

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

JORGE HENRIQUE CIDEMAR ALAB

TOXICIDADE AGUDA DO NITRATO SOBRE JUVENIS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *MACROBRACHIUM AMAZONICUM*, (HELLER, 1862)

PALOTINA

2018

JORGE HENRIQUE CIDEMAR ALAB

TOXICIDADE AGUDA DO NITRATO SOBRE JUVENIS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* (HELLER, 1862)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, área de concentração Produção de organismos aquáticos, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luís Cupertino Ballester

Coorientador: Dr. Plínio Schmidt Furtado

PALOTINA, PR

2018

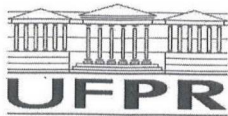
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A316 Alab, Jorge Henrique Cidemar
Toxidade aguda do nitrato sobre juvenis do camarão-da-
ama- zônia *Macrobrachium amazonicum*, (Heller,1962) / Jorge
Henrique Cidemar Alab. -- Palotina,2018
27f.

Orientador: Eduardo Luís Cupertino Ballester
Coorientador: Plínio Schimidt Furtado
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e
Desenvolvimento Sustentável.

1. Ecotoxicidade. 2. Compostos nitrogenados. 3. Sistema
intensivo. 4. Camarão de água doce. I. Ballester, Eduardo Luís
Cupertino. II. Furtado, Plínio Schimidt. III. Universidade
Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639.3



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 **JORGE HENRIQUE CIDEMAR ALAB** intitulada: **Toxicidade aguda do nitrato sobre juvenis do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*, (HELLER, 1862)**, após terem inquirido o aluno 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, 27 de Julho de 2018.

EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALTEVIR SIGNOR
Avaliador Externo (UNIOESTE)

BRUNO RIBEIRO DE CAMPOS
Avaliador Externo (UFPR)

FABRICIO MARTINS DUTRA
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde, condições físicas e mentais para realização deste trabalho;

A minha família, em especial minha mãe Raquel Terezinha Stankievicz e meu pai Alexandre Jorge Cidemar Alab, pelo amor e incentivo pleno em minha formação;

Ao meu orientador Eduardo Luís Cupertino Ballester, pela confiança, paciência, atenção, dedicação, ensinamentos e pelo incentivo para ingresso no programa de mestrado;

Ao professor Milton Ronnau, pelos ensinamentos, atenção e ajuda com as metodologias do trabalho;

Aos pesquisadores Fabricio Martins Dutra e Plinio S. Furtado, pelos ensinamentos, compreensão e paciência durante todas as fases do mestrado.

A minha esposa Aline dos Santos, pelo amor, apoio, compreensão e por me ajudar a ser uma pessoa sempre melhor.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho Matheus Antônio da Costa, Eric Lucas Dalpiaz, pela colaboração;

Aos técnicos da UFPR – Setor Palotina: Ademir Heldt, Marlise e Dircelei Spochiaco, pela atenção e apoio nos experimentos;

Aos alunos da UFPR – Setor Palotina: Luciana Oliveira, Kelviane, Gabriela Rios, Mariane Soares, João, Matheus Coelho, Paula, Isabel e Luana Cagol, pela colaboração;

A todo o pessoal do Laboratório de Carcinicultura e do Laboratório de Genética – LABIOGEN da UFPR – Setor Palotina;

Aos membros da banca pelo aceite do convite e pelas importantíssimas contribuições para este trabalho;

A empresa LACQUA Camarões pelo apoio.

Aos órgãos financiadores CNPq, FINEP e MEC-Proext.

E a Universidade Federal do Paraná – UFPR Setor Palotina pelo apoio técnico – científico.

Muito obrigado!

“Deixem que o futuro diga a verdade e avalie cada um de acordo com o seu trabalho e realizações. O presente pertence a eles, mas o futuro pelo qual eu sempre trabalhei pertence a mim.”

Nikola Tesla

RESUMO

A evolução da aquicultura mundial, gerou uma crescente demanda por espécies aquáticas economicamente importantes. O camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum*, nativo dos rios brasileiros, tem mostrado grande potencial de criação em cativeiro, sendo importante seu desenvolvimento tecnológico para evitar a constante degradação de berçários naturais e áreas de crescimento, devido a pesca excessiva. Além disso, o uso de espécies nativas na aquicultura vem sendo um requisito importante para a sustentabilidade e o desenvolvimento de sistemas de produção que causem menor impacto ao meio ambiente. Atualmente, as tecnologias mais sustentáveis de produção aquícola são sistemas fechados com zero renovação de água, como por exemplo, a tecnologia de bioflocos – BFT e sistemas de recirculação – RAS. Entretanto, as criações de um camarão nativo com essas tecnologias requerem maior conhecimento a respeito das condições químicas e físicas da água adequadas para essa espécie. Um dos problemas enfrentados nesses sistemas são o acúmulo de compostos nitrogenados devido a entrada constante de nutrientes. O nitrato é o produto final da oxidação da amônia por bactérias, que possui baixa toxicidade em pequenas concentrações aos camarões, mas que, em sistemas fechados, pode se tornar tóxico comprometendo o desempenho zootécnico e causando mortalidades. Testes de toxicidade aguda são importantes para determinar os níveis de segurança para criação de camarões em sistemas fechados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade aguda por meio de um teste de concentração letal para 50% da população em 96h (CL_{50-96h}) e verificar alterações nas brânquias de juvenis de *M. amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de nitrato. Para tal, os camarões foram expostos a sete diferentes concentrações de nitrato ($N-NO_3^-$) (0, 50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $mg.L^{-1}$), com 4 repetições por tratamento em um teste de 96 horas. Os camarões logo após a sua morte e ao final do período experimental foram coletados para dissecação das brânquias e montagem de lâminas histológicas. As CL_{50} , para juvenis de *M. amazonicum*, em 24, 48, 72 e 96h, e seus respectivos intervalos de confiança (95%), foram calculadas com a utilização do software Trimmed Spearman Karber method, sendo encontrado a CL_{50} 96h de 155,45 $mg.L^{-1} N-NO_3^-$. As análises de brânquias evidenciaram por meio dos índices de órgãos (*Iorg*) que quando maior a concentração de nitrato, maior foi o dano causado a estrutura branquial, tendo os tratamentos de 0, 50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $mg.L^{-1}$, atingido índices de 5,5±1,7; 15±2,8; 19±2,16; 21±2,7; 23,2±2,2; 25,5±2,6 e 25,75±2,5, respectivamente. Os resultados demonstraram que o nível de segurança para produção de juvenis de *M. amazonicum* é de 15,5 $mg.L^{-1}N-NO_3^-$.

Palavras-chave: Ecotoxicidade, compostos nitrogenados, sistema intensivo, camarão de água doce.

