da UFPR, por toda gentileza e carinho: **Amarildo Gomes** (portaria), **Sr. Orlando** (portaria), **Sra. Jane** (limpeza), **Arislei Silva, Lucas Pootz, Márcio Veloso, Odair** (vigilância).

Ao meu namorado **Ejenaldo da Silva Lourenço** por ter me dado forças nos últimos meses para seguir a diante nessa jornada tão árdua da vida acadêmica, sem nunca deixar de lado o afeto, amor e cuidados com nossa relação.

A todos os outros não mencionados e não menos importantes que, de algum modo, contribuíram de algum modo em minha vida pessoal e acadêmica.

"Quando a vida bater forte e sua alma sangrar, quando esse mundo pesado lhe ferir, lhe esmagar...É hora do recomeço. Recomece a lutar". (Bráulio Bessa)

"A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu formato original". (Albert Einstein)

"O fim determina o valor do esforço". (Frases Judaicas)

RESUMO

No Brasil o camarão de água doce, *Macrobrachium amazonicum*, apresenta um ótimo potencial para produção em cativeiro. Além disso, cada vez mais existe a preocupação no desenvolvimento de sistemas de cultivo sustentáveis, com menor uso de água. Neste tipo de sistema, manter a boa qualidade da água é um dos maiores desafios, pois os compostos nitrogenados como nitrato podem se acumular ao longo do tempo, acarretando concentrações tóxicas aos animais e inviabilizando a produção. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito crônico de diferentes concentrações de nitrato sobre o desempenho zootécnico, consumo alimentar e estado de saúde de juvenis de *M. amazonicum*. A avaliação da toxicidade crônica foi realizada a partir do nível de segurança de 15,54 mgL⁻¹ estabelecido em teste agudo (96h). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde 1200 juvenis/m³ foram expostos à quatro tratamentos com quatro repetições, durante o período de 28 dias. Sendo o tratamento controle, sem adição de nitrato (0 mgL⁻¹); metade do nível de segurança - NS (8 mgL⁻¹); o próprio NS (16 mgL⁻¹) e o dobro do NS (32 mgL⁻¹). Com a obtenção de dados, foram avaliados estatisticamente: sobrevivência e biomassa total; peso total médio final e comprimento total médio; consumo alimentar; comprimento total médio da antena e o índice escalonado de massa. Ao final do período experimental do teste de toxicidade crônica foi possível observar que houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos, para o desempenho zootécnico e as variáveis de qualidade de água, exceto as concentrações de nitrato se mantiveram próximo aos valores determinados para o teste. Os tratamentos de 8 e 16 mgL⁻¹, apresentaram melhor taxa de sobrevivência com 93,8% e 89,6%, respectivamente e valores de biomassa satisfatórios em relação ao tratamento de 32 mgL⁻¹ de nitrato. Houve um efeito significativamente negativo para comprimento médio total final (4,20 para 4,03 cm) e peso médio final (0,63 para 0,59 g). O consumo médio de ração nas concentrações de 0, 8 e 16 mgL⁻¹ também foi afetado durante o período de exposição, que variou entre 0,101 e 0,098 g de ração/g de camarão/dia. Porém, apresentaram vantagem em relação ao ganho de peso comparado ao tratamento com 32 mgL⁻¹. O comprimento médio da antena (4,32 para 1,71) ($r^2 = 0,95$; $F = 39,98$; $P = 0,024$) e o índice escalonado de massa – IEM ($r^2 = 0,8331$; $F = 9,98$; $P = 0,0873$), também foram afetados com o aumento na concentração de nitrato. Dessa forma podemos concluir que concentrações até 8 mgL⁻¹ (metade do nível de segurança) são seguras para o desenvolvimento saudável de juvenis de *M. amazonicum* em sistemas de produção.

Palavras-chave: Carcinicultura. Ecotoxicologia. Nitrogenados. Camarão-da-amazônia. Manejo técnico. Saúde animal.

ABSTRACT

In Brazil freshwater prawn, *Macrobrachium amazonicum*, has great potential for captive production. In addition, there is growing concern about the development of sustainable aquaculture systems with less water use. Maintaining good water quality in this type of system is one of the biggest challenges, as nitrogenous compounds such as nitrate can accumulate, reaching toxic concentrations and making production impossible. Therefore, the aim of this study was to evaluate the chronic effect of different nitrate concentrations on zootechnical performance, food intake and health status of *M. amazonicum* juveniles. Chronic toxicity was assessed from the safety level of 15.54 mgL⁻¹ established in the acute test (96h). The experimental design was completely randomized, where 1200 juveniles / m³ were exposed to four treatments and four replications during 28 days. Being the control treatment, without addition of nitrate (0 mg.L⁻¹); half security level - SL (8 mg.L⁻¹); SL (16 mg.L⁻¹) and twice SL (32 mg.L⁻¹). After the data collection, the following were statistically evaluated: survival and total biomass; average final weight and average total length; food consumption; average total antenna length and the staggered mass index. At the end of the experimental period of the chronic toxicity test, it was observed that there were no significant differences ($p > 0.05$) among treatments for the zootechnical performance and the water quality variables, except the nitrate concentrations that remained close to the values, determined for the test. Treatments of 8 and 16 mg.L⁻¹ had the higher survival rates, 93.8% and 89.6%, respectively, and satisfactory biomass values compared to treatment with 32 mg.L⁻¹ nitrate. There was a significantly negative effect on the final average length (4.20 to 4.03 cm) and the final average weight (0.63 to 0.59 g). The average feed intake at concentrations of 0, 8 and 16 mg.L⁻¹ also was affected during the exposure period, ranging from 0.101 to 0.098 g of feed / g of shrimp / day. However, they had an advantage over weight gain compared to 32 mg.L⁻¹ treatment. The mean antenna length (4.32 to 1.71) ($r^2 = 0.95$; $F = 39.98$; $P = 0.024$) and the phased mass index - EMI ($r^2 = 0.8331$; $F = 9.98$; $p = 0.0873$) were also affected with increasing nitrate concentration. Thus, we can conclude that concentrations up to 8 mg.L⁻¹ (half the safety level) are safe for the healthy development of *M. amazonicum* juveniles in production systems.

