

WILKA VITÓRIA GRANJEIRO DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
COMPOSTOS NITROGENADOS NAS CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE
HEMÓCITOS DE JUVENIS DE *Macrobrachium rosenbergii***

Recife,

Dezembro/2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
COMPOSTOS NITROGENADOS NAS CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE
HEMÓCITOS DE JUVENIS DE *Macrobrachium rosenbergii***

WILKA VITÓRIA GRANJEIRO DO NASCIMENTO

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do Bacharel em Engenharia de Pesca.

**Prof^a. Dr^a. Suzianny Maria Bezerra
Cabral da Silva
Orientadora**

Recife,

Dezembro/2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N244aa NASCIMENTO, WILKA VITÓRIA GRANJEIRO DO
 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COMPOSTOS NITROGENADOS
 NAS CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE HEMÓCITOS DE JUVENIS DE *Macrobrachium rosenbergii* /
 WILKA VITÓRIA GRANJEIRO DO NASCIMENTO. - 2021.
 31 f.
- Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.
 Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
 Engenharia de Pesca, Recife, 2021.
1. Amônia. 2. Nitrito. 3. Nitrato . 4. Gigante da Malásia. 5. Contagem celular. I. Silva, Suzianny Maria Bezerra
 Cabral da, orient. II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
COMPOSTOS NITROGENADOS NAS CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE
HEMÓCITOS DE JUVENIS DE *Macrobrachium rosenbergii*

Wilka Vitória Granjeiro do Nascimento

ESO/TCC julgado adequada para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Pesca.
Defendida e aprovada em __/__/____ pela
seguinte Banca Examinadora.

Prof^ª. Dr^ª. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

(Orientadora)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Ferreira dos Santos

(Membro titular)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos

(Membro titular)

[Departamento de Medicina Veterinária]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Alfredo de Oliveira Gálvez

(Membro Suplente)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha vó (Ocidelia Pereira Granjeiro) e ao meu avô (João Bosco Granjeiro) pelos valores morais repassados e por sempre terem acreditado no meu potencial.

Agradecimentos

A Deus, meus orixás e guias espirituais.

A todos(as) da minha família Granjeiro, da família Santos e do Ilê Asé Olosum pelo suporte emocional desde o início do curso.

Ao Programa de Educação Tutorial Engenharia de Pesca pela bolsa concebida no período de 2019 – 2021 e as atividades desenvolvidas que agregaram na minha vida acadêmica e pessoal.

Aos docentes e funcionários do departamento do curso de Engenharia de Pesca pelos conhecimentos transmitidos, ajuda e suporte ao longo desses 5 anos.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva pela oportunidade, orientação na condução desse trabalho, ensinamentos e conselhos pessoais e profissionais.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) pelos momentos difíceis compartilhados, em especial, Allyne Elins e Flávia Abreu.

Aos meus amigos(as) da turma SP3, SP1 e da vida, em especial, Kleydson Oliveira, Chirley Silva, Yasmim Gomes, Allana Ferreira, Ayana Maria, Debora Carla, Samara Dantas, Letícia Fernandes, Luiz Guilherme e Marina Ferreira pelo companheirismo e positividade ao longo desse tempo.

A minha namorada Gisely Costa, por ser luz em minha vida e iluminar minha trajetória pessoal com sua presença. Gratidão também por todos os ensinamentos, paciência, orientações e “puxões de orelha”, sem a sua ajuda, eu não teria conseguido chegar até aqui!

Enfim, a todos (as) que participaram direta ou indiretamente na conclusão dessa jornada, acreditando no meu potencial e incentivando meus sonhos.