ABSTRACT

The evolution of world aquaculture has generated a growing demand for economically important aquatic species. Freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*, native to Brazilian rivers, has shown great breeding potential in captivity, and its technological development is important to avoid the constant degradation of natural nurseries and growth areas due to overfishing. In addition, the use of native species in aquaculture has been an important requirement for the sustainability and development of production systems that have the least impact on the environment. Currently, the most sustainable technologies for aquaculture production are closed systems with zero water renewal, such as biofloc technology - BFT and recirculation systems - RAS. However, shrimp creations with these technologies require more knowledge about the appropriate chemical and physical water conditions for this species. One of the problems faced in these systems is the accumulation of nitrogen compounds due to constant input of nutrients. Nitrate is the final product of bacterial ammonia oxidation, which has low toxicity at low concentrations to shrimp, but which in closed systems can become toxic by compromising animal performance and causing mortality. Acute toxicity tests are important in determining the safety levels for shrimp farming in closed systems. Therefore, the objective of this work was to determine the acute toxicity by means of a lethal concentration test for 50% of the population in 96h (LC50-96h) and verify changes in the gills of juveniles of *M. amazonicum* submitted to different concentrations of nitrate. For this, shrimps were exposed to seven different concentrations of nitrate (N-NO₃⁻) (0, 50, 100, 500, 1000, 1500 and 2000 mg.L⁻¹), with 4 replicates per treatment in a 96 hours. The shrimp soon after their death and at the end of the experimental period were collected for dissection of the gills and assembly of histological slides. The CL's50, for juveniles of *M. amazonicum*, at 24, 48, 72 and 96h, and their respective confidence intervals (95%), were calculated using the Trimmed Spearman Karber method software. 155.45 mg.L⁻¹ N-NO₃. Gill analyzes showed that the higher the concentration of nitrate, the greater the damage caused to the gill structure, with treatments of 0, 50, 100, 500, 1000, 1500 and 2000 mg. L⁻¹, achieved indices of 5.5 ± 1.7 ; 15 ± 2.8 ; 19 ± 2.16 ; 21 ± 2.7 ; 23.2 ± 2.2 ; 25.5 ± 2.6 and 25.75 ± 2.5 , respectively. The results showed that the safety level for *M. amazonicum* juveniles is 15.5 mg.L⁻¹N-NO₃.

Keywords: Ecotoxicity, nitrogen compounds, intensive system, freshwater prawn.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figure 1 - Mean value of Organ Index (\pm SE; SD) of *M. amazonicum* juveniles exposed to different concentrations of nitrate for 96h (n=12)..... 17
- Figure 2 - Gill of *M. amazonicum* exposed to different concentrations of nitrate for 96 h. Clavate-globate “clubbing” (CG); Edema (E); Fused lamellae (FL); Hemocytes (HC); Hemocytic infiltration (HI); Hemocoelic space (HS); Hyperplasia (HY); Interlamellar space (IS); Lamella (L); Lifting lamellar of the cuticle (LLC); Necrosis (NC); Thickening of the lamellar (TL); Vacuole (V) and Peeling of the lamellar cuticle (PLC). A) Gill exposed to 0 mg L⁻¹ of nitrate (control) (10x, 10x H & E). B) Gill exposed to 0 mg L⁻¹ of nitrate (control) (20x, 10x H & E). C) Gill exposed to 50 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). D) Gill exposed to 100 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). E) Gill exposed to 500 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). F) Gill exposed to 1000 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). G) Gill exposed to 1500 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). H) Gill exposed to 2000 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E)..... 19

LISTA DE TABELAS

- Table 1 - Mean values (\pm S.D.) of the water quality variables monitored during the experiment with juveniles of *M. amazonicum* exposed to different concentrations of nitrate. 15
- Table 2 - Median lethal concentration values (LC_{50}), confidence interval and safe level of *M. amazonicum* juveniles exposed to nitrate for 96 h. 16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. Delineamento Experimental.....	12
2.2. Qualidade da Água.....	13
2.3. Análise Histológica das Brânquias	13
2.4. Análise estatística.....	14
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, em vista do crescimento populacional e à queda da produção mundial de pescado por captura, a atividade de aquicultura vem crescendo e se tornando uma alternativa para suprir essa demanda mundial (FAO, 2018). No entanto, esse crescimento vem concomitante com a exigência mundial por uma atividade sustentável, atividade essa que passará por desafios de adequação no que tange ao uso de racional dos recursos naturais, energéticos e a valorização dos atores primários da cadeia produtiva (FAO, 2016). Alguns destes desafios podem ser superados com a intensificação das operações de produção em ambientes menores, mais controlados e altamente adensados, reduzindo possibilidade de fuga de espécimes e emissão de efluentes (Paez-Osuna, 2001). No entanto, o acúmulo de resíduos alimentares e de matéria orgânica, bem como substâncias tóxicas inorgânicas, como amônia, nitrito e nitrato são os principais problemas de qualidade de água experimentados nos sistemas intensivos (Boyd and Tucker, 2012).

Diversos estudos vêm sendo realizados acerca dos efeitos dos compostos nitrogenados em diferentes ambientes aquáticos (marinho à água doce) de produção de peixes (Hargreaves and Tucker, 2004; Crab et al., 2007; Boyd and Tucker, 2012) e crustáceos (Romano and Zeng, 2012; Martínez-Córdova et al., 2015). Dentre os compostos nitrogenados, a amônia e o nitrito são os que mais receberam atenção pela ciência, por alcançarem facilmente níveis letais e subletais em sistemas convencionais (tanques escavados) e superintensivos de produção (sistemas com baixa ou nenhuma renovação de água) (Boyd and Tucker, 2012). O nitrato, por apresentar baixa toxicidade e ser rapidamente absorvido pelo fitoplâncton, algas e macrófitas, não alcançando facilmente níveis letais nos sistemas tradicionais de produção aquícola (Glibert et al., 2016), teve o estudo dos seus efeitos sobre organismos aquáticos de produção negligenciados (Romano and Zeng, 2013).

O nitrato é um dos compostos nitrogenados comumente encontrado em corpos hídricos, quando em elevadas concentrações, conduz a um processo de produção primária exagerada, denominada de eutrofização (Glibert et al., 2016). Por ser o produto final da nitrificação, pode acumular-se em grandes quantidades, principalmente em sistemas fechados de produção (Kuhn et al., 2010), onde pode causar efeitos letais ou subletais, ou ainda, atuar em sinergismo com outras formas nitrogenadas (Romano and Zeng, 2013). Portanto, passa a ser preocupante por ser a principal forma de nitrogênio encontrada nos sistemas intensivos, devido a sistemas como Bioflocos (BFT) - *Biofloc Technology System*; sistemas sem renovação de água - *Zero Water Exchange Systems* e sistemas de recirculação (RAS) - *Recirculating Aquaculture Systems* serem ineficientes na remoção deste composto (Kuhn et al. 2010; Furtado et al., 2015). O nitrato assim como o nitrito, é absorvido via mecanismos ativo de captação de cloreto, o que afeta o transporte de oxigênio devido a oxidação da

hemocianina, esta é convertida então em metahemocianina, que dificulta a ligação do oxigênio. Isso reduz o transporte de oxigênio para os tecidos (hipóxia) (Cheng and Chen, 2002).