Key words: Shrimp farming. Ecotoxicology. Nitrogenated. Amazon River Prawn. Technical management. Animal health.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES MÉDIOS (\pm D.P.) DAS VARIÁVEIS DE QUALIDADE DE ÁGUA DURANTE O CULTIVO DE JUVENIS DE <i>MACROBRACHIUM AMAZONICUM</i> EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO.....	19
--	----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - VALORES MÉDIOS (\pm E.P.) DE SOBREVIVÊNCIA (CÍRCULOS PRETOS) E BIOMASSA TOTAL FINAL (CÍRCULOS BRANCOS) DOS JUVENIS DE *M. AMAZONICUM* EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO.....20
- FIGURA 2 - VALORES MÉDIOS (\pm E.P.) DE COMPRIMENTO MÉDIO TOTAL (CÍRCULOS BRANCOS) E PESO MÉDIO FINAL (CÍRCULOS PRETOS) DOS JUVENIS DE *M. AMAZONICUM* EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO.....21
- FIGURA 3 - VALORES MÉDIOS (\pm E.P.) DO CONSUMO ALIMENTAR PARA JUVENIS DE *M. AMAZONICUM* EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO22
- FIGURA 4 - REGRESSÃO LINEAR DO COMPRIMENTO MÉDIO DA ANTENA (CÍRCULOS BRANCOS) E DO ÍNDICE ESCALONADO DE MASSA (CÍRCULOS PRETOS) EM JUVENIS DE *M. AMAZONICUM* EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO.....23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICO	15
3.2	QUALIDADE DE ÁGUA.....	16
3.3	DESEMPENHOS ZOOTÉCNICO.....	17
3.4	CONSUMO ALIMENTAR.....	17
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	17
4	RESULTADOS	18
5	DISCUSSÃO.....	24
6	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Segundo a FAO (2018), em 2016, as espécies *Macrobrachium nipponense* e *Macrobrachium rosenbergii* lideraram a produção mundial de camarões de água doce, com aproximadamente 273.000 e 234.000 toneladas, respectivamente, demonstrando o grande potencial desta atividade. Todavia, espécies exóticas acabam prejudicando a biodiversidade dos principais recursos naturais e por esse motivo, há uma grande pressão social e de órgãos governamentais para inclusão de espécies nativas na aquicultura (Vitule e Prodócimo, 2012).

No Brasil o camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum*, apresenta um ótimo potencial para produção em cativeiro, por sua carne ter uma textura mais firme e com mais sabor (Bentes et al., 2011). Por se tratar de uma espécie nativa não apresenta risco de invasão nos ecossistemas naturais, encaixando-se no conceito de aquicultura sustentável (Bentes et al., 2016; Nóbrega et al., 2014). De acordo com Meireles et al. (2013), mesmo que os exemplares de *M. amazonicum* sejam menores que *M. rosenbergii*, possuem rápido crescimento, grande rusticidade e resistência, fácil reprodução e desenvolvimento em cativeiro.

Ainda assim, existe uma carência em estudos voltados para o desenvolvimento de um pacote tecnológico destinado ao *M. amazonicum*, como por exemplo, monitoramento e controle da qualidade de água que são condições primordiais para alcançar bons índices de produtividade (Bentes et al., 2016; Maciel et al., 2012), uma vez que a manter a boa qualidade da água é um dos maiores problemas em sistemas intensivos fechados e sem renovação, pois, a amônia proveniente da excreção dos animais, a decomposição da matéria orgânica e o processo de nitrificação que forma o nitrato (De Queiroz, 2012; Campos et al., 2013) ao acumular-se por longo período, acarreta em concentrações tóxicas aos animais e inviabilizam a produção (Boyd e Tucker, 2012; Dutra et al., 2016a, 2016b, 2020; Romano e Zeng, 2013;).

O nitrato, por ser o produto final da nitrificação, pode acumular-se abundantemente em sistema fechados de produção e causar efeitos letais ou subletais em diferentes organismos aquáticos, ou ainda, combinar-se com outros compostos nitrogenados (Campos et al., 2013; Furtado et al., 2015). Em termos de efeitos fisiológicos, os camarões realizam excreção pelas brânquias por difusão passiva, ou seja, quando a concentração de nitrato do meio externo é maior que a concentração interna, o processo fisiológico das trocas gasosas, o equilíbrio osmótico e iônico pode ser prejudicado ou até mesmo totalmente interrompido, sendo fatores potenciais para desencadear estresse ou morte em casos extremos para organismos aquáticos (Arana, 2010).

De acordo com dados recentes de Dutra et al. (2020), é possível obter que a CL_{50} de 96 h para juvenis de *M. amazonicum* é de 15,54 mgL^{-1} de $N-NO_3^-$, assim, testes agudos são normalmente usados para determinar os limites de concentração suportados pelos camarões, e a partir de seus resultados são estimadas doses letais e níveis de segurança.

Entretanto, para assegurar que estes níveis são realmente seguros para a criação destes animais, são necessários a realização de testes crônicos a partir da avaliação aguda da concentração letal mediana (CL_{50-96h}), onde os animais são expostos aos compostos tóxicos por mais tempo e apresentam resposta de maior confiabilidade. Porém, não são suficientes para avaliar o bem-estar do animal (Dutra et al., 2017, 2019). Deste modo, considerar informações a respeito da condição corpórea do animal, que exposição ao nitrato podem gerar danos às brânquias e o comprimento das antenas são primordiais para compreender melhor a condição de saúde dos camarões e obter maior confiabilidade aos resultados.