Resumo

O presente trabalho avaliou a influência das diferentes concentrações dos compostos nitrogenados nas contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH, respectivamente) de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* mantidos em sistema de água clara. Foram executados três experimentos com tempo de exposição de 96 horas (exposição aguda), onde diferentes concentrações dos compostos nitrogenados foram testadas: (1) amônia, nas concentrações de 0 (grupo controle), 1, 2 e 3,5 mg/L; (2) nitrito, nas concentrações de 0 (grupo controle), 1, 1,75 e 2,8 mg/L e; (3) nitrato, nas concentrações 0 (grupo controle), 10, 25 e 50 mg/L. Os animais foram acomodados em unidades experimentais com 11L, com 8 camarões por unidade, sob aeração constante e peso médio inicial de 0,2g. Os pontos de coletas da hemolinfa dos três experimentos foram 24h, 48h, 72h e 96h de exposição, onde os animais (1 por unidade experimental) tiveram a hemolinfa coletada para determinação das contagens total e diferencial de hemócitos. Ao final dos três experimentos, os resultados obtidos das altas concentrações de amônia a 3,5mg/L, de nitrito a 2,8 mg/L e de nitrato a 50 mg/L demonstraram que os valores médios referentes a contagem total de hemócitos foram $7,00 \times 10^5$, $3,38 \times 10^5$ e $4,13 \times 10^5$ células/mL respectivamente, abaixo da faixa recomendada para a espécie. Para a contagem diferencial de hemócitos, nesse estudo foram identificados os três tipos de células, hialinas, semi-granulares e granulares, contudo, os percentuais variaram de acordo com os pontos de coletas dos experimentos, sendo encontrado após 96 horas de exposição os seguintes valores médio: para as células hialinas de 64,37%, 88,4% e 90,89%, para as células semi-granulares 35,63%, 10,5% e 8,17% e, para as células granulares, 0%, 1,07% e 0,94% para os tratamentos 3,5mg/L do experimento da amônia, 2,8mg/L do experimento do nitrito e 50mg/L do experimento do nitrato, respectivamente. Os resultados demonstram que as contagens total e diferencial de hemócitos são influenciadas pelas altas concentrações dos compostos nitrogenados e o tempo de exposição, sendo a concentração 2,8mg/L do nitrito e 50mg/L do nitrato, ambas após 48 horas de exposição, as responsáveis pelas maiores alterações nestes parâmetros nos animais.

Palavras-chave: Amônia, Nitrito, Nitrato, Gigante da Malásia; Contagem celular.

Lista de figuras

Figura 1. Contagem Diferencial de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações da amônia.....	21
Figura 2. Contagem Diferencial de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de nitrito.....	23
Figura 3. Contagem Diferencial de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações do nitrato.....	25

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água dos experimentos.....	13
Tabela 2. Contagem Total de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de amônia	14
Tabela 3. Contagem Total de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de nitrito	16
Tabela 4. Contagem Total de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de nitrato.....	17

SUMÁRIO

Dedicatória.....	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
1 Introdução.....	9
2 Objetivos	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 Metodologia	10
3.1 Condições experimentais	10
3.2 Coleta da hemolinfa	11
3.3 Contagem total e diferencial de hemócitos	11
3.4 Análise estatística	12
4 Resultados e discussão	12
5 Considerações finais.....	26
6 Referências	27

1 Introdução

A carcinicultura de água doce é uma das atividades econômicas do setor da aquicultura que mais crescem globalmente, tendo o camarão da espécie *Macrobrachium rosenbergii* como um dos mais cultivados no mundo (KIMPARA et al., 2019). Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2020), a criação do *M. rosenbergii* foi responsável por aproximadamente 49% (234,4 mil toneladas) da produção mundial do gênero *Macrobrachium* em 2018.

O Gigante da Malásia, *M. rosenbergii*, possui hábitos alimentar onívoro, rápido crescimento em sistemas intensivos, rusticidade e boa aceitação no mercado (NUNES et al., 2018), mas apesar destas características, a espécie é considerada territorialista e agressiva, sendo um obstáculo a implementação de altas densidades de estocagem, embora recentes estudos relacionados a sistemas de cultivos superintensivos da carcinicultura de água doce demonstrem a possibilidade de intensificar a produção, podendo chegar a densidades de até 50 camarões/m² (BALLESTER et al., 2017; DUTRA; BORGES NETO; et al., 2016; NEGRINI et al., 2017).

Entretanto, sistemas de cultivo com maiores densidades podem ocasionar o acúmulo de substâncias inorgânicas tóxicas, como é o caso dos compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) que podem afetar a qualidade de água do cultivo e, conseqüentemente, a homeostase dos animais (DUTRA; et al., 2017; TIMMONS; EBELING, 2007). A amônia é o principal composto proveniente do metabolismo de proteínas excretada pelos organismos aquáticos e se encontra disponível na água por duas formas: o amônio (NH₄⁺), sendo menos tóxica e, a não ionizada (NH₃), a forma mais tóxica (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; TIMMONS; EBELING, 2007). A amônia não ionizada possui a capacidade de adentrar as membranas celulares e influenciar no crescimento, alimentação, sobrevivência e até na susceptibilidade de doenças em camarões (CUI Y et al., 2017; QIU et al., 2018; YANG et al., 2014).