Outro desafio da produção sustentável é em relação a escape de espécies, principalmente espécies não nativas (Arechavala-Lopez et al., 2017). Atualmente no Brasil, a produção comercial de camarões de água doce é pautada exclusivamente pela espécie não nativa *Macrobrachium rosenbergii* introduzida em 1977 (New et al., 2010). O uso de espécies não nativas na produção representa grandes riscos ambientais devido à possibilidade de escape para o meio ambiente (Forneck et al., 2016). O escape de espécies não nativas pode levar a diversos impactos na fauna nativa. A introdução de *M. rosenbergii* no ambiente pode levar à competição desta com espécies nativas, além disso, pode disseminar doenças, como o vírus WSS (*White Spot Syndrome*) (Loebmann et al., 2010). Relatos de escapes são apontados na literatura para o país (Gazola-Silva et al., 2007; Loebmann et al., 2010; Silva and Barros, 2011). Dentro deste contexto, a produção de camarões nativos é encorajada em todo o mundo (Kutty and Valenti, 2009) e tem como principal exemplo a produção da espécie nativa *Macrobrachium nipponense* na China, que obteve sucesso na substituição da espécie exótica, ultrapassando a produção mundial do *M. rosenbergii* (FAO, 2009).

No Brasil, a espécie nativa que mais se destaca é o *Macrobrachium amazonicum*, mesmo esse não apresentando ainda produção comercial. A espécie vem sendo produzida experimentalmente desde o final dos anos 90 (New, 2005; Moraes-Valenti and Valenti, 2009) e em produção em escala piloto na região norte (Moraes-Riodades e Valenti, 2001). No norte e nordeste do país, a comercialização do *M. amazonicum* tanto para consumo, quanto como isca na pesca esportiva representa parte significativa da fonte de renda dos pescadores artesanais (Lucena-Frédou et al., 2010; Moraes-Valenti and Valenti, 2009). A espécie também se destaca por apresentar ampla distribuição continental, ocorrendo desde a Venezuela até a Argentina (Bialecki et al., 1997) e por apresentar características zootécnicas favoráveis para produção, como aceitação de adensamento (~80 camarões/m²), rápido crescimento, resistência a doenças e ciclo de desenvolvimento larval curto (Moraes-Riodades and Valenti, 2001; Maciel and Valenti, 2009).

Sendo assim, para se produzir camarão-da-amazônia em sistemas fechados é necessário compreender a tolerância dessa espécie aos compostos nitrogenados, principalmente ao nitrato. A toxicidade da amônia e nitrito para a espécie já é reportado na literatura (Dutra et al., 2016a; Dutra et al., 2016b). Teste de letalidade (CL₅₀) são recomendados para conhecimento de possíveis danos causados ao organismo exposto ao agente tóxico (IBAMA, 1990). De acordo com Peltier and Weber (1985), o valor de CL₅₀ obtido em testes de toxicidade de curta duração, geram resultados seguros da concentração tóxica em questão, podendo nortear testes de médio e longo prazo. Por outro lado, mesmo que o estudo toxicológico apresente resultados seguros sobre a concentração tóxica de um determinado composto, este não fornece informações sobre o dano provocado ao organismo

decorrente da intoxicação. Assim, a histopatologia tem sido uma ferramenta comumente utilizada na identificação dos danos provocados a organismos submetidos a um agente tóxico (Miron et al., 2008).

Dentro deste contexto, o objetivo do estudo foi determinar a concentração letal mediana (CL₅₀) durante 96 horas e identificar alterações histopatológicas nas brânquias de juvenis de *M. amazonicum* expostos a nitrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foi aplicado o protocolo de mensuração de toxicidade utilizado pela Agência de Proteção Ambiental dos USA (Peltier and Weber, 1985). O teste foi realizado no Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Paraná, Brasil. As concentrações utilizadas para realização do trabalho foram obtidas a partir de teste de mortalidade piloto (LC₅₀), onde posteriormente foram subdividas a partir da maior concentração que causou mortalidade de 100% em 24 horas.

2.1. Delineamento Experimental

O bioensaio foi realizado em sala aclimatizada para a manutenção da temperatura da água nas unidades experimentais. Cada unidade experimental de polipropileno de 10 L⁻¹ de volume útil (n=28) foi estocada com 10 camarões com peso médio de 0.67±0,19gr. O sistema experimental foi estático (sem renovação de água), equipado com aeração forçada e fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro). Os animais ficaram em jejum 24h antes do início do experimento e durante todo o período do mesmo. A água utilizada nas unidades experimentais foi obtida de abastecimento público, previamente declorada.

A distribuição das unidades experimentais foram inteiramente casualizadas. Os tratamentos foram compostos pelo controle (sem adição de nitrato) e seis tratamentos com adição de nitrato (50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 mg.L⁻¹ de nitrato) em quatro repetições. As concentrações de nitrato foram preparadas pesando individualmente a quantidade em gramas de NaNO₃ PA – Synth[®] para cada unidade experimental.

A observação da mortalidade dos camarões foi realizada a cada hora, durante as oito primeiras horas, após esse período as observações passaram a ser realizadas a cada 2 horas, sendo os dados agrupados a cada 12 horas até o término das 96 horas. Este protocolo possibilitou a obtenção de brânquias preservadas em organismos recém mortos (Dutra et al., 2016a; Dutra et al., 2016b; Dutra et al., 2017). O critério para confirmação da mortalidade adotada foi à ausência de qualquer tipo de movimento ou reação a estímulos mecânicos.

2.2. Qualidade da Água

As variáveis de qualidade de água foram realizadas duas vezes ao dia (08:00 and 18:00h) para temperatura, oxigênio dissolvido, pH (multiparâmetro – AKSO® AK88) e salinidade (Laborchemiker® – LCK-7BX100) No início e ao final do experimento foram avaliadas as concentrações de amônia total, nitrito, nitrato e alcalinidade conforme metodologia descrita em [APHA \(2005\)](#).

2.3. Análise Histológica das Brânquias

Para avaliação histológica das brânquias foram utilizados animais recém-mortos e os sobreviventes dos experimentos após 96 horas. Os animais sobreviventes foram submetidos a termonarose para retirada do seu cefalotórax ([Ashley, 2007](#)). Os cefalotóraces dos camarões foram seccionados, agrupados por tratamento e fixado em solução ALFAC por 48 horas ([Lightner and Bell, 1998](#)). Após, os cefalotóraces foram acondicionados em álcool 70% até seu processamento histológico.

Para o processamento histológico, o conjunto branquial foi seccionado do cefalotórax de cada camarão, estes foram acomodadas em cassete histológico individual, representando cada animal (N=12) para cada tratamento. Após foram mergulhados em uma serie crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanizados em xilol (três mergulhos) e impregnados em parafina histológica a 56°C (dois mergulhos), ambos com duração de 40 minutos por mergulho. Após o procedimento as peças foram modeladas em blocos de parafina, seccionadas com o auxílio de um micrótomo (Leica®, modelo RM2245) em espessura 5µm e coradas com Hematoxilina-Eosina (H & E) ([Dutra et al., 2017](#)). As imagens das brânquias foram capturadas por câmera digital 2048x15636 megapixels (Leica®, modelo DFC295) acoplada em microscópio (Leica®, modelo DM1000) e visualizada pelo software Leica® Application Suite V3, (Leica®, modelo LAS V3.8).

As alterações encontradas nas brânquias foram classificadas conformo o índice de órgão [$I_{org} = \sum_{alt} (a.w)$] criado por [Bernet et al. \(1999\)](#) e adaptado para camarão por [Dutra et al. \(2017\)](#). O índice permite classificar as alterações atribuindo uma pontuação (w) conforme sua reversibilidade: 1 – alterações facilmente reversíveis; 2 – alterações moderadas, reversíveis com o termino da exposição; 3 – alterações irreversíveis com perda parcial o total do órgão.

