

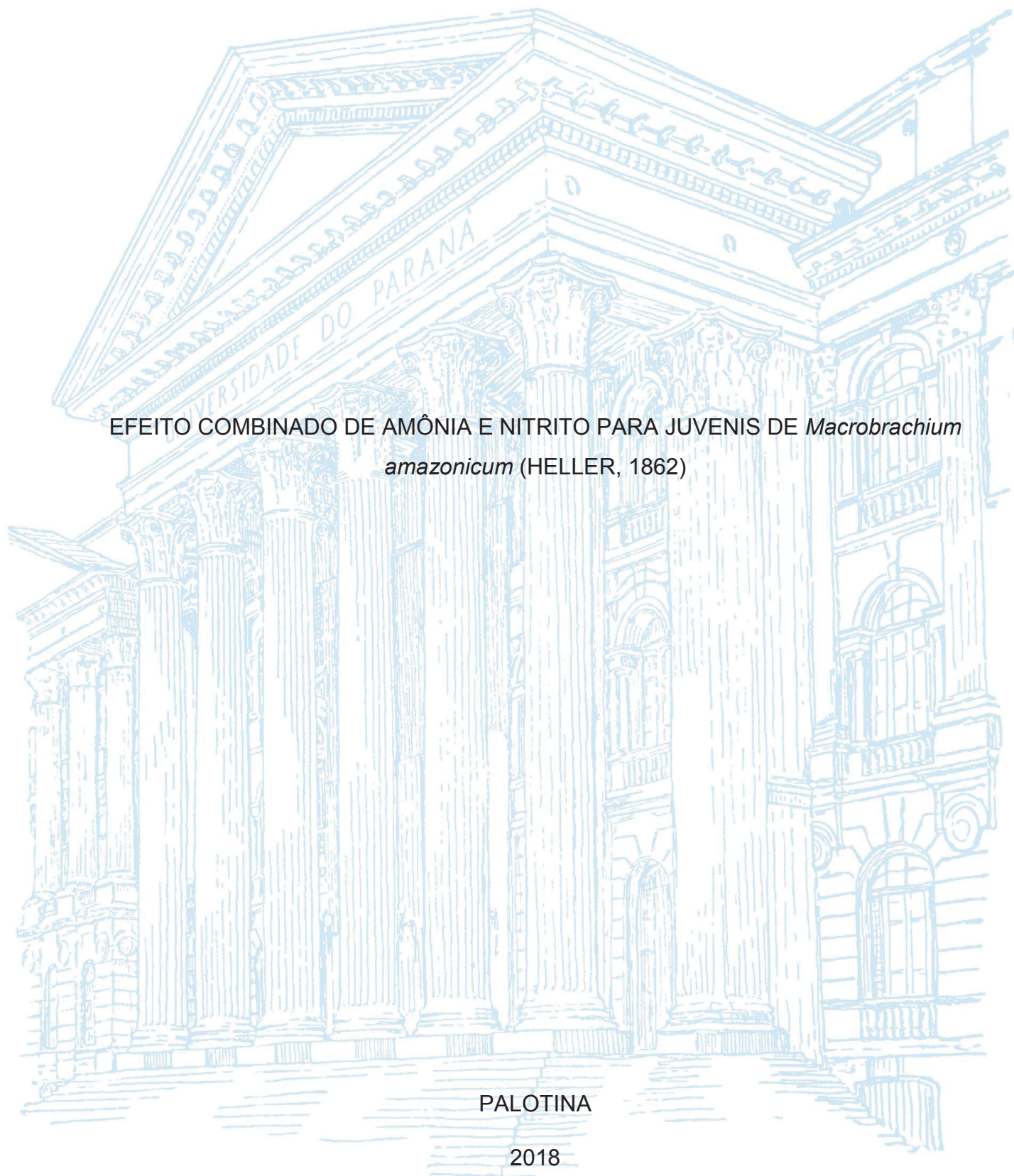
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA CAMELO BRAZÃO

EFEITO COMBINADO DE AMÔNIA E NITRITO PARA JUVENIS DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862)

PALOTINA

2018



CLAUDIA CAMELO BRAZÃO

EFEITO COMBINADO DE AMÔNIA E NITRITO PARA JUVENIS DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester

Coorientador: Dr. Fabrício Martins Dutra

PALOTINA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B827 Brazão, Claudia Caramelo
Efeito combinado de amônia e nitrito para juvenis de
Macrobrachium amazonicum (HELLER,1862)
/ Claudia Caramelo Brazão . – Palotina, 2018
85f.

Orientador: Eduardo Luis Cupertino Ballester.
Coorientador: Fabrício Martins Dutra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Aquicultura
e Desenvolvimento Sustentável.

1. Carcinicultura. 2. Compostos Nitrogenados.
3. Ecotoxicologia. I. Ballester, Eduardo Luis
Cupertino. II. Dutra, Fabrício Martins. III. Universidade
Federal do Paraná. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AQUICULTURA E
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CLAUDIA CAMELO BRAZÃO** intitulada: **EFEITO COMBINADO DE AMÔNIA E NITRITO PARA JUVENIS DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 26 de Abril de 2018.

EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALINE DE MARCO VIOTT
Avaliador Externo (UFPR)

PLÍNIO SCHMIDT FURTADO
Avaliador Externo (FURG)

Dedico este trabalho especialmente:
a meus pais, Oswaldo Gouvea
Brazão (*in memoriam*) e Vera Lucia
Caramelo Brazão e a minhas irmãs,
Paula Danielly Caramelo Brazão e
Flavia Caramelo Brazão. E meu
namorado Rafael Ortiz Kracizy.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo, pelo dom da vida.

Aos meus pais Oswaldo Gouvea Brazão (*in memoriam*) e Vera Lúcia Caramelo Brazão por serem meus primeiros professores, me ensinando o valor do estudo e do amor.

A minhas irmãs Flavia e Paula e a meu padrasto Ivo, por sempre me apoiarem.

A meu namorado Rafael Ortiz Kracizy por ser quem me dá forças 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 meus amigos que levo por toda a vida: Dagna Maria Laurindo da Silva, Julia Liebl, Aline Giombelli, Evelyny Calgaro, Estevan Silveira, Sandra Forneck, Rafaela Mocoichinski, Ana Paula Oliveira, Matheus Coelho, Alisson Dias e Dircelei Sponchiado pelo enorme carinho e apoio, e a todos os que acrescentaram de alguma forma na minha vida pessoal e acadêmica.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Carcinicultura da UFPR - Setor Palotina, pelo apoio.

A Universidade Federal do Paraná pelo apoio técnico-científico.

Ao professores Drs. Milton Rönnau e Aline de Marco Viott por toda a ajuda e disponibilidade prestada na realização das análises histológicas deste trabalho.

A banca avaliadora composta pelos professores Drs. Plínio Schmidt Furtado, Aline de Marco Viott e Milton Rönnau por terem aceitado participar na melhoria de meu trabalho de dissertação com suas sugestões e correções.

A meus orientadores Eduardo Luis Cupertino Ballester e Fabrício Martins Dutra, por toda a confiança, conhecimento e lições ganhas em todos esses anos trabalhando juntos e também pela amizade adquirida ao longo desse percurso.

RESUMO

O objetivo no presente trabalho foi avaliar o efeito combinado de amônia e nitrito sobre juvenis de *Macrobrachium amazonicum*, durante 96 h de exposição e calcular a dose letal (CL₅₀ de 96h) e o nível de segurança para estes compostos combinados. Foram utilizados 640 juvenis (6,3 ± 0,7 cm e 1,79 ± 0,60 g), com delineamento casualizado, em desenho fatorial 4x4, sendo combinadas quatro concentrações de amônia total (0; 11; 22 e 44 mg.L⁻¹) com quatro concentrações de nitrito (0; 1,5; 2,5 e 5 mg.L⁻¹), para cada combinação haviam quatro réplicas. Por meio do método probit foi calculada a CL₅₀ de 96h isolada para amônia total e nitrito que foram de 29,85 e 2,49 mg.L⁻¹, respectivamente. Já a CL₅₀ de 96h dos compostos combinados foi de 20,87 mg.L⁻¹ para amônia total e de 2,95 mg.L⁻¹ para nitrito. Os níveis de segurança isolados de amônia total e nitrito foram 2,98 e 0,25 mg.L⁻¹, enquanto para os tratamentos combinados o nível de segurança foi de 2,08 mg.L⁻¹ para amônia total e 0,29 mg.L⁻¹ para nitrito. Observou-se, por meio do cálculo da soma de aditividade e do índice de aditividade da mistura, que o efeito dos compostos combinados é 0,88 vezes menor do que a soma dos efeitos isolados, portanto um efeito antagônico. Da mesma forma, por meio da análise de alterações histológicas nas brânquias dos animais submetidos ao efeito de amônia e nitrito isolados e combinados, foi possível encontrar resultados que corroboram com os resultados encontrados para mortalidade, demonstrando assim que o efeito antagônico também foi observado nas brânquias.