Segundo Kuhn et al. (2010) e Furtado et al. (2015) as antenas são estruturas que apresentam funções sensoriais e auxiliam na busca de alimento, estas, quando quebradas ou curtas, evidenciam sinais de comprometimento da saúde nesses organismos e, conforme Peig e Green (2009), o índice escalonado de massa (IEM) representa um indicativo de saúde, mediante a proporção das reservas energéticas, independente da variação sexual e de tamanho do indivíduo.

Além disso, avaliar a influência do nitrato sobre o consumo alimentar também é uma importante ferramenta que pode ser usada para determinar o melhor manejo com o intuito de evitar a administração excessiva de alimento, que compromete a qualidade da água, ou um fornecimento insuficiente de alimento que afete o crescimento e a mortalidade dos camarões (Campos et al., 2013; Kuhn et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito crônico do nitrato sobre juvenis do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a tolerância de juvenis de *M. amazonicum* ao composto nitrato;

- Avaliar se o nível de segurança determinado, a partir da Concentração Letal Mediana (CL₅₀) de nitrato em teste agudo (96h), para juvenis de *M. amazonicum* é seguro para exposição de longo prazo;
- Avaliar os efeitos crônicos do nitrato sobre desempenho zootécnico dos juvenis de *M. amazonicum*;
- Verificar a influência de nitrato sobre o consumo alimentar de juvenis de *M. amazonicum*;
- Verificar o estado de saúde de juvenis de *M. amazonicum* submetidos à exposição crônica de nitrato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do ensaio experimental do efeito crônico do nitrato em juvenis de *M. amazonicum*, foi utilizado o resultado do nível de segurança a partir da concentração letal mediana de 15,54 mgL⁻¹ de N-NO₃⁻, obtido por Dutra et al. (2019) em teste agudo de toxicidade ao nitrato (CL₅₀-96h) para a mesma espécie.

O experimento foi realizado no Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, durante 28 dias em sistema estático com água clara oriunda de abastecimento público previamente desclorada. Os juvenis de *M. amazonicum* (0,528±0,086 g) foram obtidos de sistemas de berçários do próprio laboratório.

3.1 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICO

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de quatro tratamentos (0, 8, 16 e 32 mgL⁻¹ de N-NO₃⁻) e quatro repetições. Os tratamentos corresponderam respectivamente ao controle (sem adição de nitrato), metade do nível de segurança, o nível de segurança e o dobro do nível de segurança.

Os animais (n=12/unidade) foram devidamente aclimatados e acomodados em 16 unidades de polipropileno com volume útil de 10 litros, providas de aeração constante a partir de mangueiras de plástico siliconada 4mm conectadas às pedras porosas. Substratos feitos com telas sintéticas (40 cm x 60 cm e diâmetro de abertura 01 cm) foram colocados dentro das unidades experimentais para reduzir o comportamento agonístico entre os animais. O fotoperíodo utilizado foi de 12:12 (claro/escuro), em sala climatizada a fim de manter a

temperatura em aproximadamente 26°C. Posteriormente, foram adicionadas as concentrações correspondentes a cada tratamento.

As concentrações de nitrato pretendidas foram obtidas pelo preparo de soluções estoques (1.000 mg.L⁻¹ de N-NO₃⁻). Para isto, foi calculado a massa molecular do nitrogênio (estequiometria) para obtenção da quantidade do sal (NaNO₃ P.A. Anidrol[®]) e dissolvidas em água ultrapura. A partir da solução estoque, foram realizadas as diluições para obtenção da concentração de nitrato de cada tratamento.

Diariamente, em cada unidade experimental fazia-se a retirada de fezes, sobras de ração e animais mortos por sifonamento e filtragem da água com auxílio de uma peneira com malha 63 µm de abertura, para evitar o acúmulo de matéria orgânica e alterações na qualidade de água. A cada 72 horas, a água do sistema foi renovada em 90% do volume, com adição de nova solução, para manter as respectivas concentrações, conforme adaptação à metodologia proposta por Melo et al. (2016). Após cada renovação de água, amostras eram coletadas, a fim de determinar a concentração de nitrato e os demais parâmetros de qualidade de água.

Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (10h e 19h) durante todo o período de experimento, com ração comercial triturada e peneirada (500-1000 µm; Poti Mirim QS 40 J; Guabi[®] - 40% proteína bruta) com intenção de padronizar o tamanho dos pellets e facilitar o manuseio do alimento pelo animal. A taxa de alimentação inicial foi estabelecida em 5% da biomassa por unidade experimental e ajustada conforme observação do consumo diário e mortalidade, até o final do experimento.

3.2 QUALIDADE DE ÁGUA

As variáveis de qualidade de água foram monitoradas diariamente em cada unidade experimental para oxigênio dissolvido e temperatura (Oxímetro, HANNA[®] HI 9146) e pH (medidor de bancada, LUCADEMA[®] 210). A cada 72 horas, foram coletadas amostras da água, armazenadas em garrafas plásticas e encaminhadas ao Laboratório de Qualidade de Água e Limnologia da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina para determinação das concentrações de amônia total (4500 – NH₃ F. *Fhenate method*), nitrito (4500 – NO₂⁻ B. *Colorimetric method*), nitrato (4500 - NO₃⁻ E. *Cadmium reduction method*), alcalinidade (titulação – 2320 B. *Titration method*) e dureza (titulação – 2340 C. EDTA *Titrimetric method*), conforme metodologias descritas em APHA (2005). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro BELPHOTONICS[®] SP2000 UV.