O valor de score (a) é atribuído subjetivamente conforme a intensidade do dano no órgão a partir da observação de toda a estrutura. Para este é atribuído “0” – inalterado; “1-2” – baixa intensidade; “3-4” – moderada intensidade; “5-6” – acentuada intensidade.

2.4. Análise estatística

As concentrações letais medianas para 24, 48, 72 e 96h, e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram calculadas a partir do software “Trimmed Spearman-Kärber method” (Hamilton et al. 1977). Para a determinação dos níveis de segurança (concentração que não apresente efeito adverso sobre os organismos) para nitrato foi utilizado o protocolo recomendado por Sprague (1971), onde, os valores estimados de CL_{50} foi multiplicando por um fator de aplicação de 0.1 ($SL = CL_{50-96h} \times 0.1$).

Os resultados do Índice do Órgão (*Iorg*) foram submetidos aos pressupostos de normalidade e homogeneidade (Sokal e Rohlf, 2012). Após assumidos estes pressupostos, foram submetidos a One-Way ANOVA, sendo aplicado posteriormente o teste de média Tukey ($\alpha = 0,05$).

3. RESULTADOS

A maioria das variáveis físicas e químicas da água permaneceram constantes e dentro do intervalo recomendado para a produção de *M. amazonicum* durante todo o período experimental. A variação na salinidade foi ocasionada pelo sal utilizado no preparo da solução estoque de nitrato ($NaNO_3$). No entanto, o mesmo não influenciou no estudo, uma vez que a mortalidade apresentou um padrão crescente conforme o aumento da concentração de nitrito (Figure 1). A variação na concentração do nitrato foi devido a diluição deste composto nas unidades experimentais (Table 1).

Table 1 - Mean values (\pm S.D.) of the water quality variables monitored during the experiment with juveniles of *M. amazonicum* exposed to different concentrations of nitrate.

Variables	Nitrate concentration (mg.L ⁻¹)							Recommended values*
	Control	50	100	500	1000	1500	2000	
Temperature H ₂ O (°C)	25.3 \pm 0.2	25.4 \pm 0.2	25.4 \pm 0.2	25.3 \pm 0.2	25.3 \pm 0.2	25.4 \pm 0.2	25.4 \pm 0.2	25-29
Dissolved oxygen (mg.L ⁻¹)	6.43 \pm 0.30	6.63 \pm 0.33	6.49 \pm 0.28	6.53 \pm 0.26	6.55 \pm 0.31	6.58 \pm 0.25	6.6 \pm 0.29	>4
pH	8.35 \pm 0.10	8.27 \pm 0.12	8.33 \pm 0.13	8.14 \pm 0.14	8.21 \pm 0.13	8.1 \pm -0.12	8.01 \pm 0.13	~8
Salinity (ppm)	0 \pm 0	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	6.1 \pm 0.2	8.2 \pm 0.2	<12
Alkalinity (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	93.0 \pm 3	89.0 \pm 4	90.0 \pm 2	90.0 \pm 2	87.0 \pm 4	88.0 \pm 3	85.0 \pm 3	35-120
Hardness (mg.L ⁻¹)	88.0 \pm 4	87.0 \pm 3	88.3 \pm 3	89.0 \pm 4	86.0 \pm 3	86.0 \pm 4	84.0 \pm 2	20-150
Total ammonia (mg.L ⁻¹)	0.013 \pm 0.02	0.012 \pm 0.01	0.015 \pm 0.025	0.011 \pm 0.02	0.019 \pm 0.013	0.016 \pm 0.02	0.013 \pm 0.022	<1
Nitrite (mg.L ⁻¹)	0.011 \pm 0.015	0.012 \pm 0.018	0.02 \pm 0.02	0.015 \pm 0.02	0.012 \pm 0.02	0.022 \pm 0.02	0.016 \pm 0.02	<2
Nitrate (mg.L ⁻¹)	1.5 \pm 0.13	52.4 \pm 4.41	112.29 \pm 21.65	477.36 \pm 82.06	990.85 \pm 42.81	1601.79 \pm 72.05	1987.59 \pm 72.9	<80

* Recommend values in the literature ([New et al., 2010](#)). FONTE: O autor (2018).

Durante o período experimental, foi observado que juvenis de *M. amazonicum* expostos à concentrações de 2000, 1500, 100 e 500 mg.L⁻¹ de nitrato apresentaram mortalidade de 100% em 36, 48, 60 e 72 horas, respectivamente. Em 96 horas, foi observado mortalidade de 30% na concentração de 100 mg.L⁻¹ e 5% de mortalidade na concentração de 50 mg.L⁻¹. O controle não apresentou mortalidade durante o período experimental. A concentração letal mediana (CL₅₀ 96h) de nitrato calculada para 24h, 48h, 72h e 96h, o intervalo de confiança e o nível de segurança encontram-se sumarizados na [table 2](#).

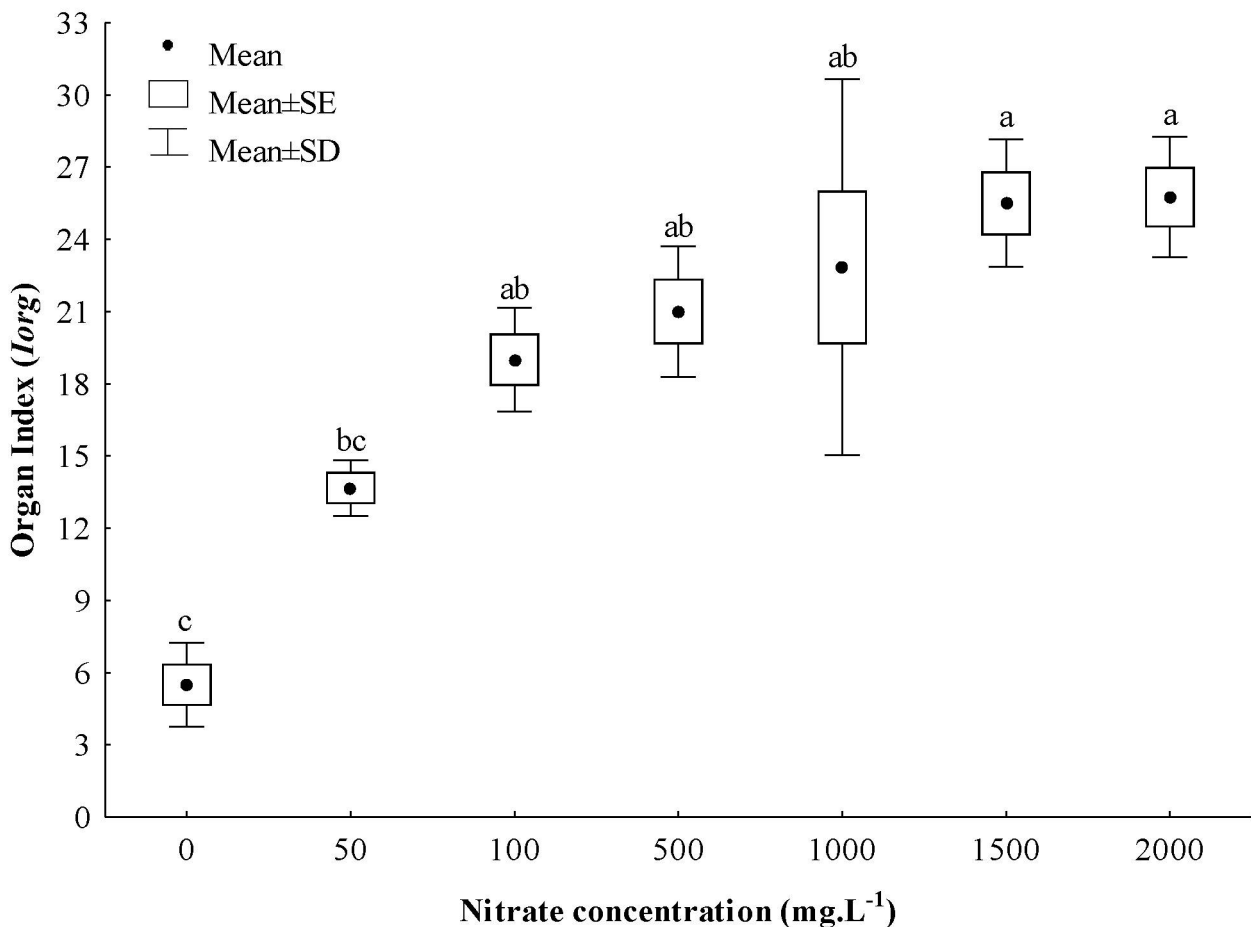
Table 2 - Median lethal concentration values (LC₅₀), confidence interval and safe level of *M. amazonicum* juveniles exposed to nitrate for 96 h.