Palavras-chave: Carcinicultura; Ecotoxicologia; Compostos nitrogenados; Brânquias; Alterações Histológicas.

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the combined effect of ammonia and nitrite on juveniles of *Macrobrachium amazonicum* for 96 h of exposure and to calculate the lethal dose (LC₅₀ of 96 h) and the safety level for these combined compounds. A total of 640 juveniles (6,3 ± 0,7 cm and 1,79 ± 0,60 g) were used, with a randomized design, in a 4x4 factorial design, with four concentrations of total ammonia (0, 11, 22 and 44 mg/l) with four concentrations of nitrite (0, 1.5, 2.5 and 5 mg/l), for each combination there were four replicates. By means of the probit method the LC₅₀ of 96h isolated for total ammonia and nitrite was calculated, which were 29.85 and 2.49 mg/l, respectively. The 96-hour LC₅₀ of the combined compounds was 20.87 mg/l for total ammonia and 2.95 mg/l for nitrite. The isolated safety levels of total ammonia and nitrite were 2.98 and 0.25 mg/l, while for the combined treatments the safety level was 2.08 mg/l for total ammonia and 0.29 mg/l for nitrite. We observed by calculating the sum of additivity and the additivity index of the mixture that the effect of the combined compounds is 0.88 times less than the sum of the isolated effects, thus an antagonistic effect. Likewise, through the analysis of histological changes in the gills of the animals submitted to the ammonia and nitrite effect isolated and combined, it was possible to find results that corroborate with the results found for mortality, thus demonstrating that the antagonistic effect was also observed in the gills.

Key-words: Shrimp farming; Ecotoxicology; Nitrogen Compounds; Gills; Histological Alteration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3	RESULTADOS	15
4	DISCUSSÃO.....	23
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS.....	27
	APENDICE 1.....	31

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura, ramo da aquicultura voltado à produção de camarões, alcançou em 2014 uma produção de aproximadamente 4,6 milhões de toneladas de camarões marinhos e 0,5 milhões de toneladas de camarões de água doce (FAO, 2018), demonstrando assim o grande potencial desta atividade. No Brasil, a produção comercial de camarões de água doce é pautada exclusivamente pela espécie *Macrobrachium rosenbergii* (FAO, 2010) que é um camarão exótico introduzido em 1977 para realização de estudos e que, em 1983, teve o primeiro laboratório comercial de produção de pós-larvas instalado (Valenti, 1998). Porém, quando trabalha-se com espécies exóticas existem grandes riscos ambientais devido escapes para o meio ambiente (Vitule & Prodocimo, 2017). Dentro deste contexto a produção de camarões nativos é encorajada em todo o mundo, a exemplo, o *Macrobrachium nipponense* obteve grande sucesso produtivo, e mesmo sendo somente produzido na China, ultrapassou a produção mundial do *M. rosenbergii* (FAO, 2018).

No Brasil existem espécies nativas do gênero *Macrobrachium* que possuem elevada importância econômica, a exemplo do *Macrobrachium amazonicum*, espécie de distribuição continental, sendo amplamente consumido pelas populações de baixa, média e alta renda na região amazônica (Bentes *et al.*, 2011). O camarão-da-amazônia é a espécie nativa de maior potencial econômico e produtivo por possuir rápido crescimento mesmo sem atingir grande porte (Bentes *et al.*, 2016). Porém, existem lacunas sobre a produção desta espécie que necessitam ser preenchidas, entre essas encontram-se as concentrações ideais das variáveis de qualidade de água, como dureza, alcalinidade, fósforo e pH.

Nos sistemas de produção de camarões, requisitos básicos devem ser atendidos em relação ao manejo alimentar e ao monitoramento e controle da qualidade de água, condições primordiais para alcançar bons índices de produtividade (De Queiroz, 2013). Durante a produção aquícola normalmente são ofertadas dietas com grandes porcentagens de proteína, onde parte é convertida em proteína animal e a outra parte, não assimilada é excretada principalmente na forma de amônia (Arana, 2010). O nitrito, por sua vez, é a forma intermediária no processo de nitrificação, no qual a amônia é oxidada por bactérias para nitrito, e logo após para nitrato (Gorsel; Jensen, 1999). Tanto nos sistemas de produção quanto em

ambientes aquáticos naturais, é possível encontrar compostos nitrogenados como amônia, nitrito e nitrato demonstrando assim a presença de processos biológicos ativos (Gorsel; Jensen, 1999; Weihrauch *et al.*, 1999). Desta forma, a realização de estudos que revelem o efeito desses compostos sobre organismos aquáticos é 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).

Segundo Colt e Armstrong (1981), em qualquer tipo de sistema aquático produtivo, a amônia pode causar problemas por sua toxidez. O camarão pode excretar parte da amônia por meio de difusão passiva realizada pelas brânquias, entretanto, quando a concentração do meio externo é maior que a concentração interna de amônia, o processo fisiológico pode ser prejudicado ou até mesmo totalmente interrompido, prejudicando as trocas gasosas, o equilíbrio osmótico e iônico (Arana, 2010). Dados recentes mostram que a CL₅₀ de 96 h para juvenis de *M. amazonicum* é de 21,6 mg.L⁻¹ de amônia total e 0,75 mg.L⁻¹ de amônia não ionizada (Dutra *et al.*, 2016a), enquanto para o *M. nipponense* observou-se uma CL₅₀ de 96 h de 13,3 mg.L⁻¹ de amônia total (Wang *et al.*, 2004). Da mesma forma, altos níveis de nitrito na água são potenciais fatores desencadeadores de estresse para organismos aquáticos (Lewis; Morris, 1986). Estudos sobre o efeito do nitrito para o camarão mostraram que um elevado nível deste composto pode retardar o crescimento e ocasionar a formação de metahemocianina, diminuindo o nível de oxihemocianina, impedindo a função respiratória do metabolismo, causando hipóxia nos tecidos ou ainda podendo afetar o equilíbrio ácido-base e a excreção de amônia, diminuindo a capacidade imunológica do animal, aumentando a suscetibilidade à infecção por bactérias e causando a morte em casos extremos (Chen; Cheng, 1995; Xian *et al.*, 2011). Chen e Lee (1997) encontraram uma CL₅₀ de 96 h de nitrito para juvenis de *M. rosenbergii* de 8,49 a 12,87 mg.L⁻¹, estudos com *M. amazonicum* apresentaram uma CL₅₀ de 96 h de 2,23 mg.L⁻¹ de nitrito (Dutra *et al.*, 2016b), sendo mais suscetível que o *M. rosebergii*.

Apesar de estudos sobre a CL₅₀ mostrarem dados seguros da concentração letal de amônia ou nitrito para a espécie, ainda pouco se sabe sobre o efeito combinado destes compostos. Segundo Rand *et al.* (1995) várias definições ou conceitos são importantes a respeito do efeito combinado dos compostos, como o

efeito sinérgico que ocorre quando um efeito combinado de dois contaminantes é maior do que a soma dos efeitos dos contaminantes isolados, ou o efeito antagônico que é determinado quando dois contaminantes, em conjunto, sofrem redução de seu potencial toxicológico por interferências de um sobre o outro e ainda o efeito aditivo representado quando o efeito combinado de dois contaminantes é igual à soma dos efeitos isolados desses contaminantes. Um exemplo disto pode ser encontrado no estudo de Chen e Chin (1988), realizado com pós-larvas de *Penaeus monodon*, onde no estudo a amônia não ionizada e o nitrito quando combinados, mesmo que em menores concentrações, foram mais letais do que quando isolados, demonstrando um sinergismo.

Além disso, a exposição à amônia e ao nitrito podem causar danos à brânquias de camarões, em um experimento realizado por Dutra *et al.* (2017) com camarões expostos a amônia e nitrito, separadamente, durante 96 h, foi possível detectar a presença de alterações histológicas nas brânquias de *M. amazonicum*, e pontua-las de acordo com o índice de órgão (*Iorg*), adaptado de Bernet *et al.* (1999), auxiliando no entendimento de mortalidades causadas pela exposição aos agente toxicológicos. As alterações encontradas foram aglomeração de hemócitos, espessamento lamelar, espessamento do epitélio lamelar, fusão lamelar, edema, necrose, descamação da cutícula lamelar, hiperplasia e infiltração de hemócitos. Portanto, a realização de uma avaliação histológica, pode contribuir trazendo maior confiabilidade aos resultados obtidos em trabalhos de efeito toxico para esses compostos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito combinado de amônia e nitrito e compará-los com o efeito isolado para juvenis de *M. amazonicum* durante 96 h de exposição e calcular a dose letal (CL₅₀ de 96h) e o nível de segurança para estes compostos combinados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi conduzido no Laboratório de Carcinicultura, localizado na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (UFPR). A metodologia utilizada na avaliação do efeito toxicológico dos compostos foi realizada conforme descrito por Pelter e Weber (1985) para CL₅₀ em 96 h. Nos bioensaios foram utilizados 640 juvenis (6,3 ± 0,7 cm e 1,79 ± 0,60 g) de *M. amazonicum*, em jejum prévio de 24 h, estocados em 64 unidades experimentais de 10 L, onde os

animais foram, ainda, alojados, individualmente, em subunidades plásticas de aproximadamente 400 mL perfuradas, para evitar o canibalismo. Foi instalada uma pedra porosa por unidade experimental, para que os níveis de oxigênio fossem mantidos na faixa adequada para a espécie, o fotoperíodo utilizado foi de 12:12 (claro:escuro). O delineamento foi casualizado, em desenho fatorial 4x4, sendo combinadas quatro concentrações de amônia total (0; 11; 22 e 44 mg.L⁻¹) com quatro concentrações de nitrito (0; 1,5; 2,5 e 5 mg.L⁻¹), para cada combinação haviam quatro réplicas. As concentrações utilizadas para a realização dos testes foram baseadas na CL₅₀ de 96 h para amônia total e nitrito encontradas por Dutra *et al.*, (2016a; 2016b), sendo utilizadas aproximadamente metade, o dobro e a CL₅₀ de cada composto.