3.3 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Ao final do experimento, os camarões foram contabilizados, pesados (balança eletrônica digital, AY220, Marte/ Shimadzu®; 0,01g) e medidos (paquímetro analógico, Digimess®) individualmente, quanto ao comprimento total e tamanho das antenas. Os resultados obtidos de desempenho zootécnico, como: sobrevivência e biomassa total da unidade experimental; peso médio final e comprimento total médio; bem-estar animal; consumo alimentar; comprimento total médio da antena e o índice escalonado de massa.

3.4 CONSUMO ALIMENTAR

Para avaliação do consumo alimentar, seis camarões foram selecionados aleatoriamente de cada tratamento, adaptando a metodologia proposta por Campos et al. (2013). Para tal, os juvenis de *M. amazonicum* permaneceram 24 horas em jejum, depois foram pesados e colocados individualmente em béqueres de 250 mL, submetidos as mesmas concentrações do teste de toxicidade crônica. Após, os camarões foram alimentados com ração (500-100 µm; Poti Mirim QS 40 J; Guabi® - 40% proteína bruta), seca à 60°C por 24hs e pesada em uma taxa equivalente a 50% da biomassa individual.

Depois de 24 horas, os animais foram retirados das unidades experimentais e a água restante foi filtrada em papel filtro previamente secos em estufa (Marconi® MA 033) a 60°C por 24 horas e pesados. Após a filtração, os papéis filtros passaram novamente pela secagem à 60°C por 24 horas e pesados novamente. O percentual de matéria seca obtida foi mensurada a partir da diferença entre o que foi fornecido de ração e as sobras, considerando o peso dos filtros antes e depois de secagem na estufa e as perdas em todo o processo. A lixiviação da ração utilizada na equação do consumo alimentar e o cálculo realizado foi adaptado conforme Campos et al. (2013).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos para sobrevivência; peso médio final; ganho em peso; biomassa, consumo alimentar e comprimento total médio foram submetidos à verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade por meio dos testes de Shapiro e Wilk e Levene. Após validação destes pressupostos, os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (*One-Way* Anova) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$; Zar, 2010).

Quanto ao comprimento da antena e índice escalonado de massa os dados foram submetidos à regressão linear ($\alpha = 0,05$; Zar, 2010).

4 RESULTADOS

Os resultados das variáveis de qualidade de água avaliadas nos diferentes tratamentos, descritos na tabela 1, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Ou seja, permaneceram dentro da faixa recomendada para a produção de camarões de água doces, e as concentrações de nitrato que se mantiveram próximas aos valores estipulados resultantes das diluições de NaNO_3 para realização dos testes.

Tabela 1. Valores médios (\pm D.P.) das variáveis de qualidade de água durante o cultivo juvenis de *Macrobrachium amazonicum* expostos a diferentes concentrações de nitrato.

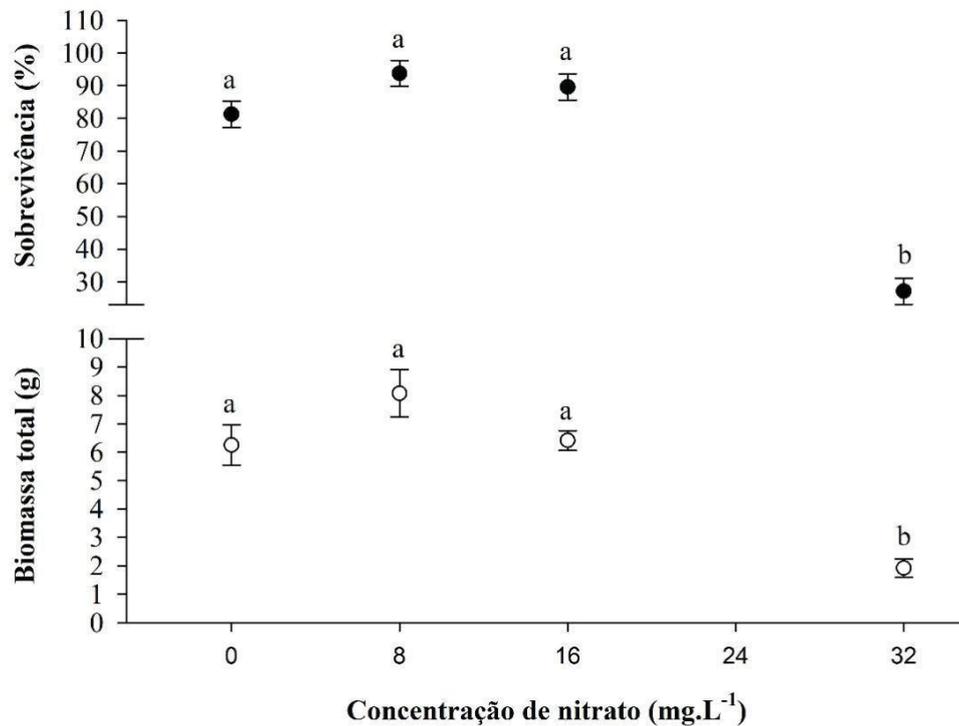
Variáveis	Concentração de nitrato (mgL^{-1})				Valores recomendados para produção de camarão de água doce*
	0	8	16	32	
Temperatura H_2O ($^{\circ}\text{C}$)	26,00 \pm 1,00	26,00 \pm 0,98	26,00 \pm 0,99	26,00 \pm 1,00	25-29
Oxigênio dissolvido (mgL^{-1})	6,50 \pm 0,60	6,50 \pm 0,70	6,50 \pm 0,60	6,50 \pm 0,50	>4
pH	7,80 \pm 0,50	7,90 \pm 0,30	7,90 \pm 0,30	7,90 \pm 0,30	~8
Alcalinidade (mgL^{-1} CaCO_3)	65,40 \pm 10,90	65,00 \pm 14,40	66,00 \pm 14,30	66,80 \pm 12,80	35-120
Dureza (mg.L^{-1} CaCO_3)	44,40 \pm 8,60	45,00 \pm 9,40	46,70 \pm 8,90	47,60 \pm 8,40	20-150
Amônia total (mgL^{-1})	0,64 \pm 0,30	0,58 \pm 0,30	0,64 \pm 0,22	0,56 \pm 0,23	<1
Nitrito (mgL^{-1})	0,05 \pm 0,05	0,47 \pm 0,24	0,48 \pm 0,23	0,41 \pm 0,23	<2
Nitrato (mgL^{-1})	0,05 \pm 0,40	8,27 \pm 1,45	17,34 \pm 2,46	35,56 \pm 5,09	Valores testados