Hours	LC ₅₀ (mg.L ⁻¹ of nitrate)	Confidence interval LC ₅₀ (mg.L ⁻¹ of nitrate)	Safe level (mg.L ⁻¹ of nitrate)
24	1069.73	853.44 - 1340.82	106,9
48	286.37	226.37 - 361.74	28,6
72	184.57	154.91 - 219.90	18,4
96	155.45	129.17 - 187.07	15,5

FONTE: O autor (2018).

Os resultados da análise do Índice do Órgão (*Iorg*) para juvenis de *M. amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de nitrato ([Figure 1](#)), associada à imagem dos cortes histológicos das brânquias ([Figure 2](#)), reforçam os resultados encontrados no teste de mortalidade, onde é possível observar um decréscimo nos valores médio de *Iorg* com o decréscimo da concentração de nitrato.

Os valores com mortalidade de 100% (500, 1000, 1500 e 2000 mg.L⁻¹ de nitrato) apresentaram os maiores valores médio de *Iorg* (21.0±2.8, 23.25±2.2, 25.5±2.6 e 25.75±2.5), respectivamente. Estes tratamentos apresentaram uma mescla na quantidade de injurias nas brânquias, ocasionadas por danos progressivos, regressivos, inflamatórios e circulatório ([Figure 2 – E; F; G; H](#)). Para 100 mg.L⁻¹ de nitrato também é observado alto índice de *Iorg* (19.0±2.16) com baixa mortalidade (30%) que pode ser explicado pela alta presença de alterações com baixo fator de importância (principalmente danos regressivos e inflamatórios) que elevam o valores do índice ([Figure 2 – D](#)). Também é observado alterações com baixo fator de importância (danos regressivos e inflamatórios) na concentração de 50 mg.L⁻¹ de nitrato, onde foi observado mortalidade de 5% e valor moderado valor de *Iorg* de 15,0±2,8 ([Figure 2 – C](#)). O controle (0 mg.L⁻¹ de nitrato) apresentou poucas alterações, representadas por alterações inflamatórias com baixo fator de importância e valor de *Iorg* (5,7±1,7; [Figure 2 – A; B](#)).