A concentração de amônia total foi obtida por meio de uma solução estoque de 1.000 mg.L⁻¹ de amônia total, diluindo 3,819 g.L⁻¹ de cloreto de amônio P.A. em água ultra pura e em seguida diluída em água do abastecimento público, previamente desclorada, de forma a obter-se as concentrações estipuladas para o experimento. A concentração de nitrito foi obtida por meio de uma solução estoque de 250 mg.L⁻¹, diluindo 1,232 g.L⁻¹ de nitrito de sódio P.A. em água ultra pura e em seguida realizado o mesmo procedimento já citado para a diluição da amônia total.

Os animais foram observados a cada hora, durante as oito primeiras horas do experimento. Após esse período, até o término das 96 h as observações passaram a ser realizadas a cada 2 h com informações agrupadas a cada 12 h. O critério para avaliação da mortalidade foi à ausência de qualquer tipo de movimento ou reação a estímulo mecânico com bastão de vidro.

As variáveis de qualidade da água, oxigênio dissolvido (Oxímetro, ALFAKIT, AT 160), temperatura (Termômetro, digital Inconterm) e pH (pHmetro, Luca, 210) foram avaliadas diariamente. No início e final do experimento foram avaliados nitrito pelo método colorimétrico da reação de Griess (Baumgarten, 1996), amônia total pelo método colorimétrico indofenol (Koroleff, 1976), alcalinidade e dureza por titulação seguindo a metodologia proposta por Macêdo (2003).

Para a determinação do efeito combinado de amônia e nitrito, foi utilizado o modelo descrito por Zagatto e Bertolotti (2008), para avaliar a interação de substâncias. O modelo expressa (Equação 1) a soma da aditividade para diferentes substâncias (S) e o índice de aditividade (IA), como descritos a seguir:

Equação 1 - Soma da aditividade das substâncias

$$S = \left(\frac{Am}{Ai} \right) + \left(\frac{Bm}{Bi} \right)$$

Em que:

S= a soma da aditividade, sendo que através dela é possível determinar o efeito conjunto da mistura;

Am= concentração da substância A na mistura que causa 50% de efeito;

Bm= concentração da substância B na mistura que causa 50% de efeito;

Ai= concentração da substância A que, isolada, provoca 50% de efeito (CL₅₀ da substância A);

Bi= concentração da substância B que, isolada, provoca 50% de efeito (CL₅₀ da substância B).

Portanto através de S foi possível determinar o efeito interativo das substâncias, caracterizado por:

S>1, o efeito da mistura é menos que aditivo;

S=1, o efeito é aditivo;

S<1, o efeito é mais que aditivo.

Quando S fosse > ou < que 1, era então aplicado ao índice de aditividade (IA), onde por meio desse torna-se possível estimar quantas vezes o efeito combinado é maior ou menor que o efeito isolado.

Índice de aditividade (IA) da mistura de substâncias:

Se S é > 1 ↔ IA = S (-1) + 1S

Se S é < 1 ↔ IA = 1/S - 1

As variáveis de qualidade de água foram determinadas independentemente para cada tratamento e réplica, a fim de estabelecer se essas se mantiveram em níveis adequados para a biologia da espécie.

Os dados individuais das réplicas foram agrupados por tratamento para a determinação do efeito isolado e combinado, sendo submetidos à avaliação da normalidade da distribuição dos dados e homocedasticidade de suas variâncias. Construiu-se um gráfico de dispersão entre a concentração teste dos compostos (mg.L⁻¹) e a mortalidade cumulativa para juvenis, separadamente por tratamentos.

Para a determinação da CL₅₀ foi utilizado o modelo matemático probit (Ferraz *et al.*, 2009).

Para análise histológicas das brânquias, os animais foram coletados em todos os tratamentos e repetições somente quando apresentavam natação errática, sendo utilizados um total de 6 animais por réplica. Os camarões foram insensibilizados por termonarcose (Ashley, 2007) e seu cefalotórax seccionado e fixado em solução de ALFAC (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner; Bell, 1998) por 48 h e posteriormente, as brânquias foram extraídas do cefalotórax e fixados em álcool 70% novamente.

Para a confecção das lâminas histológicas, as brânquias foram colocadas em cassetes histológicos envoltas em papel filtro e mergulhadas em uma bateria crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e absoluto I e II), diafanizados em xilol (I e II) e impregnados em parafina histológica (I e II) a 56°C, com duração de 40 minutos cada banho. Em seguida as brânquias foram inseridas em moldes histológicos e cobertos por parafina para a confecção dos blocos histológicos. Após a inclusão das peças e modelagem dos blocos em parafina, os tecidos foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo. As secções obtidas foram distendidas em água, colocadas sobre lâminas embebidas em albumina de Mayer e levadas para remoção do excesso de parafina em estufa a 60°C por 12 h. Logo após, os cortes foram submetidos à rotina de coloração por Hematoxilina/Eosina (HE) (Bancroft; Gamble, 2008). As imagens histológicas das brânquias foram capturadas por microscópio equipado com câmera digital e visualizadas em Software de imagem (Leica DM 1000).

As alterações nas estruturas das brânquias foram avaliadas de acordo com o Índice do Órgão (*Iorg*), adaptado de (Bernet *et al.*, 1999), como já realizado anteriormente para brânquias de invertebrados (Costa *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2017). As alterações foram classificadas de acordo com o padrão de reação, onde, para cada padrão de reação encontrado na histologia branquial foi atribuído um fator de importância (*w*). Quando as alterações foram semelhantes ao fixado por Bernet *et al.* (1999), este foi utilizado. Quando diferentes alterações foram encontradas, estas foram avaliadas de acordo com a literatura em relação aos danos provocados, sendo atribuído a ela um valor condizente. Portanto, o valor atribuído para cada alteração dentro de seu padrão de reação foi denominado o fator de importância (*w*), onde foi levado em conta o grau de reversibilidade, sendo então: “1” = alterações

facilmente reversíveis; “2” = alterações moderadas, reversíveis com o fim da exposição e “3” = alterações irreversíveis, com perda parcial ou total da função do órgão.

Os valores de pontuação das alterações (a) foram determinados conforme a ocorrência da alteração no órgão afetado, onde: “0” = sem ocorrência; “1-2” = baixa ocorrência; “3-4” ocorrência moderada e “5-6” = ocorrência severa (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de lesões para crustáceos, adaptado pode Bernet *et al.* (1999)

Padrão de reação	Características da reação	Descrição	Alteração	Fator (w)
1	Distúrbios hemocíticos	Condição patológica de fluxo da hemolinfa e fluidos dos tecidos	Aglomerção de hemócitos	1
			Espessamento da lamela Espessamento do epitélio lamelar	1 1
2	Danos regressivos	Condição patológica que apresenta redução funcional ou perda de um órgão e/ou estrutura	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

Fonte: Dutra *et al.* (2017)

Os resultados obtidos na análise de brânquias, foram submetidos aos pressupostos de normalidade e homogeneidade (Sokal; Rohlf, 2012); quando não

foram atendidos estes pressupostos, os dados foram matematicamente transformados até seu enquadramento. Posteriormente, foram submetidos à análises de variância (One-Way ANOVA) e posteriormente submetidos ao teste de Tukey ($\alpha= 0,05$).

3 RESULTADOS

As análises das variáveis de qualidade de água foram aferidas e agrupadas por tratamentos e depois foram obtidas suas médias onde os valores encontrados para nitrito e amônia, corresponderam à diluição das soluções estoque destes compostos. Os valores de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, dureza e alcalinidade estiveram dentro do recomendado para a produção de camarões de água doce (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médio (\pm DP) encontrados e recomendados das variáveis de qualidade de água para juvenis de *Macrobrachium amazonicum* expostos a amônia total e nitrito durante 96 h.