O nitrito e o nitrato são produtos da oxidação da amônia por bactérias nitrificantes e, a presença desses compostos nitrogenados em elevadas concentrações, pode causar problemas hemolinfáticos. Contudo, as piores conseqüências são em relação a concentrações letais de nitrito, devido a sua atuação no processo de transporte de oxigênio, ao qual transforma hemocianina em metacianina, sendo assim, umas das formas de se avaliar os efeitos dos compostos nitrogenados

em crustáceos é através das respostas imunológicas (BARBIERI et al., 2016; CAMPOS et al., 2015; KUBITZA, 2017; THURSTON, 1980).

Os crustáceos possuem apenas uma imunidade inata, sendo, portanto, a produção/liberação de hemócitos na hemolinfa uma das respostas imunológicas mais importantes (ELLIS et al., 2011). Com isso, os hemogramas realizados nesses crustáceos podem ser determinados através das contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH respectivamente), que além de serem consideradas um dos principais parâmetros imunológicos, expressam a condição de saúde desses animais e são também importantes ferramentas para compreender os efeitos dos compostos nitrogenados em decápodes (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; CHENG; CHEN, 2001; PINTO et al., 2016).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência de diferentes concentrações dos compostos nitrogenados na contagem de hemócitos de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a contagem total e diferencial de hemócitos de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* mantidos em sistemas de água clara submetidos a diferentes concentrações de amônia, nitrito e nitrato.

3 Metodologia

3.1 Condições experimentais

Os juvenis de *M. rosenbergii* (peso médio inicial de 0,2 g) foram adquiridos de uma larvicultura comercial e distribuídos aleatoriamente em unidades experimentais de 11L de volume útil, abastecidas com água doce filtrada a 100 µm e previamente tratada com cloro a 30 ppm, na densidade de 3 camarão / 4L sob aeração constante.

As unidades experimentais foram mantidas com alcalinidade e dureza acima de 60 mg de CaCO₃/L e temperatura de 28°C. Os camarões foram alimentados com ração comercial duas vezes

ao dia (8 e 16 horas), sendo a quantidade ofertada ajustada de acordo com a estimativa de consumo, mortalidades e sobras segundo metodologia de New e Kutty (2010).

Três experimentos foram conduzidos, onde se buscou testar concentrações consideradas tóxicas dos compostos nitrogenados: (1) amônia, nas concentrações de 0 mg/L (grupo controle), 1, 2 e 3,5 mg/L; (2) nitrito, nas concentrações 0 mg/L (grupo controle), 1, 1,75 e 2,8 mg/L e; (3) nitrato, nas concentrações de 0 mg/L (grupo controle), 10, 25 e 50 mg/L. Todos contaram com três repetições cada, e um período de 96 horas de exposição, sendo utilizado o cloreto de amônio P.A, o nitrito de sódio P.A e o nitrato de sódio P.A para chegar nas concentrações desejadas. Uma solução mãe de maior concentração da amônia a 3,5mg/L (141mg de cloreto de amônio P.A), do nitrito a 2,8mg/L (113mg de nitrito de sódio P.A) e nitrato a 50mg/L (200mg de nitrito de sódio P.A) era obtida a partir da dissolução dos compostos químicos em 40 L de água do cultivo, sendo distribuída do mais concentrado para o menos concentrado. A limpeza das unidades foi feita através de sifonamento, com retirada de 10% do volume útil, sendo posteriormente renovados com as respectivas soluções de cada unidade experimental.

Para o monitoramento das variáveis de qualidade de água dentro dos limites ideais para carídeos propostos por New e Kutty (2010), foram realizadas mensurações de temperatura (°C), pH e oxigênio dissolvido (O.D.) duas vezes ao dia. As coletas de amostras de água foram diárias, para confirmação das concentrações de amônia, nitrito e, nitrato dentro dos valores testados, por meio de kit colorimétrico comercial (Alcon Labcon, Camboriú, Brasil).

3.2 Coleta da hemolinfa

As coletas da hemolinfa foram realizadas em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Os animais (três por unidade experimental) tiveram a hemolinfa coletada para determinação da contagem total e diferencial de hemócitos segundo Cheng e Chen (2001). A hemolinfa foi coletada na cavidade cardíaca de *M. rosenbergii* usando uma seringa de 1 ml contendo anticoagulante (0,114 M de citrato de sódio, 0,1 M de NaCl, pH 7,45) na proporção de 1:9 (v:v; hemolinfa:anticoagulante) (CHENG; CHEN, 2001).

3.3 Contagem total e diferencial de hemócitos

A contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada a partir da hemolinfa previamente coletada com anticoagulante e uma gota desta suspensão foi adicionada na câmara de Neubauer

para o cômputo das células (CHENG; CHEN, 2001). A determinação do número de hemócitos foi efetuada em triplicata usando um microscópio óptico.