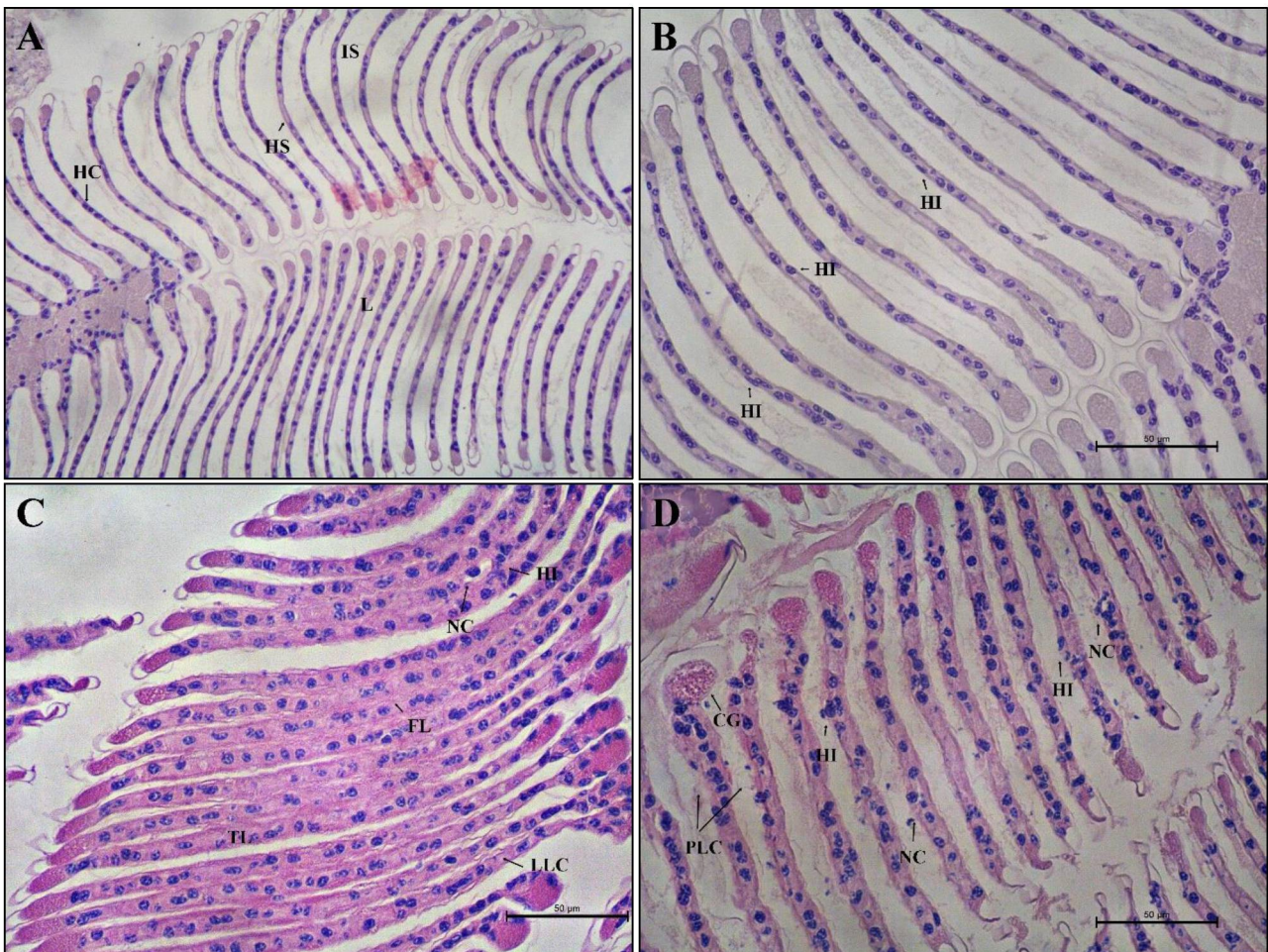


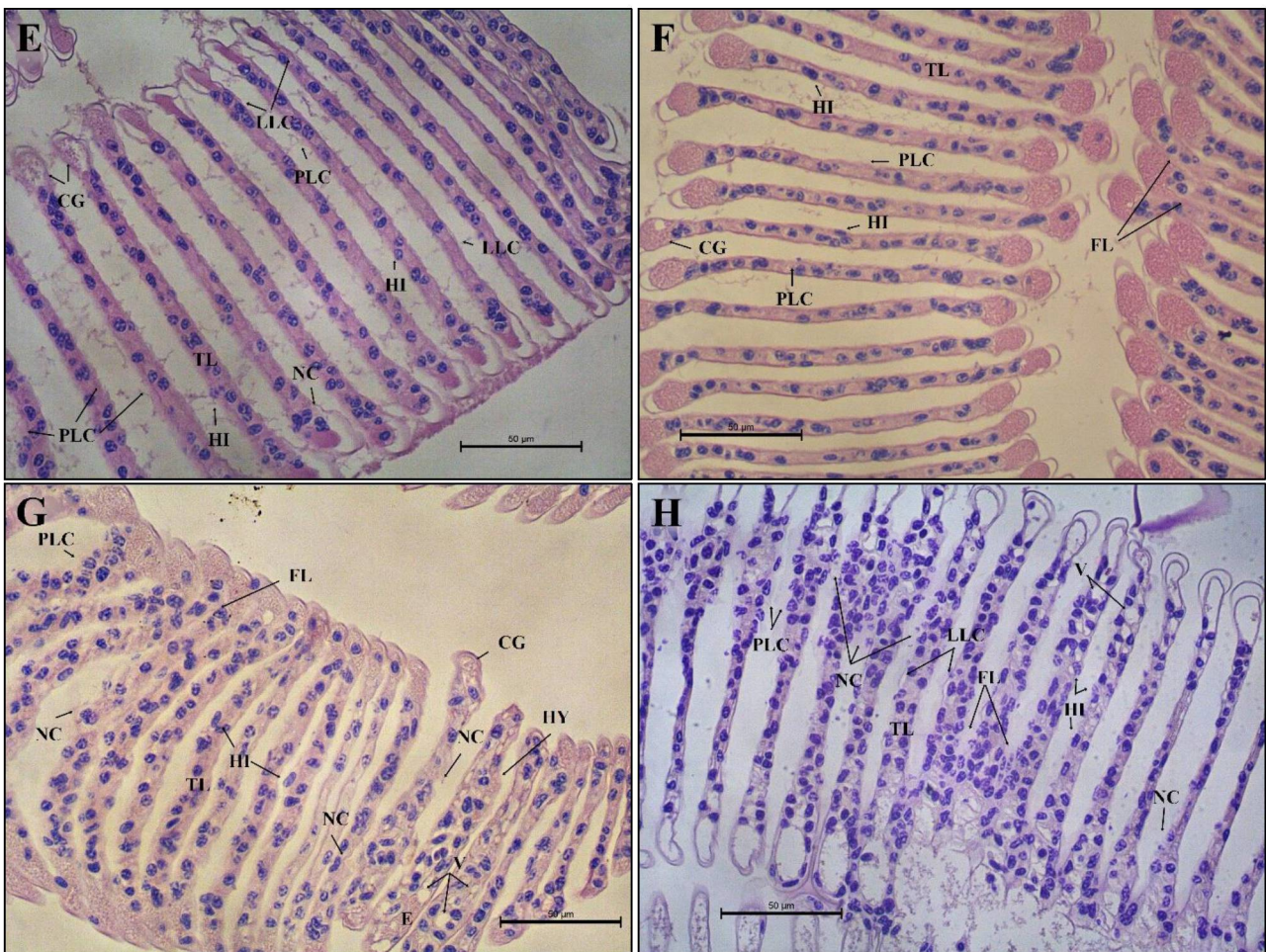
FONTE: O autor (2018).

Figure 1 - Mean value of Organ Index (\pm SE; SD) of *M. amazonicum* juveniles exposed to different concentrations of nitrate for 96h (n=12).

Por meio da análise histológica foi possível observar os danos causados a estrutura branquial de *M. amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de nitrato (Figura 2). Na concentração controle (0 mg.L⁻¹ de nitrato) são observadas poucas ou nenhuma alteração na estrutura branquial, e quando ocorrem apresentam-se como infiltração hemocítica com baixo fator de importância (*w*). Este tipo alteração é comumente observado, tornando-se preocupante quando aparece com alta frequência no órgão (Figure 2 – A; B). Na concentração de 50 mg.L⁻¹ de nitrato é observada a presença moderada de alterações regressivas e inflamatórias, tais como infiltração hemocítica, inchaço lamelar, fusão lamelar, levantamento da cutícula lamelar e necrose. O levantamento da cutícula lamelar e a necrose mesmo apresentando um alto fator de importância, não influenciaram na mortalidade devido à sua baixa presença no órgão. No entanto, o fato destes organismos apresentarem inchaço lamelar, levando ao aparecimento da fusão lamelar, indica que mesmo não causando mortalidade considerável (5%), estes organismos encontram-se sob situação de estresse (Figure 2 – C). Na concentração de 100 mg.L⁻¹ de nitrato observa-se presença moderada de danos com maior fator de importância como necrose e

descamação da cutícula lamelar (danos regressivos) e presença de distúrbio circulatório (Clavate-globate), além das demais alterações visualizadas na concentração anterior (Figure 2 – D). Nas demais concentrações de nitrato (500, 1000, 1500 e 2000 mg.L⁻¹) e que apresentaram 100% de mortalidade, começamos a observar o agravamento dos danos na estrutura branquial. Danos com maior fator de importância como necrose, hiperplasia, descamação da cutícula lamelar, levantamento da cutícula lamelar, fusão lamelar e edemas começam a aparecer com frequência moderada à alta, conforme o aumento na concentração. Danos de baixo fator de importância também foram observados com alta frequência de presença no órgão (Figure 2 -E; F; G; H).





FONTE: O autor (2018).

Figure 2 - Gill of *M. amazonicum* exposed to different concentrations of nitrate for 96 h. Clavate-globate “clubbing” (CG); Edema (E); Fused lamellae (FL); Hemocytes (HC); Hemocytic infiltration (HI); Hemocoelic space (HS); Hyperplasia (HY); Interlamellar space (IS); Lamella (L); Lifting lamellar of the cuticle (LLC); Necrosis (NC); Thickening of the lamellar (TL); Vacuole (V) and Peeling of the lamellar cuticle (PLC). A) Gill exposed to 0 mg L⁻¹ of nitrate (control) (10x, 10x H & E). B) Gill exposed to 0 mg L⁻¹ of nitrate (control) (20x, 10x H & E). C) Gill exposed to 50 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). D) Gill exposed to 100 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). E) Gill exposed to 500 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). F) Gill exposed to 1000 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). G) Gill exposed to 1500 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E). H) Gill exposed to 2000 mg L⁻¹ of nitrate (20x, 10x H & E).