Tratamento		Análises das variáveis de qualidade de água						
Amônia total (mg.L ⁻¹)*	Nitrito (mg.L ⁻¹)*	Amônia total (mg.L ⁻¹)**	Nitrito (mg.L ⁻¹)**	Temperatura (°C)	pH	OD (mg.L ⁻¹)	Dureza (mg.L ⁻¹)	Alcalinidade (mg.L ⁻¹)
0	0	0,48 \pm 0,24	0,01 \pm 0,01	24,10 \pm 0,76	8,13 \pm 0,07	8,64 \pm 0,29	19,00 \pm 2,65	85,25 \pm 3,10
11	0	10,16 \pm 1,34	0,10 \pm 0,11	24,38 \pm 0,53	8,08 \pm 0,05	8,67 \pm 0,32	19,33 \pm 4,93	74,50 \pm 4,43
22	0	24,66 \pm 1,44	0,04 \pm 0,03	24,34 \pm 0,53	8,00 \pm 0,08	8,59 \pm 0,30	17,33 \pm 4,93	64,75 \pm 3,30
44	0	42,85 \pm 5,29	0,01 \pm 0,01	24,26 \pm 0,63	7,94 \pm 0,06	8,59 \pm 0,35	19,33 \pm 2,51	60,75 \pm 6,18
0	1,5	0,98 \pm 0,24	1,02 \pm 0,04	24,24 \pm 0,65	8,13 \pm 0,08	8,52 \pm 0,29	25,33 \pm 1,15	98,75 \pm 11,84
0	2,5	1,26 \pm 0,32	2,16 \pm 0,14	24,21 \pm 0,69	8,19 \pm 0,07	8,61 \pm 0,25	24,00 \pm 1,00	98,50 \pm 6,61
0	5	0,20 \pm 0,05	5,39 \pm 0,04	23,43 \pm 0,11	8,04 \pm 0,04	8,23 \pm 0,17	25,67 \pm 2,52	88,75 \pm 4,42
11	1,5	11,91 \pm 0,85	1,47 \pm 0,05	24,22 \pm 0,74	8,04 \pm 0,07	8,59 \pm 0,52	19,00 \pm 2,00	71,75 \pm 9,39
11	2,5	10,46 \pm 2,37	2,34 \pm 0,05	23,89 \pm 0,52	8,15 \pm 0,05	7,78 \pm 0,36	36,33 \pm 6,11	69,50 \pm 10,15
11	5	10,42 \pm 0,60	5,05 \pm 0,28	23,72 \pm 0,65	8,06 \pm 0,05	7,77 \pm 0,22	26,67 \pm 4,04	72,50 \pm 9,46
22	1,5	20,30 \pm 2,56	1,54 \pm 0,37	23,72 \pm 0,64	8,14 \pm 0,07	7,79 \pm 0,42	20,00 \pm 5,00	76,50 \pm 10,66
22	2,5	19,52 \pm 2,90	2,23 \pm 0,10	23,78 \pm 0,56	8,12 \pm 0,07	7,81 \pm 0,45	22,67 \pm 5,51	70,25 \pm 13,89
22	5	21,52 \pm 4,36	4,82 \pm 0,25	23,75 \pm 0,65	8,08 \pm 0,04	7,89 \pm 0,37	31,33 \pm 8,08	70,50 \pm 4,20
44	1,5	43,95 \pm 8,00	1,35 \pm 0,05	23,82 \pm 0,58	8,17 \pm 0,05	7,80 \pm 0,43	21,33 \pm 8,08	71,50 \pm 12,40
44	2,5	40,88 \pm 5,57	2,28 \pm 0,09	23,74 \pm 0,70	8,15 \pm 0,06	7,81 \pm 0,41	22,67 \pm 1,52	68,25 \pm 8,85
44	5	40,15 \pm 5,42	5,09 \pm 0,21	23,69 \pm 0,72	8,10 \pm 0,06	7,91 \pm 0,39	27,67 \pm 3,05	73,33 \pm 8,04
Valor recomendado*		---	---	22 a 31 ^a	7,4 a 8,4 ^a	4,6 a 6,1 ^a	20 a 200 ^b	20 a 60 ^c

(*) Valores estipulados para o teste de toxicidade; (**) Valores encontrados; (a) Sampaio et al. (2007); (b) Vasquez et al., (2007) e (c) New (2002).
Fonte: O autor (2018)

As mortalidades observadas durante as 96 h de experimento (Tabela 3), apresentam decréscimo nos tratamentos combinados, exceto para os tratamentos que continham 5 mg.L⁻¹ de nitrito, onde foram registradas mortalidades acima de 98%. Os tratamentos com concentração isolado apresentaram mortalidades acima de 70% para 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito e 44 mg.L⁻¹ de amônia.

Tabela 3 - Valores médios (\pm D.P) de mortalidade (%) do efeito isolado e combinado de amônia e nitrito para juvenis de *Macrobrachium amazonicum*

		Nitrito (mg.L ⁻¹)			
		0	1,5	2,5	5
Amônia (mg.L ⁻¹)	%				
	0	0 \pm 0	5 \pm 6	70 \pm 8	100
	11	0 \pm 0	0 \pm 0	5 \pm 1	100
	22	0 \pm 0	5 \pm 6	3 \pm 5	98 \pm 5
	44	88 \pm 13	0 \pm 0	13 \pm 19	98 \pm 5

Fonte: O autor (2018)

As concentrações de amônia e nitrito foram avaliadas tanto isoladamente quanto combinados (amônia x nitrito). Por meio do modelo matemático proibit, que correlaciona as concentrações dos compostos com a mortalidade acumulada observada nos tratamentos foi calculada a CL₅₀ de 96h isolada para amônia total e nitrito que foram de 29,85 e 2,49 mg.L⁻¹, respectivamente. Já a CL₅₀ de 96h dos compostos combinadas foi de 20,87 mg.L⁻¹ para amônia total e de 2,95 mg.L⁻¹ para nitrito. Os níveis de segurança isolados de amônia total e nitrito foram 2,98 e 0,25 mg.L⁻¹, enquanto para os tratamentos combinados o nível de segurança foi de 2,08 mg.L⁻¹ para amônia total e 0,29 mg.L⁻¹ para nitrito (Figura 1).