Fonte: A autora (2020).

NOTA:* Valores recomendados por New et al. (2010).

De acordo com a figura 1 do teste de toxicidade crônica, os tratamentos de 0 a 16 mgL⁻¹ não evidenciaram diferenças estatísticas entre si ($p>0,05$) em relação ao desempenho zootécnico, porém os tratamentos de 8 e 16 mgL⁻¹, apresentaram melhor taxa de sobrevivência com 93,8% e 89,6%, respectivamente e valores de biomassa satisfatórios em relação ao tratamento de 32 mgL⁻¹ de nitrato.

Figura 1. Valores médios (\pm E.P.) de sobrevivência (círculos pretos) e biomassa total final (círculos brancos) para juvenis de *M. amazonicum* expostos a diferentes concentrações de nitrato.

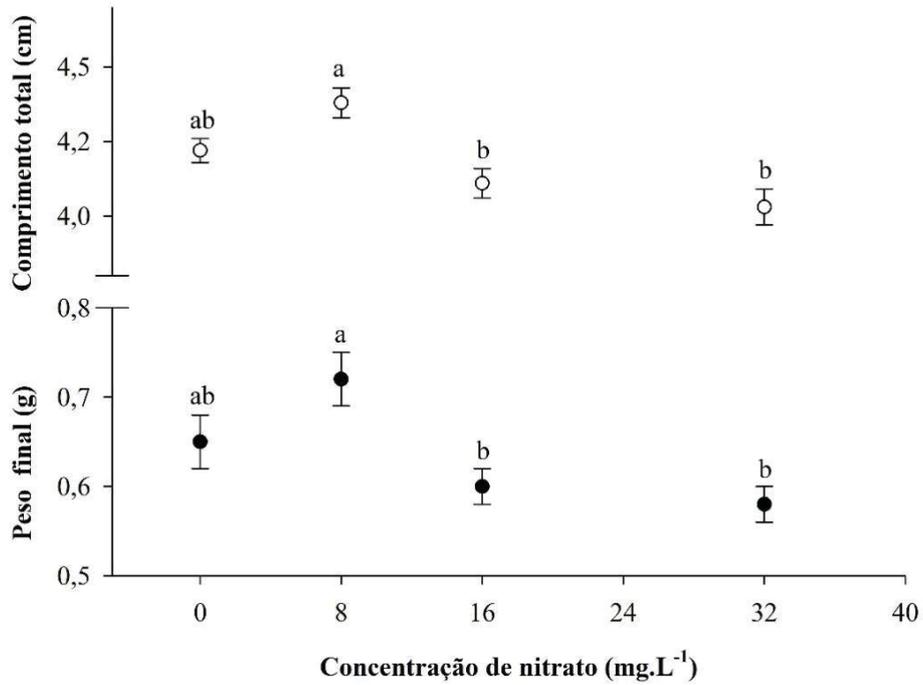


FONTE: A autora (2020).

NOTA: Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Quando expostos às maiores concentrações de nitrato foi possível notar que os camarões aparentaram uma redução significativa no comprimento médio total de 4,20 para 4,03 cm, ao mesmo tempo em que o peso médio final foi de 0,63 para 0,59 g (Figura 2).

Figura 2. Valores médios (\pm E.P.) de comprimento médio total (círculos brancos) e peso médio final (círculos pretos) para juvenis de *M. amazonicum* expostos a diferentes concentrações de nitrato.

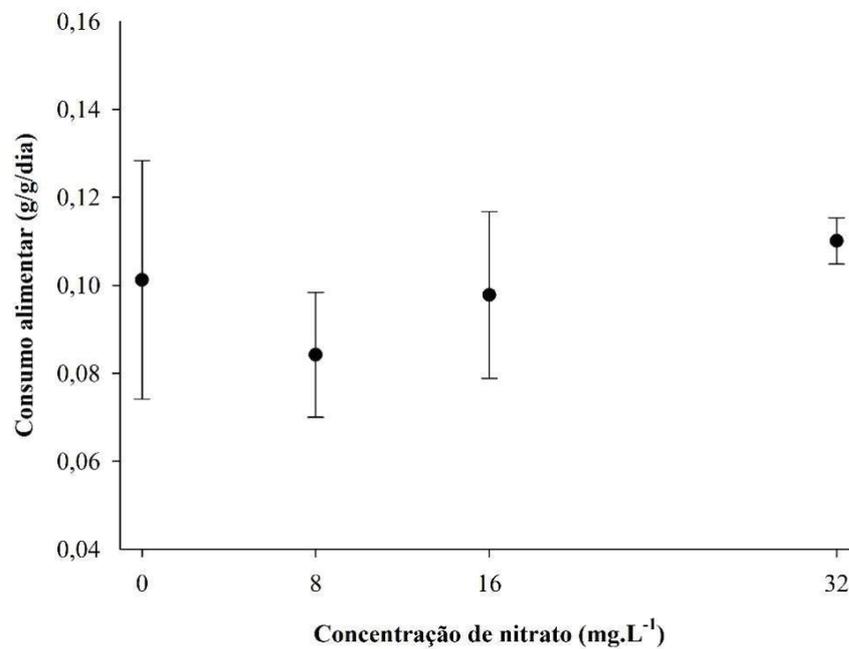


FONTE: A autora (2020).