4. DISCUSSÃO

Sistemas intensivos de produção com baixa ou nenhuma renovação de água são baseados no processo transformação de amônia e nitrito proveniente da excreção dos animais e decomposição de resíduos orgânicos em nitrato (nitrificação). Esse processo não remove os compostos nitrogenados da água, apenas o transforma, fazendo com que o nitrato alcance níveis tóxicos (Valenti and Mallasen, 2002). Na literatura, concentrações máximas tradicionalmente recomendadas para a produção de camarão de água doce variam de 20 à 80 mg L⁻¹ de nitrato (New, 2005; New et al., 2010). No entanto,

acreditamos que a literatura reporte valores de nível de segurança, o que indica que valores encontrados na literatura estão próximos ao encontrado no presente estudo (~16 à 107 mg.L⁻¹ de nitrato em relação ao tempo). Por outro lado, devido ao nitrato apresentar baixa toxicidade nos sistemas tradicionais, os estudos sobre seus efeitos tóxicos sobre camarões, principalmente os de água doce, foram negligenciados (Romano and Zeng, 2013). Em um estudo encontrado, proveniente de sistema de larvicultura que utiliza sistema fechado, Wickins (1976) observou que a LC_{50-48h} para pós-larvas de *M. rosenbergii* (0,05 g) é de 160 mg.L⁻¹ em água com 23.4°C. Ao comparar o presente estudo com o estudo realizado por Wickins (1976) nos parece que *M. amazonicum* é mais resistente que *M. rosenbergii* às concentrações de nitrato. Isto é proposto em virtude de o presente trabalho utilizar juvenis (~0,67g) durante exposição de 96 horas (155.45 mg.L⁻¹ de nitrato) e o trabalho de Wickins utilizar pós-larvas (~0,05) durante exposição de 48 horas (160 mg.L⁻¹ de nitrato). Miranda-Filho et al. (1995) afirmam que estágio de desenvolvimento mais jovens (larvas) são mais sensíveis do que os estágios mais velhos (adultos). Isto também foi observado por Dutra et al. (2016a,b). Portanto, *M. amazonicum* por já ser uma espécie que aceita intensificação (~80 camarões/m²) (Moraes-Valenti and Valenti, 2009) em relação *M. rosenbergii* (10 a 20 camarões/m²) (New et al., 2010) e por parecer suportar maiores níveis de nitrato. Faz com que a espécie seja mais adequada na substituição da espécie não nativa (*M. rosenbergii*) para produção em sistemas intensivos fechados.

O uso do *Iorg* mostrou ser efetivo ao demonstrar de forma numérica a extensão de um dano causado a estrutura branquial quando exposto a um composto por determinado tempo. É observado que conforme há o aumento na concentração de nitrato, há também o aumento na extensão e agravamento dos danos. Dutra et al. (2017) utilizaram esta mesma análise (*Iorg*) para verificação da extensão e agravamento dos danos em brânquias de juvenis de *M. amazonicum* exposto a amônia e nitrito durante 96 horas e observaram mesmo padrão observado no presente estudo.

Camarões tem como um dos principais órgãos vitais as brânquias, este órgão é responsável pela manutenção da vida do organismo por meio da realização das trocas gasosas, o equilíbrio ácido-básico e excreção (Henry et al., 2012). Por estarem em contato íntimo com o meio ambiente, estão também sujeitas a injúrias em sua estrutura causada por presença de substâncias tóxicas (Saravana Bhavan e Geraldine, 2000). Injúrias podem ocorrer em primeiro momento como uma reação de defesa contra um composto tóxico, por meio de respostas inflamatórias e aumento de área superficial (inchaço) (Erkmen e Kolankaya, 2000; Vegad, 2015). No presente estudo, observamos resposta inflamatória e aumento de área superficial em todos os tratamentos, sendo que acima de 100 mg L⁻¹ de nitrato danos mais graves como fusão lamelar, necrose, levantamento da cutícula e descamação da cutícula começaram a surgir. Alterações graves também foram descritas para pós-larva de *Litopenaeus vannamei* exposto a diferentes concentrações de nitrato, onde são observadas lesões como hiperplasia a partir das concentrações 150 mg.L⁻¹. Concentrações acima de 300 mg.L⁻¹ de nitrato foram

relacionadas com aumento na mortalidade e agravamento das lesões (Furtado et al., 2015). Romano e Zeng (2007) observaram que juvenile blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) exposto a concentrações superiores de 1000 mg.L⁻¹ de nitrato em 96 horas, apresentou alterações como Thickening of the lamellar, disrupted pillar cells, necrosis and distortion. Em estudos com ammonia and nitrite para juvenis de *M. amazonicum* exposto durante 96 horas, também foram encontradas lesões inflamatórias e aumento de área superficial em menores concentrações, onde também foram observadas baixa mortalidade. As lesões foram agravadas com o aumento da concentração, sendo observadas hiperplasia, fusão lamelar, necrose, aglomerado hemolítico, descamação do epitélio lamelar and levantamento do epitélio lamelar (Dutra et al. 2017).

Nos parece que altas concentrações de nitrato atuam de forma negativa no processo transporte de oxigênio, levando ao processo de hipóxia. Isto ocorre devido difusão do nitrato via mecanismo ativo de captação de cloreto e a entrada passiva (Cheng e Chen, 2001; Cheng and Chen, 2002a). O nitrato é então incorporado na hemolinfa, reduzindo o nível de oxi-hemocianina e aumentando o nível de desoxi-hemocianina, o que eleva a concentração de PO₂ (pressão parcial de oxigênio) e P50 (pressão parcial de O₂ que corresponde à metade da saturação da hemoglobina), indicando redução da afinidade por oxigênio (Cheng and Chen, 2002b)

Apesar de juvenis de *M. amazonicum* se mostrarem tolerantes ao nitrato, em sistemas fechados de produção ainda se faz necessário o emprego de filtros denitrificantes anaeróbicos ou o emprego de macrófitas aquáticas para a assimilação do nitrato para proporcionar o melhor desempenho produtivo sem a influência negativa do nitrato acumulado.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o camarão *M. amazonicum* tem potencial para ser criado em sistemas aquícolas fechados, porém com maiores cuidados com os compostos nitrogenados pois sua tolerância é menor ao nitrato comparadas com espécies de camarões peneídeos mas semelhantes as espécies de *Macrobrachium sp.* As brânquias sofreram alterações devido à exposição a níveis crescentes de nitrato e estas alterações foram agravadas pelo aumento da concentração e do tempo de exposição ao composto tóxico.