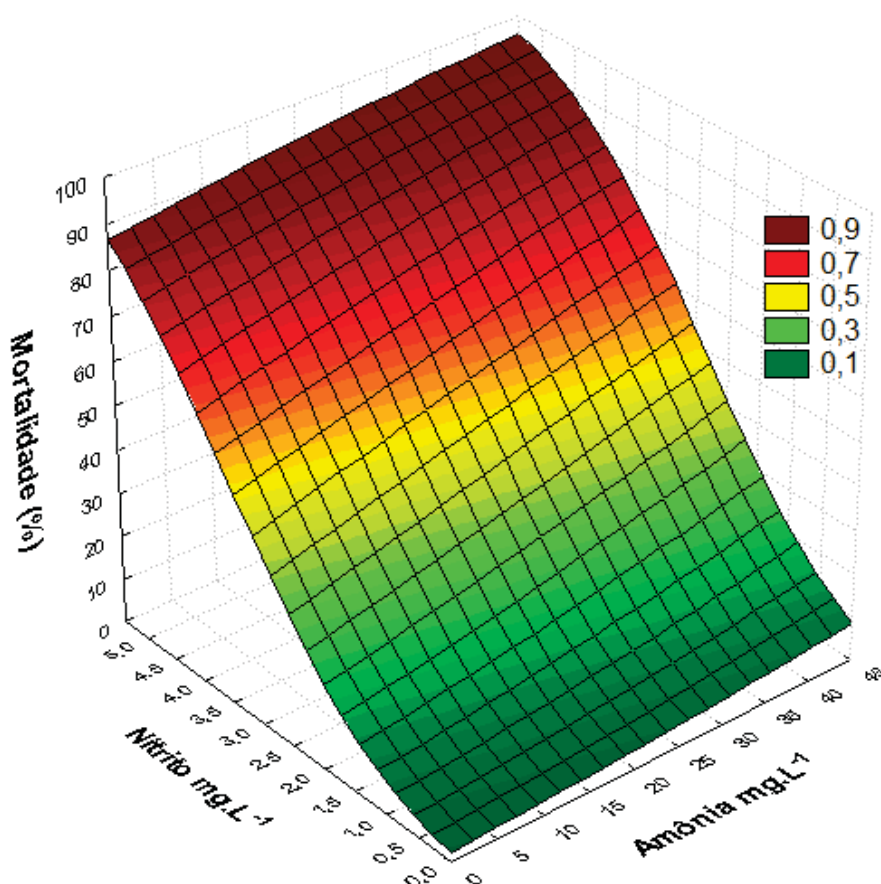
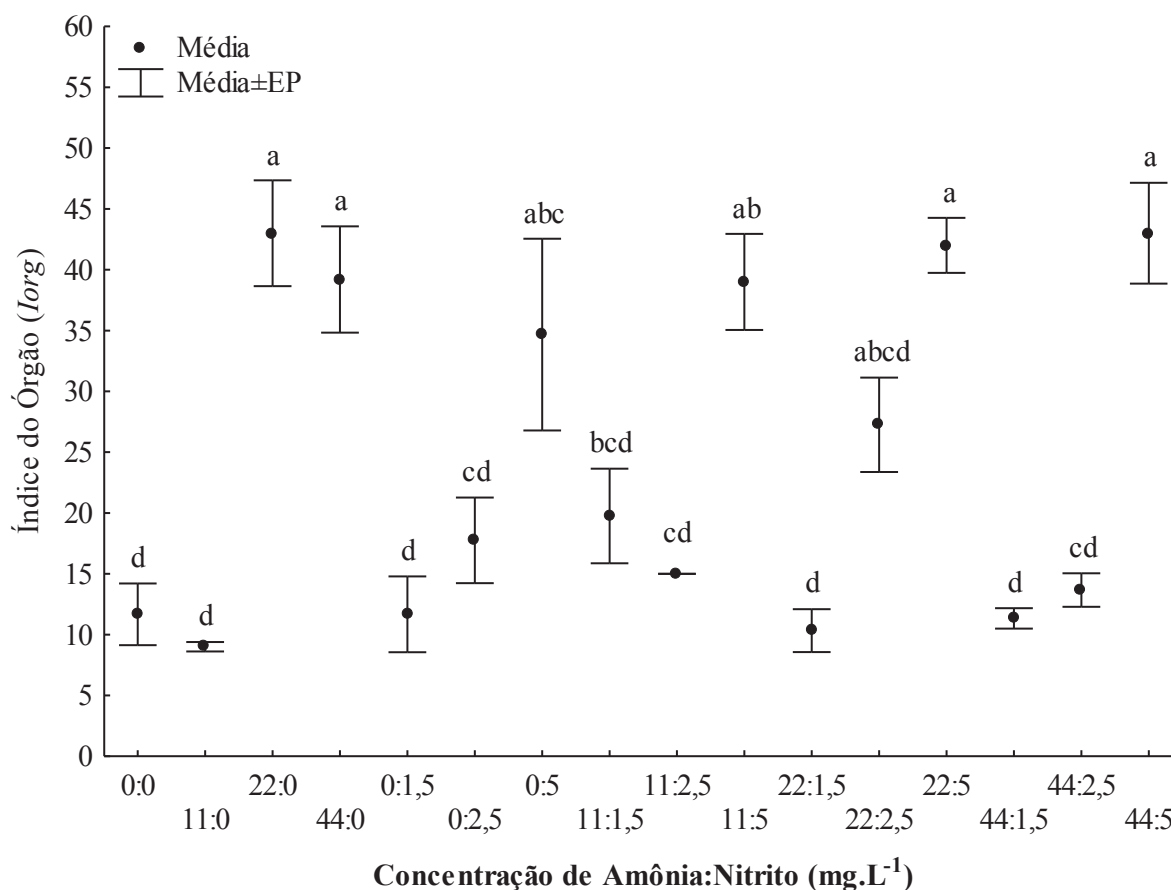


Figura 1 - Regressão quadrática tridimensional da CL_{50} para juvenis de *Macrobrachium amazonicum* após 96 h de exposição a amônia e nitrito isolados e combinados.
Fonte: O autor (2018)

Observou-se por meio do cálculo da soma de aditividade e do índice de aditividade da mistura, que o efeito dos compostos combinados é 0,88 vezes menor do que a soma dos efeitos isolados. Quanto a análise de alterações histológicas nas brânquias dos animais submetidos ao efeito de amônia e nitrito isolados e combinados, foi possível encontrar resultados que corroboram com os resultados encontrados para mortalidade, demonstrando assim que o efeito antagônico também esteve presente para as brânquias (Figura 2).

Figura 2 - Índice de Órgão (Média±E.P) de juvenis de *Macrobrachium amazonicum* submetidos a concentrações isoladas e combinadas de amônia e nitrito durante 96 h.



Fonte: O autor (2018)

Observou-se que quando as concentrações de amônia e nitrito foram combinadas, houve a redução do dano causado à brânquia se comparado com a exposição dos compostos isolados. Isto pode ser observado nas figuras 3, 4 e 5, onde os tratamentos de 1,5 e 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito com as concentração de 11; 22 e 44 mg.L⁻¹ de amônia total reduziram o dano causado a brânquia em relação aos tratamentos de concentrações de 22 e 44 mg.L⁻¹ de amônia isoladamente. Entretanto, o acréscimo da concentração de nitrito (5 mg.L⁻¹) independente da concentração de amônia provocou aumento de danos nas brânquias.

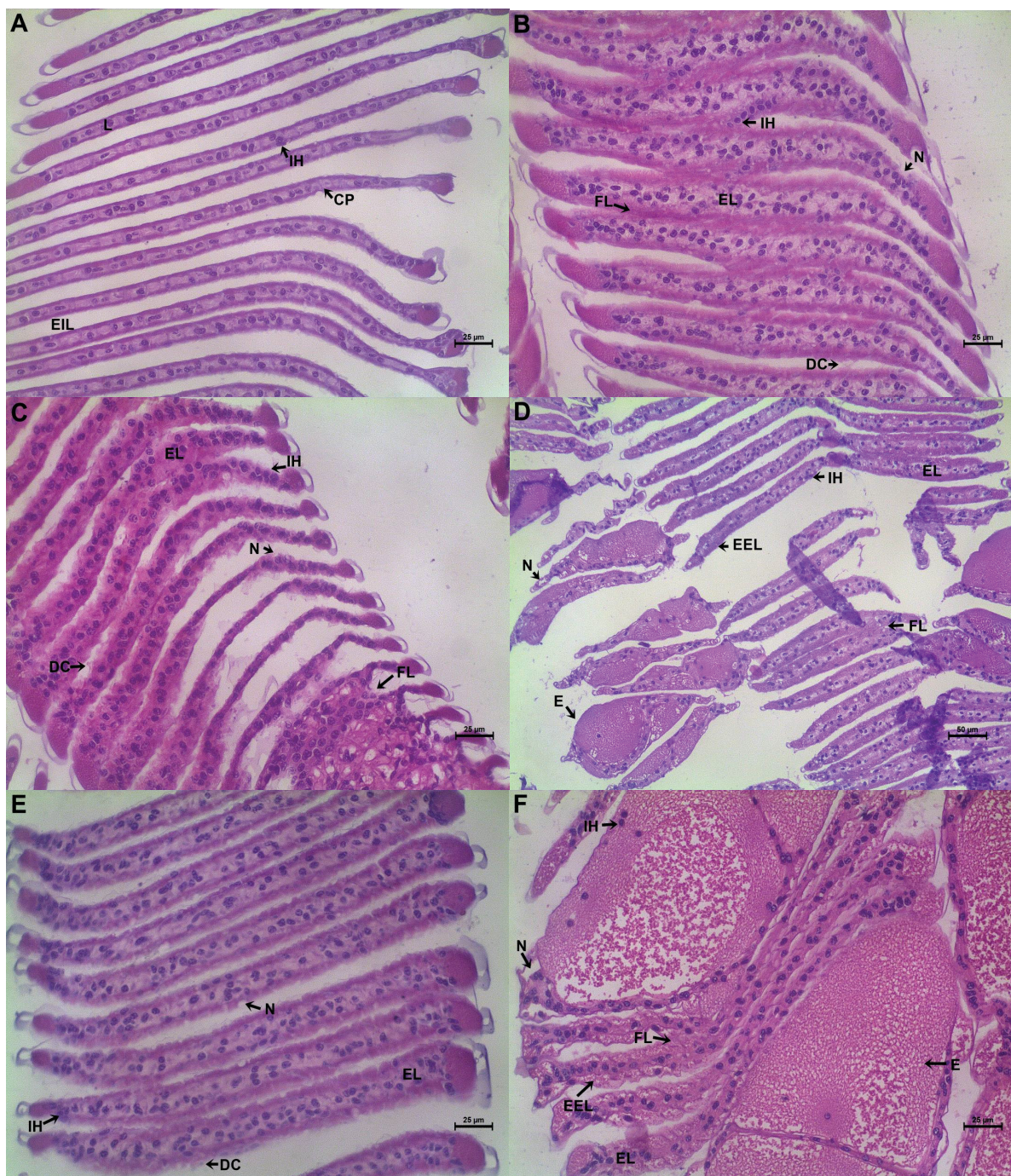


Figura 3 - Aspecto microscópico de brânquias de juvenis de *Macrobrachium amazonicum* expostos à concentrações de amônia e nitrito durante 96 h. Lamela (L); Espaço inter lamelar (EIL); Células pilares (CP); Degeneração vacuolar (DV); Infiltração hemocítica (IH); Necrose (N); Fusão lamelar (FL); Espessamento lamelar (EL); Descamação da cutícula (DC); Espessamento do epitélio lamelar (EEL); Edema (E); A) Brânquia sem exposição a concentrações de nitrogenados (controle) (20x, 10x H&E). B) Brânquia expostas a 11 mg.L⁻¹ de amônia total (20x, 10x H&E). C) Brânquia exposta a 22 mg.L⁻¹ de amônia total (20x, 10x H&E). D) Brânquia exposta a 44 mg.L⁻¹ de amônia total (10x, 10x H&E). E) Brânquia submetida a 1,5 mg.L⁻¹ de nitrito. F) Brânquia submetida a 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E).