NOTA: Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O consumo médio de ração pelos juvenis de *M. amazonicum* nas concentrações de 0, 8 e 16 mgL⁻¹ também foi afetado durante o período de exposição, que variou entre 0,101 e 0,098 g de ração/ g de camarão/dia porém, o peso final dos animais em 8 mgL⁻¹ foi maior. Na figura 3, com o aumento da concentração de nitrato ocorre um maior consumo alimentar, contudo não é observado um maior ganho de peso, ou seja, provavelmente não há uma conversão de alimento como demonstrado na figura 2 em relação ao peso final.

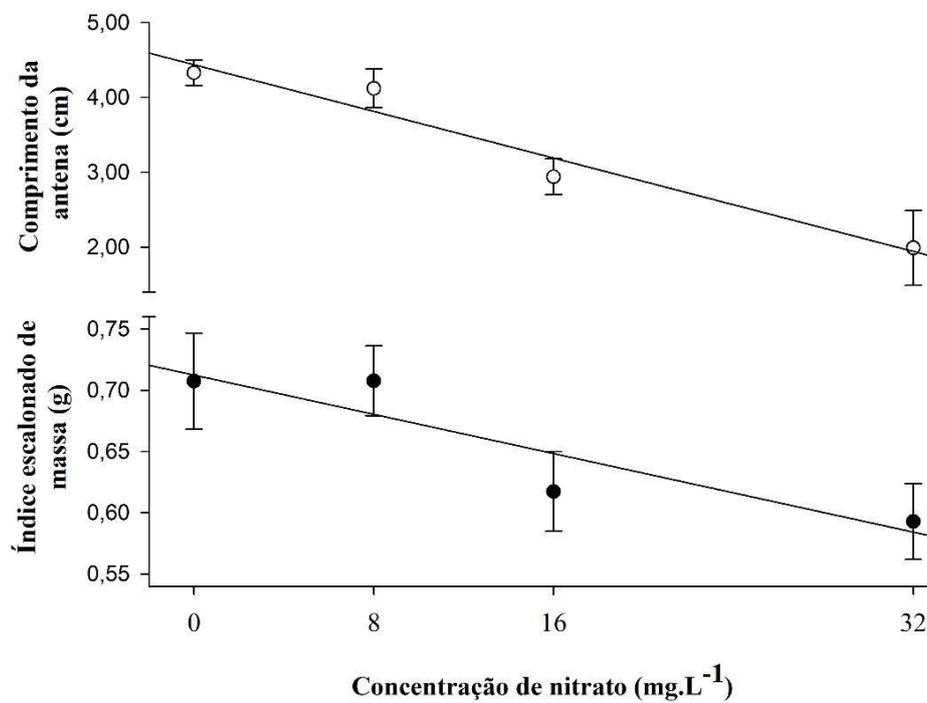
Figura 3. Valores médios (\pm E.P.) de consumo alimentar para juvenis de *M. amazonicum* expostos a diferentes concentrações de nitrato.



FONTE: A autora (2020).

Conforme apresentado na figura 4, o comprimento médio da antena foi de 4,38 para 1,71 cm ($r^2 = 0,95$; $F = 39,98$; $p = 0,024$), devido ao efeito da toxicidade crônica e para o IEM, é possível analisar que o estado de saúde e bem-estar dos juvenis de *M. amazonicum* também foram significativamente afetados pela exposição crônica de nitrato ($r^2 = 0,8331$; $F = 9,98$; $p = 0,0873$) apontando um agravamento contínuo, a partir do valor ideal para produção e limitante do nível de segurança para a espécie em estudo (8 mg.L^{-1}).

Figura 4. Regressão linear do comprimento médio da antena (círculos brancos) e do Índice Escalonado de Massa (círculos pretos) em juvenis de *M. amazonicum* expostos a diferentes concentrações de nitrato.



FONTE: A autora (2020).

5 DISCUSSÃO

Durante o experimento a temperatura permaneceu constante em aproximadamente 26°C, a concentração de oxigênio dissolvido em torno de 6,5 mg.L⁻¹, pH com variação entre 7,8 a 7,9, alcalinidade entre 65 e 66,8 mg.L⁻¹ de CaCO₃ e dureza entre 44,4 a 47,6 mg.L⁻¹ (Dutra et al., 2020; Farias Lima et al., 2019; Hayd et al., 2014; Liu et al., 2020). As concentrações de amônia e nitrito apresentados, mantiveram-se inferiores aos níveis sugeridos por Dutra et al. (2016a, 2016b) que recomendou um limite de 2,16 mg.L⁻¹ e 2,23 mg.L⁻¹ respectivamente. Portanto, nenhum dos parâmetros de qualidade da água medidos neste estudo foram limitantes ou estressantes para os camarões.

Embora a literatura apresente carência de informações sobre o efeito tóxico do nitrato em juvenis de camarões da espécie *M. amazonicum*, por meio do presente experimento podemos considerar valores que podem servir como base para produção intensiva, mas não como regra para todas as espécies de camarão de água doce, uma vez que o aumento da concentração de 0 para 32 mg.L⁻¹ de N-NO₃⁻ ocasionou uma redução no bem estar dos camarões. Em testes de exposição crônica realizadas em pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, foi determinado que concentrações acima de 4,5 mg L⁻¹ de nitrato em um sistema de produção podem resultar em perdas produtivas (Dutra et al., 2019).