REFERÊNCIAS

- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. APHA, Washington D.C.
- ARECHAVALA-LOPEZ, P.; TOLEDO-GUEDES, K.; IZQUIERDO-GOMEZ, D.; ŠEGVIĆ-BUBIĆ, T.; SANCHEZ-JEREZ P. Implications of Sea Bream and Sea Bass Escapes for Sustainable Aquaculture Management: A Review of Interactions, Risks and Consequences. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 2017. doi: 10.1080/23308249.2017.1384789
- ASHLEY, P.J. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 2007. 104, 199-235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001
- 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. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; BAUMGARTNER, G.; BOND-BUCKUP, G. 1997. 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*, 14, 379-390. 1997. doi: 10.1590/S0101-81751997000200011
- BOYD, C.E. AND TUCKER, C.S. Pond aquaculture water quality management. Springer Science & Business Media. 2012.
- CHENG, S.Y., CHEN, J.C. The time-course change of nitrogenous excretion in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. *Aquatic Toxicology*. 51, 443–454. 2001. doi: 10.1016/S0166-445X(00)00122-3

CHENG, S.-Y.; CHEN, J.-C. Joint action of elevated ambient nitrite and nitrate on hemolymph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131, 303–314. 2002. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00004-2

CHENG, S.-Y.; CHEN, J.-C. Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid–base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology*, 61, 181-193. 2002. doi: 10.1016/S0166-445X(02)00053-X

CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270, 1-14. 2007 doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.006

DUTRA, F.M.; FREIRE, C.A.; VAZ DOS SANTOS, A.M.; FORNECK, S.C.; BRAZÃO, C.C.; BALLESTER, E.L.C. Acute toxicity of nitrite to various live stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97, 619-625. 2016. doi: 10.1007/s00128-016-1932-2

DUTRA, F.M.; FORNECK, S.C.; BRAZÃO, C.C.; FREIRE, C.A.; BALLESTER, E.L.C. 2016b. Acute toxicity of ammonia to various live stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture*, 453, 104-109. 2016. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.11.038

DUTRA, F.M.; SPONCHIADO D.; FORNECK, S.C.; RÖNNAU, M.; FREIRE, C.A.; BALLESTER, E.L.C. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology*, 187, 115–123. 2017. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.04.003

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64, 418-425. 2000. doi: 10.1007/s001280000017

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma. www.fao.org. 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Roma. www.fao.org/3/a-i5555e.pdf. 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Roma. www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf

FORNECK, S.C.; DUTRA, F.M.; ZACARKIM, C.E.; CUNICO, A.M. Invasion risks by non-native freshwater fishes due to aquaculture activity in a Neotropical stream. *Hydrobiologia*, 773, 193–205. 2016. doi: 10.1007/s10750-016-2699-5

FURTADO, P.S.; CAMPOS, B.R.; SERRA, F.P.; KLOSTERHOFF, M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY JR, W. Efeitos da toxicidade do nitrato no camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, criado com tecnologia de bioflocos (BFT). *Aquicultura Internacional*, 23: 315-327. 2015. doi: doi.org/10.1007/s10499-014-9817-z

GLIBERT, P.M.; WILKERSON, F.P.; DUGDALE, R.C.; RAVEN, J.A.; DUPONT, C.L.; LEAVITT, P.R.; PARKER, A.E.; BURKHOLDER J.M.; KANA, T. M. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnology and Oceanography*, 61, 165-197. 2016. doi: 10.1002/lno.10203

GAZOLA-SILVA, F.F.; MELO, S.G.; VITULE, J.R.S. *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae): possível introdução em um rio da planície litorânea paranaense (PR, Brasil). *Acta Biologica Paranaense*, 36, 83-90. 2007. doi:10.5380/abpr.v36i0.12295.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11, 714-719. 1977. doi: 10.1021/es60130a004

HARGREAVES, J.A.; TUCKER, C.S. Managing Ammonia in Fish Ponds. Vol. 4603. Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center. 2004.

HENRY, R.P.; LUCU, C.; ONKEN, H.; WEIHRAUCH, D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*. 3, 1-33. 2012. doi:10.3389/fphys.2012.0043

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos: teste para avaliação da mobilidade. Brasília, DF. 1990.

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

KUTTY, M. N.; VALENTI, W. C. Culture of other freshwater prawn species. In: New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D'Abramo, L.R., Kutt, M.N. (eds.), *Freshwater Prawns: Biology and Farming*, p 502-523. Wiley-Blackwell, Oxford. 2009. doi: 10.1002/9781444314649.ch23

LIGHTNER, D.V.; BELL, T.A. Handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 1998.

LOEBMANN, D.; MAI, A.C.G.; LEE, J.T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil. *Revista de Biología Tropical*, 58, 909-923. 2010.

LUCENA-FREDOU, F.; ROSA, J.S.; SILVA, M.C.N.; AZEVEDO, E.F. Population dynamics of the River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) on Combu island (Amazon estuary). *Crustaceana*, 83, 277-290, 2010.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. *Nauplius* 17, 61-79. 2009.

MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R.; EMERENCIANO, M.; MIRANDA-BAEZA, A.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7, 131-148. 2015. doi: 10.1111/raq.12058

MIRON, D.S.; MORAES, B.; BECKER, A.G.; CRESTANI, M.; SPANEVELLO, R.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*, 277, 192-196. 2008. doi: 0.1016/j.aquaculture.2008.02.023

MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Freshwater prawn farming in Brazilian Amazonia shows potential for economic and social development. *Global Aquaculture Advocate*, 4, 73–74. 2001.

MORAES-VALENTI, P.M.C., VALENTI, W.C. Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D'Abramo, L.R., Kutt, M.N. (eds.), *Freshwater Prawns: Biology and Farming*, p 485-501. Wiley-Blackwell, Oxford. 2009. doi: 10.1002/9781444314649.ch22

NEW, M.B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research*, 36, 210-230. 2005. doi: 10.1111/j.1365-2109.200501237.x

NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. *Freshwater prawns biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford. 2010. doi: 10.1002/9781444314649

PAEZ-OSUNA, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management*, 28, 131-140, 2001. 2001. doi: doi.org/10.1007/s002670010212

PELTIER, W.H., WEBER, C.L., *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*. EPA/600/4-85/013, third ed. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, p. 216. 1985.

ROMANO, N.; ZENG, C. Acute toxicity of sodium nitrate, potassium nitrate, and potassium chloride and their effects on the hemolymph composition and gill structure of early juvenile blue swimmer crabs (*Portunus pelagicus* linnaeus, 1758) (decapoda, brachyura, portunidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 01955–1962. 2007. doi: 10.1897/07-144R.1

ROMANO, N.; ZENG, C. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334-337, 12-23. 2012.

ROMANO, N.; ZENG, C. 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. 2013. doi: 10.1080/10641262.2012.753404

SARAVANA BHAVAN, P.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*. 50, 331-339. 2000. doi:10.1016/S0166-445X(00)00096-5

SILVA, E.C.; BARROS, F. Macrofauna bentônica introduzida no Brasil: lista de espécies marinhas e dulcícolas e distribuição atual, *Oecologia Australis*, 15, 326-344. 2011. doi: 10.4257/oeco.2011.1502.10.

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

VALENTI, W.C.; MALLASEN, M. Concentrações de amônia, nitrito e nitrato em larvicultura do camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), realizada em sistema fechado com água salobra natural e artificial. *Acta Scientiarum*, 24, 1185-1189. 2002. doi: 10.4025/actascianimsci.v24i0.2616.

VEGAD, J.L. *A Textbook of Veterinary General Pathology*. Cbs Publishers & Distributors, New Delhi. 2015.

[WICKINS, J.F.](#) The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture*, 9, 19-37. 1976. doi: 10.1016/0044-8486(76)90045-4