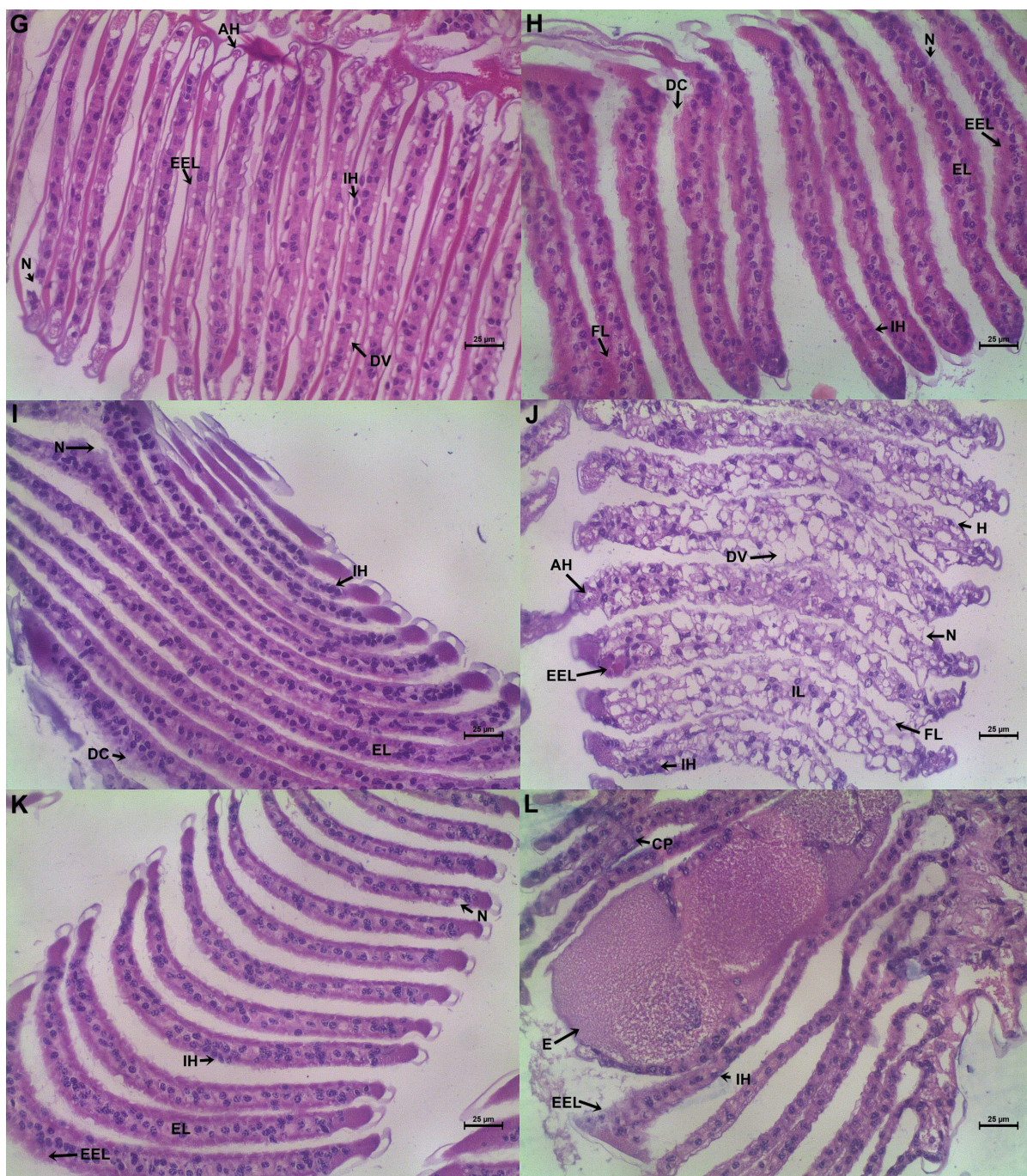


Figura 4 - Aspecto microscópico de brânquias de juvenis de *Macrobrachium amazonicum* expostos à concentrações de amônia e nitrito durante 96 h. Células pilares (CP); Degeneração vacuolar (DV); Infiltração hemocítica (IH); Necrose (N); Fusão lamelar (FL); Descamação da cutícula (DC); Espessamento do epitélio lamelar (EEL); Edema (E); Aglomerado hemocítico (AH); Hiperplasia (H). G) Brânquia exposta a concentração de 5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E). H) Brânquia exposta a 11 mg.L⁻¹ de amônia total com 1,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E). I) Brânquia exposta a 11 mg.L⁻¹ de amônia total com 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E). J) Brânquia exposta a 11 mg.L⁻¹ de amônia total com 5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E). K) Brânquia exposta a 22 mg.L⁻¹ de amônia total com 1,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, H&E). L) Brânquia exposta a 22 mg.L⁻¹ de amônia total com 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E).

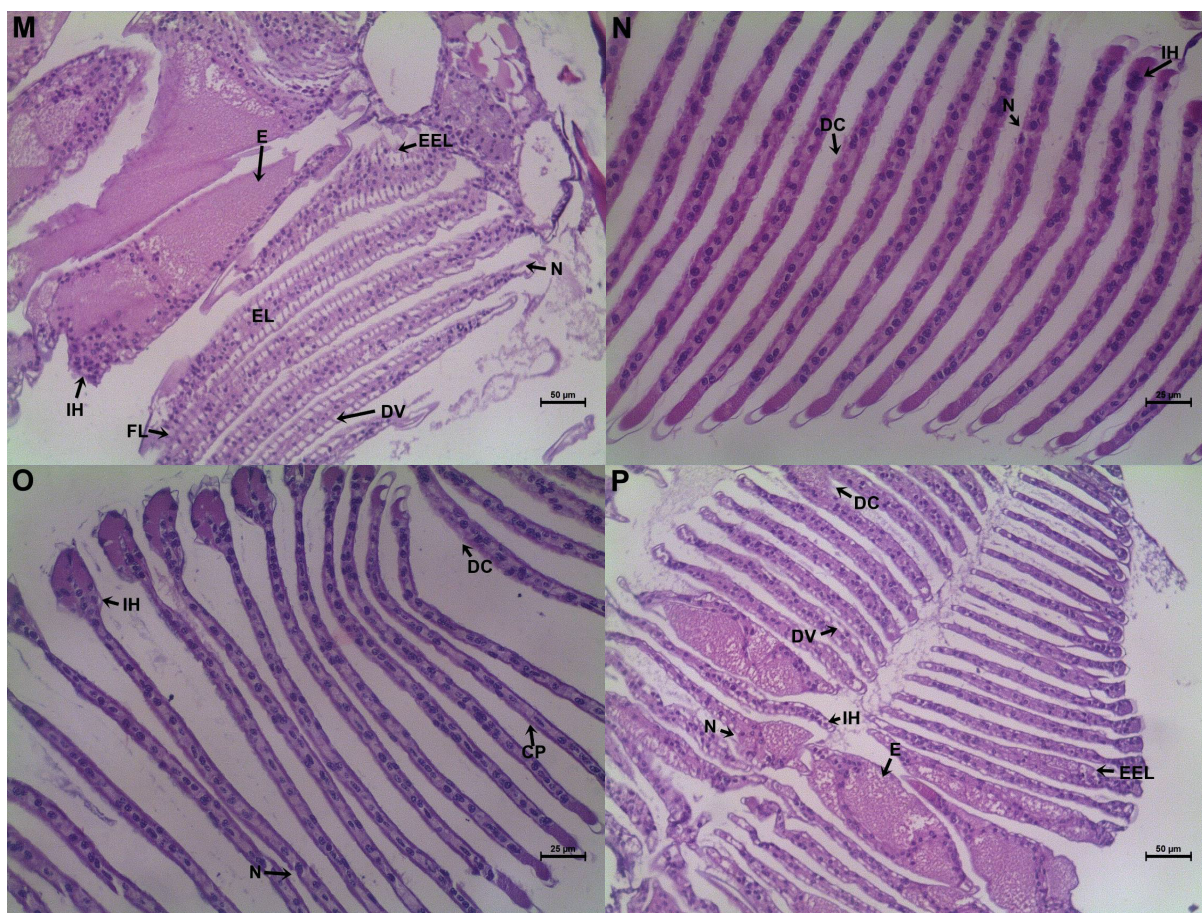


Figura 5 - Aspecto microscópico de brânquias de juvenis de *Macrobrachium amazonicum* expostos à concentrações de amônia e nitrito durante 96 h. Células pilares (CP); Degeneração vacuolar (DV); Infiltração hemocítica (IH); Necrose (N); Fusão lamelar (FL); Espessamento lamelar (EL); Descamação da cutícula (DC); Espessamento do epitélio lamelar (EEL); Edema (E); M) Brânquia exposta a concentração de 22 mg.L⁻¹ de amônia total com 5 mg.L⁻¹ de nitrito (10x, 10x H&E). N) Brânquia exposta a 44 mg.L⁻¹ de amônia total com 1,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E). O) Brânquia exposta a 44 mg.L⁻¹ de amônia total com 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito (20x, 10x H&E). P) Brânquia exposta a 44 mg.L⁻¹ de amônia total com 5 mg.L⁻¹ de nitrito (10x, 10x H&E).