Nos tratamentos 8 e 16 mg.L⁻¹, a sobrevivência média foi semelhante à encontrada na literatura, reforçando que o *M. amazonicum* é resistente ao nível de segurança da toxicidade aguda testada por Dutra et al. (2020), enquanto no tratamento 32 mg.L⁻¹, a sobrevivência foi afetada negativamente. Mortalidades de aproximadamente 20% já são previstas para a produção de espécies do gênero devido ao comportamento agonístico e canibalismo (Moraes-Valenti e Valenti, 2010).

O peso final e comprimento total obtidos nos tratamentos 16 e 32 mg.L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas comparado aos demais resultados, porém foram os mais prejudicados em resposta ao estresse, porque quando há um aumento na concentração do composto, o nitrato pode danificar os tecidos branquiais causando lesões, afetando o transporte de oxigênio o que reduz os processos de alimentação, ganho de peso e crescimento para manter as funções vitais. Possivelmente, esta adaptação do metabolismo animal ao ambiente e o grande gasto energético no processo de osmorregulação e respiração, afetou o consumo alimentar. Resultados semelhantes foram encontrados por Campos et al. (2013) e Furtado et al. (2015) ao avaliar os efeitos tóxicos do nitrato, comprovando que este composto tende a agravar a condição

de bem estar para as espécies de *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus vannamei*, respectivamente.

No presente estudo, comparando os demais tratamentos com o controle, houve relação inversa entre o consumo de alimento e a exposição ao composto nitrogenado, porém os efeitos não diferiram com relação às concentrações testadas. Portanto, com menor consumo alimentar o desempenho zootécnico dos camarões pode ficar comprometido, ocasionando mortalidade e refletindo em uma perda econômica na produção. Os efeitos do nitrato no desempenho zootécnico e no consumo alimentar também foram relatados em pesquisas com outras espécies de camarões (Campos et al., 2013; Dutra et al., 2019; Furtado et al., 2015; Kuhn et al., 2010; Muir et al., 1991; New et al., 2010).

Ainda com estes resultados, podemos observar que a toxicidade crônica ao nitrato, causam efeitos letais ou subletais pois interferem na condição corpórea do animal e no desenvolvimento dos órgãos sensoriais. Uma vez que, ocorreram danos na estrutura das antenas devido ao rompimento no processo de muda e regeneração das estruturas, conforme o aumento da concentração do composto, complicando o estado de saúde dos camarões. Efeitos similares foram observadas por Dutra et al. (2019) para o *M. rosenbergii*, uma redução de 50% no crescimento quando os camarões são expostos ao dobro das concentrações do nível de segurança.

A inibição no crescimento das antenas é atribuída ao maior gasto de energia utilizada para o controle endócrino do processo de muda, porém não foi possível observar uma recuperação desta estrutura sensorial. Nesta condição, a energia poupada possivelmente era direcionada para manter as funções vitais do animal (Furtado et al., 2015; Kuhn et al., 2010). A condição corporal dos camarões, acessada pelo IEM, pode ser influenciada pelas características de cada espécie, por fatores genéticos e nutricionais, por mudanças e interações com as condições ambientais, pelo manejo e sistema de produção, entre outros pois as reservas energéticas servem como precursoras para a condição de saúde animal (Peig e Green, 2009).

Por causa da complexidade de interação entre os compostos nitrogenados e produção de camarão em sistemas fechados, é necessário cuidados especiais relacionados às concentrações equivalentes aos níveis de segurança proposto para diversas espécies de camarões de água doce e sua fase de vida, por estar diretamente associada com o aporte energético de todo o metabolismo e sistema de produção. Pois, exposições inadequadas à concentração de nitrato e acima dos limites, por longos períodos, resultam em irritação e danos às brânquias, dificuldades respiratórias, anomalias estruturais e, conseqüentemente, prejuízos ao crescimento (Dutra et al., 2017).

Ressaltando esta importância para aquicultura, pode-se argumentar que é necessário incentivar os aquicultores a investir em espécies nativas e melhorar a tecnologia de produção, evitando o risco de invasão das espécies exóticas. Ao adotar tecnologias de modo sustentável para assimilação do nitrato como boas práticas de manejo para reuso da água, utilizar filtros anaeróbicos para o completar processo de desnitrificação, fazer uso de macrófitas aquáticas nos tanques ou implementar sistemas de aquaponia para evitar o acúmulo ou manter os níveis dos compostos nitrogenados adequados à espécie.

Assim, os dados obtidos neste estudo robustecem informações referentes à toxicidade crônica de nitrato, devido a espécie estudada apresentar semelhança com outras de camarões de água doce (*M. rosenbergii*) tanto no perfil de desempenho zootécnico como na alteração do bem-estar animal. Também é observado que a espécie nativa apresenta uma menor resistência em comparação às outras do gênero *Macrobrachium sp.*, conforme trabalhos citados.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que concentrações de até metade do nível de segurança (8 mg.L⁻¹), em um período de exposição crônica (28 dias), são seguras para o desenvolvimento saudável de juvenis de *M. amazonicum* para fase de berçários em condições intensivas de produção.