No tratamento controle (sem adição de compostos nitrogenados) foram encontradas alterações em pequenas quantidades por lesões de danos regressivos como espessamento lamelar e lesões de inflamação como infiltrações de hemócitos.

Os danos encontrados nas brânquias dos animais submetidos aos compostos isoladamente nas menores e nas maiores concentrações de amônia total e para todas as concentrações isoladas de nitrito, demonstraram um aumento de danos proporcional em relação a mortalidade e a concentração dos compostos, porém quando observado o resultado do tratamento com concentração intermediária de amônia isolada (22 mg.L⁻¹ de amônia total) foram encontrados níveis altos de danos no *lorg*, porém não foram observadas mortalidades nesse tratamento, pois, os danos encontrados eram reversíveis de baixo valor do fator de importância, porém em grandes quantidades.

Os tratamentos com concentrações de 1,5 e 2,5 mg.L⁻¹ de nitrito combinado com todas as concentrações de amônia total apresentaram redução nos danos quando comparados com os danos encontrados nas concentrações dos compostos isoladas. Os danos encontrados foram espessamento lamelar, fusão lamelar, necrose, descamação da cutícula lamelar e infiltração de hemócitos. Apesar da necrose e da descamação da cutícula apresentar alto valor de fator de importância. Estes apresentaram baixa ocorrência. A concentração com 5 mg.L⁻¹ de nitrito, mesmo que combinada à amônia total, não apresentou redução nos danos causados a brânquias, apresentando grande quantidade de lesões na brânquia, entre elas estão espessamento lamelar, fusão lamelar, edema, necrose, descamação da cutícula lamelar e infiltração de hemócitos, além de apresentar grave degeneração vacuolar, característica que foi exclusiva a esses tratamento. Todavia os resultados encontrados em *log* dos tratamentos combinados condizem com as mortalidades encontradas no teste de CL₅₀ de 96h.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo para CL₅₀ de 96h de amônia total isoladamente foram maiores que os dados encontrados por Dutra *et al.* (2016a) para juvenis de *M. amazonicum* expostos a diferentes níveis de amônia, vemos que a Cl₅₀ aqui encontrada teve um acréscimo, passando de 21,6 para 29,8 mg.L⁻¹. Esta diferença pode ser explicada devido à diferença na temperatura média em que foram conduzidos os experimentos pois no presente estudo a temperatura foi inferior àquela na qual foi conduzido o experimento de Dutra et al. (2016). Este resultado corrobora com o afirmado por Arana (2010), que menciona que a toxicidade de amônia aumenta com o aumento da temperatura devido o acréscimo de NH₃.

Em relação ao efeito combinado dos compostos avaliados, os resultados encontrados no presente estudo permitiram observar que, quando amônia total e nitrito encontram-se em conjunto no ambiente, estes se tornam menos tóxicos (efeito antagônico), para juvenis de *M. amazonicum*, que quando comparados com os efeitos dos compostos isolados, exceto para os tratamentos que continham 5 mg.L⁻¹ de nitrito. Assim como no trabalho desenvolvido por Dutra *et al.* (2016b), juvenis de *M. amazonicum* também apresentaram maior vulnerabilidade a altas concentrações de nitrito obtendo uma mortalidade de 95 ± 1% (±DP) para concentrações isoladas de 4 mg.L⁻¹ de nitrito após 96 h de exposição.

Em trabalhos anteriores o efeito antagônico também pôde ser observado, como em um experimento realizado por Schuler *et al.* (2010), onde foi avaliado o efeito combinado de amônia e nitrito para pós-larvas de *L. vannamei*, observando-se que o nível mínimo de amônia, que causou mortalidades isoladamente no experimento, quando combinado com as diferentes concentrações de nitrito, causou uma diminuição do efeito interativo da mistura, aumentando a CL₅₀ encontrada de nitrito de 153,75 para 163,3 mg.L⁻¹. Todavia, o efeito interativo dos compostos pode alterar-se de acordo com o tempo de exposição. Em trabalhos realizados por Alcaraz *et al.* (1999), o efeito da exposição combinada à amônia e nitrito em pós-larvas de *Penaeus setiferus*, em 24 h de exposição foi equivalente ao efeito isolado, enquanto para 48 e 72 h de exposição foi possível observar um efeito sinérgico e um efeito antagônico respectivamente. Diferenças de efeito de acordo com a duração do teste, também foram relatadas por Chen e Chin (1988) em um trabalho realizado com amônia e nitrito para pós-larvas de *P. monodon*, sendo antagônico para 48 e 72 h, porém sinérgico em 96 h.

No trabalho realizado por Zhang *et al.* (2015), que avaliou o efeito combinado de amônia e nitrito para adultos de *M. rosenbergii*, a partir do estresse oxidativo e apoptose de hemócitos, foi encontrado tanto na produção de óxido nítrico (ON), quanto nos índices apoptóticos uma diminuição significativa, demonstrando uma diminuição da necessidade de resposta enzimática causada por meio da presença de agentes estressores, quando os tratamentos foram combinados com concentrações de amônia total a partir de 25 mg.L⁻¹. Segundo os mesmos autores, os efeitos de nitrito e amônia total combinados também causam menores alterações fisiológicas, podendo ser explicado pela interação do nitrito com alguns íons cloretos, como o cloreto de amônio, diminuindo seu efeito tóxico através da ligação de radicais livres de cloreto fazendo com que os compostos entrem em uma conformação dificilmente absorvida pelas brânquias.

Em um recente trabalho realizado por Dutra *et al.* (2017) foram avaliados os danos da exposição de amônia e nitrito isoladamente em brânquias de juvenis de *M. amazonicum*, encontrou-se um padrão de aumento na gravidade e ocorrência dos danos nas brânquias com o aumento das concentrações dos compostos, entretanto, tratamentos com nitrito causaram altos níveis de danos também em concentrações intermediárias diferentemente da amônia, demonstrando a maior vulnerabilidade do camarão a este composto. O resultado encontrado por Dutra *et al.* (2017) corrobora

o encontrado no presente estudo, tendo em vista que os maiores danos foram encontrados nos tratamentos com maiores concentrações de nitrito.

Portanto, alterações como espessamento lamelar, espessamento do epitélio lamelar, e infiltrações de hemócitos encontrados no presente estudo, refletem uma reação inflamatória do organismo para evitar maiores danos ao órgão e ao animal exposto ao agente tóxico (Negro *et al.* 2011), porém, as mesmas enquadram-se como lesões reversíveis, podendo ser combatidas pelo organismo assim que a exposição ao composto tóxico é interrompida. Entretanto, alterações como hiperplasia e necrose são irreversíveis para as células atingidas, tornando assim o desenvolvimento de animais com tais alterações, comprometidos e fadados ao subdesenvolvimento (Verján, *et al.*, 2016).

O fato de amônia e nitrito causarem danos nas brânquias com intensidades diferentes quando agem isolados ou combinados pode explicar porque o efeito da mortalidade combinada pode alterar-se com o tempo de duração da exposição, pois, a curtos períodos como os aqui citados (máximo de 96 h), podem causar danos às brânquias mesmo sem causar a mortalidade do animal, entretanto, cada espécie reage de forma diferente ao agente tóxico, portanto quando o período é prolongado (ciclos produtivos de 6 meses ou mesmo em uma avaliação com diferenças como de 48 para 96 h) as alterações causadas através da exposição podem agravar-se em casos de sinergismo ocasionando em diminuição do crescimento e ganho de peso além de suscetibilidade a infecções secundárias, ou serem interrompidas, curadas pelo organismo diminuindo sua gravidade no caso de efeitos antagônicos (Da Jansen, 2014).

Portanto, a avaliação de lesões causadas em brânquias como forma complementar à testes de mortalidade nos traz uma visão aprofundada e refinada das consequências da exposição de animais à agentes tóxicos como amônia e nitrito, tornando essa, parte crucial em estudos como esse.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que o camarão-da-amazônia quando submetido a concentrações de amônia e nitrito em conjunto demonstra maior tolerância a estes compostos (efeito antagônico) que quando submetido a estes compostos isoladamente (exposições agudas como 96 h). Porém,

ainda é possível observar que concentrações elevadas de nitrito como 5 mg.L⁻¹, representam uma maior toxicidade para estes animais, mesmo se combinado e que apesar da CL₅₀ de amônia combinada ter sido menor que a isolada, o efeito combinado é avaliado comparando-se a soma dos efeitos dos compostos isolados, sendo assim, 0,88 vezes menor combinado que a soma dos compostos isolados.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, G.; CHIAPPA-CARRARA, X.; VANEGAS, C. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* post larvae exposed to ammonia and nitrite. **Aquatic Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 345-353, 1997.
- ALCARAZ, G; CHIAPPA-CARRARA, X; ESPINOZA, V; VANEGAS, C. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* post larvae. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, n. 1, p. 90-97, 1999.
- ARANA, L. V. Qualidade da água em aquicultura princípios e práticas. Florianópolis: UFSC, 2010.
- ASHLEY, P.J., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104, 199-235, 2007.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM. 2002.
- BANCROFT, J.D., GAMBLE, M. Theory and practice of histological techniques. Elsevier Health Sciences, pp 654, 2008.
- BAUMGARTEN, M.G.Z. Manual de análises em oceanografia química. **Reo Grande: Ed. Furg**, p. 132, 1996.
- BENTES, B. S., MARTINELLI, J. M., SOUZA, L. S., CAVALCANTE, D. V., ALMEIDA, M. C., & ISAAC, V. J. 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**, v. 71, n. 4, p. 925-935, 2011.
- BENTES, B., MARTINELLI-LEMOES, J. M., ARAÚJO, C., ISAAC, V. A pesca do camarão-da-amazônia, perspectivas futuras no litoral paraense. **Ciência e Cultura**, 68(2), 56-59, 2016.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22, 25-34, 1999.
- BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; BAUMGARTNER, G.; BOND-BUCKUP, G. Occurrence of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae) In Leopoldo's inlet (ressaco do Leopoldo), upper Paraná river, Porto Rico, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 2, p. 379-390, 1997.
- BONDAD-REANTASO, M.G., MCGLADDERY, S.E., EAST, I., SUBASINGHE, R.P. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. **FAO Fisheries Technical Bulletin no Supplement**. FAO, Rome. 240 pp, 2001.
- CHEN, J. C.; CHENG, S. Y. Accumulation of urea in the haemolymph and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, v. 110, n. 1, p. 1-6, 1995.

CHEN, J. C.; CHIN, T. S. Joint action of ammonia and nitrite on tiger prawn *Penaeus monodon* post larvae. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 19, n. 3, p. 143-148, 1988.

CHEN, J.C.; LEE, Y. Effects of nitrite on mortality, ion regulation and acid-base balance of *Macrobrachium rosenbergii* at different chloride concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 39: p. 291–305, 1997.

COLT, JOHN E.; ARMSTRONG, D. A. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. Em: Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for fish culture. **Fish Culture Section of the American Fisheries Society**, p. 34-47, 1981.

COSTA P.M., CARREIRA, S., COSTA M.H., CAEIRO, S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. **Aquatic Toxicology**. 126, 442–454, 2013.

DE QUEIROZ, J. F. Boas práticas aquícolas (BPA) em viveiros garantem sucesso da produção. *Aquicultura*, p. 36, 2013.

DUTRA, F. M., FORNECK, S. C., BRAZÃO, C. C., FREIRE, C. A., BALLESTER, E. L. C. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Aquaculture**, 453, 104-109, 2016. (a)

DUTRA, F. M., RÖNNAU, M., SPONCHIADO, D., FORNECK, S. C., FREIRE, C. A., & BALLESTER, E. L. C. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. **Aquatic Toxicology**, v. 187, p. 115-123, 2017.

DUTRA, F. M.; FORNECK, S. C.; BRAZÃO, C. C.; FREIRE, C. A.; BALLESTER, E. L. C. Acute toxicity of nitrite to various life stages of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 2016 (b).

EMERSON, K., RUSSO, R. C., LUND, R. E., THURSTON, R. V. Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effects of pH and temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, 32, 2379-2383, 1975.

FAO, Food and Agriculture Organization of The United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. **FIGIS - Fisheries Statistics – Aquaculture**, Rome, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en> Acesso: 18/03/2018.

FAO. Fisheries & Aquaculture - Fishery and Aquaculture Country Profiles - **The Federative Republic of Brazil**. 2010 Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/facp/BRA/en#CountrySector-Statistics> Acesso em: 20/10/2017.

FAO. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Brasil. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. **Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO**. Roma, 2004. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil/es#tcN70085 Acesso: 18/10/2017.

GORSEL, M.; JENSEN, F. B. Nitrite uptake and HCO₃-excretion in the intestine of the european flounder (*Platichthys fleus*). **The Journal of Experimental Biology**, Ottawa, n. 202, p. 2103-2110, 1999.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: Grasshoff, K. (ed.) Methods of seawater analysis. **Verlag Chemie Weinheim**, p. 117-181., 1976.

LEWIS JR, W. M.; MORRIS, D. P. Toxicity of nitrite to fish: a review. **Transactions of the American fisheries society**, v. 115, n. 2, p. 183-195, 1986.

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

MACÊDO, J.A.B. Métodos Laboratoriais de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas - 2ª. Edição. Belo Horizonte: CRQ-M.G. 450p., 2003

MAGALHÃES, C. Diversity and abundance of decapod crustaceans in the Rio Negro basin, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **RAP Bulletin of Biological Assessment**, v. 18, p. 56-62, 2000.

MELO, A. G. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. **Edições Loyola**, 2003.

MONTOYA, J. V. Freshwater shrimps of the genus *Macrobrachium* associated with roots of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). **Caribbean Journal of Science**, v. 39, n. 1, p. 155-159, 2003.

NEGRO L. E.; MONTAGNA, M.; COLLINS, P. Freshwater Decapods and Pesticides: Na Unavoidable Relation in the Modern World, in: Stoytchera, M.(Ed.), Pesticides in the Modern World: Risks and Benefits. **Intech**, Croatia, pp. 560, 2011.

PELTIER, W. H.; WEBER, C. I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 1985.

RAND, GARY M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Fundamentals of Aquatic Toxicology. In: RAND, G. M. (ed) Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Second edition. Taylor and Francis, Washington, DC, USA. pp. 3-6. 1995. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=nTHWicichfoC&oi=fnd&pg=PR15&dq=RAND,+Gary+M.%3B+WELLS,+P.+G.%3B+MCCARTY,+L.+S.+Fundamentals+of+Aquatic+Toxicology:+Effects,+Environmental+&ots=A8N_xl7NyB&sig=e9iOOYDW_2SQR-TjtoSAd4VQFGY&redir_esc=y#v=onepage&q=RAND%2C%20Gary%20M.%3B%20WELLS%2C%20P.%20G.%3B%20MCCARTY%2C%20L.%20S.%20Fundamentals

%20of%20Aquatic%20Toxicology%3A%20Effects%2C%20Environmental&f=false
Acesso em: 20/10/2017.

RITZ, C., BATY, F., STREIBIG J.C., GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **Plos One** 10:1-13, 2015.

SCHULER, D. J., BOARDMAN, G. D., KUHN, D. D., & FLICK, G. J.. Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 3, p. 438-446, 2010.

VITULE, J. R. S.; PRODOCIMO, V. Introdução de espécies não nativas e invasões biológicas. **Estudos de Biologia**, v. 34, n. 83, 2017.

WANG, W. N.; WANG, A. L.; ZHANG, Y. J.; LI, Z. H.; WANG, J. X.; SUN, R. Y. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. **Aquaculture**, v. 232, n. 1, p. 679-686, 2004.

WEIHRAUCH, D.; BECKER, W.; POSTEL, U.; LUCK-KOPP, S.; SIEBERS, D. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 169, n. 1, p. 25-37, 1999.

XIAN, J.A.; WANG, A.L.; CHEN, X.D.; GOU, N.N.; MIAO, Y.T.; LIAO, S.A.; YE, C.X.; Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, -using flow cytometric analysis. **Aquaculture**, v. 317, n. 1, p. 240-244, 2011.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. Rima, 2008.

ZHANG, Y., YE, C., WANG, A., ZHU, X., CHEN, C., XIAN, J., & SUN, Z. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 7-8, p. 1601-1610, 2015.

SCHULER, D. J., BOARDMAN, G. D., KUHN, D. D., & FLICK, G. J. Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 3, p. 438-446, 2010.

VERJÁN, N. IREGUI, C. A., REY, A. L., DONADO, P. Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógenoambiente. **Revista Aquatic**, n. 15, 2016.

VALENTI, W. C. Carcinicultura de água doce: Tecnologia para a produção de camarões. 1998.

DA JANSEN, L. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico. **Arq. Bras. Med**, 66(2), 593-601, 2014.

APÊNDICE 1

IMAGENS UTILIZADAS NA CONFEÇÃO DAS PRANCHAS DE IMAGENS DE
ALTERAÇÕES NAS BRÂNQUIAS