REFERÊNCIAS

- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2005. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th.ed. Washington DC: American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation.
- BENTES, B.S., MARTINELLI, J.M., SOUZA, L.S., CAVALCANTE, D.V., ALMEIDA, M.C., ISAAC, V.J. 2011. Spatial distribution of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in two perennial creeks of an estuary on the northern coast of Brazil (Guajará Bay, Belém, Pará). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 71, no. 4, p. 925-935. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842011000500013>.
- BENTES, B.; MARTINELLI-LEMOES, J. M.; ARAÚJO, C.; ISAAC, V. J. 2016. A pesca do camarão-da-amazônia, perspectivas futuras no litoral paraense. **Ciência e Cultura**, vol. 68, no. 2, p. 56-59, São Paulo Apr/Jun 2016. <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602016000200017>
- BOYD, C.E., TUCKER, C.S. 2012. Pond aquaculture water quality management. **Springer Science & Business Media**. DOI: 10.1007/978-1-4615-5407-3
- CAMPOS, B.R., FURTADO, P.S., D'INCAO, F., WASIELESKY, W., POERSCH, L.H.S. 2013. Nitrogen compounds on food consumption of pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.43, n.12, p.2202-2207, dez, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013005000136>
- DE QUEIROZ, J. F. 2013. Boas práticas aquícolas (BPA) em viveiros garantem sucesso da produção. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 36, 2013. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/950005/boas-praticas-quicolas-bpa-em-viveiros-garantem-sucesso-da-producao>. (Acessado em 15 de maio de 2019).
- DUTRA, F. M.; FORNECK, S. C.; BRAZÃO, C. C.; FREIRE, C. A.; BALLESTER, E. L. C. 2016 (a). Acute toxicity of ammonia to various life stages of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Aquaculture**, vol.453, no. 20, p.104-109 Feb 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.038>
- DUTRA, F. M.; FREIRE, C. A.; VAZ DOS SANTOS, A.M., FORNECK, S. C.; BRAZÃO, C. C.; FREIRE, C. A.; BALLESTER, E. L. C. 2016 (b). Acute toxicity of nitrite to various life stages of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Vol. 97, p. 619–625, Nov 2016. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1932-2>
- DUTRA, M. F.; 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**. vol. 187, p. 115-123, June 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.003>
- DUTRA, F.M., RIO, G.S., ZADINELO, I.V., BALLESTER, E.L.C. 2019. Exposure of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) post-larvae to different nitrate concentrations: Effect on performance and welfare. **Aquaculture**, Disponível online 5 de novembro de 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734674>

DUTRA, F.M., ALAB, J.H.C., GOMES, M.K.C., FURTADO, P.S., BALLESTER, E.L.C. 2020. Nitrate acute toxicity to post larvae and juveniles of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **Chemosphere**, Vol. 242, Mar 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125229>

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2017. **Figis Statical Query Results**. Version 2.11.4. Rome: FAO (2017). http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/8.5.16/figis/webapps/figis/temp/hqp_3430078895656574018.xml&outtype=html. (Acessado em 15 de maio de 2019).

FARIAS LIMA, J.DE, LOBO, E.T., BASTOS, A.M., DUARTE, S.S. 2019. Nitrate level safety to Amazon River shrimp juveniles. **Environmental Science and Pollution Research**, Dec 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-07033-6

FURTADO, P.S., CAMPOS, B.R., SERRA, F.P., KLOSTERHOFF, M., ROMANO, L.A., WASIELESKY JR., W. 2015. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). **Aquaculture International**, 23(1): 315-327, 2015. DOI:10.1007/s10499-014-9817-z

HAYD, L.A., LEMOS, D., VALENTI, W.C. 2014. Effects of Ambient Nitrite on Amazon River Prawn, *Macrobrachium amazonicum*, larvae. **Journal oh the World Aquaculture Society**, vol. 45, no. 1, Feb 2014. <https://doi.org/10.1111/jwas.12071>

KUHN, D.D.; SMITH, S.A.; BOARDMAN, G.D.; ANGIER, M.W.; MARSH, L.; FLICK JR, G.J. 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. **Aquaculture**, vol.309, p. 109-114, 2010. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.014

LIU, X., HUANG, M., BAO, S., TANG, W., FANG, T. 2020. Nitrate removal from low carbon-to-nitrogen ratio wastewater by combining iron-based chemical reduction and autotrophic denitrification. **Bioresource Technology**. Disponível online em 3 de janeiro de 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122731>

MACIEL, C.R., NEW, M.B., VALENTI, W.C. 2012. The Predation of artemia nauplii by the larvae of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), is affected by prey density, time of day, and ontogenetic development. **Journal of the World Aquaculture Society**, vol. 43, no. 5, p. 659-669. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00599.x>

MEIRELES, A.L., VALENTI, W.C., MANTELATTO, F.L. 2013. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 41(4): 718-731, 2013. DOI: 103856/vol41-issue4-fulltext-8.

MORAES-VALENTI, P.M.C.; VALENTI, W.C. (2010). Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR, Kutt MN (eds) **Freshwater prawns: biology and farming**. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 485–501.

MUIR, P.R., SUTTON, D.C., OWENS, L. 1991. Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. **Marine Biology**, 108: 67-71. 1991. <https://doi.org/10.1007/BF01313472>

- NEW, M.B., VALENTI, W.C., TIDWELL, J.H., D'ABRAMO, L.R., KUTTY, M.N. 2010. **Freshwater prawns biology and farming**. Wiley-Blackwell, Oxford. DOI: 10.1002/9781444314649.
- NÓBREGA, P.S.V., BENTES, BENTES, B., MARTINELLI-LEMOS, J.M. 2014. Population structure and relative growth of the Amazon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) on two islands in the fluvial-estuarine plain of the Brazilian Amazon. **Nauplius**, vol.22, no.1, Cruz das Almas Jan./June 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-64972014000100002>
- PEIG, J., GREEN, A.J. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. **Oikos**, 118, 1883-1861. DOI:10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x
- 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. DOI: 10.1080/10641262.2012.753404
- VITULE, J. R. S., PRODOCIMO, V. 2012. Introdução de espécies não nativas e invasões biológicas. Estudos de Biologia, **Ambiente Divers**, 2012 jul/dez, 34(83), 225-237. DOI: 10.7213/estud.biol.7335
- ZAR, J. H. 2010. **Biostatistical Analysis**. 5th ed., Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 944 p.