Para a determinação da contagem diferencial de hemócitos (CDH) foi adotada a metodologia adaptada de Celi et al. (2013). Nesta metodologia, uma gota da suspensão de células de hemócitos fixada em formol 4% é posta em uma lâmina e seca ao ar, em seguida, a lâmina é imersa em metanol absoluto por 6 minutos. Depois disso, é corada com a solução de Giemsa (diluição 1:10 por 10 minutos), desidratada com etanol a 70% por 1 minuto e imersa em xileno absoluto por 6 minutos. A determinação das porcentagens relativas dos diferentes tipos de hemócitos foi efetuada através de observação da lâmina em microscopia ótica, também em triplicata.

3.4 Análise estatística

Os resultados das contagens total e diferencial foram submetidos aos testes de homogeneidade (teste de Levene), normalidade (teste de Shapiro–Wilk) e, para identificar a diferenças entre tratamentos, foram submetidos à ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey (HSD - Honest Significant Difference), quando atendido os preceitos. Para dados não paramétricos, foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Mann-Whitney (Comparação Pairwise) com a correção de Bonferroni (ZAR, 2013).

Para a comparação ao longo do tempo entre coletas, foi feito a ANOVA de medidas repetidas quando atendido os preceitos, ou teste de Friedman como alternativa não paramétrica (ZAR, 2013). Para todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software IBM SPSS Statistics versão 25.0.0.0.

4 Resultados e discussão

Os resultados das variáveis de qualidade de água ao longo dos três experimentos demonstraram estar dentro do recomendável para o *M. rosenbergii* (NEW; KUTTY, 2010), diferindo estatisticamente apenas o oxigênio dissolvido (OD) entre os tratamentos com diferentes concentrações de amônia (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água dos experimentos

Variáveis	Tratamentos			
	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)
EXPERIMENTO AMÔNIA				
	0	1	2	3,5
OD (mg/L)	6,6 ± 0,1 (6,4 – 6,7) ^{AB}	6,6 ± 0,1 (6,6 – 6,9) ^A	6,5 ± 0,1 (6,4 – 6,7) ^B	6,5 ± 0,1 (6,4 – 6,8) ^B
pH	7,69 ± 0,08 (7,60 – 7,80) ^A	7,68 ± 0,09 (7,60 – 7,80) ^A	7,74 ± 0,10 (7,60 – 7,90) ^A	7,73 ± 0,05 (7,70 – 7,80) ^A
Temp (°C)	30,2 ± 0,3 (30,0 – 30,8) ^A	30,1 ± 0,1 (30,0 – 30,3) ^A	30,2 ± 0,3 (30,0 – 30,9) ^A	30,3 ± 0,4 (30,0 – 31,0) ^A
Amônia (mg/L)	0 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	3,5 ± 0
Nitrito (mg/L)	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A
Nitrato (mg/L)	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A
EXPERIMENTO NITRITO				
	0	1	1,75	2,8
OD (mg/L)	6,52 ± 0,14 (6,40 – 6,80) ^A	6,58 ± 0,22 (6,30 – 6,90) ^A	6,63 ± 0,22 (6,20 – 6,80) ^A	6,47 ± 0,18 (6,20 – 6,70) ^A
pH	7,7 ± 0,1 (7,5 – 7,8) ^A	7,7 ± 0,1 (7,5 – 7,8) ^A	7,7 ± 0,1 (7,5 – 7,8) ^A	7,7 ± 0,1 (7,5 – 7,8) ^A
Temp (°C)	30,1 ± 0,4 (29,6 – 30,5) ^A	29,8 ± 0,5 (29,1 – 30,4) ^A	30,0 ± 0,2 (29,8 – 30,2) ^A	29,9 ± 0,3 (29,6 – 30,4) ^A
Amônia (mg/L)	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0,13 ± 0,14 (0 – 0,25) ^A	0,13 ± 0,14 (0 – 0,25) ^A
Nitrito (mg/L)	0 ± 0	1 ± 0	1,75 ± 0	2,8 ± 0
Nitrato (mg/L)	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A
EXPERIMENTO NITRATO				
	0	10	25	50
OD (mg/L)	6,5 ± 0,2 (6,1 – 6,8) ^A	6,5 ± 0,2 (6,1 – 6,8) ^A	6,5 ± 0,2 (6,2 – 6,8) ^A	6,5 ± 0,2 (6,2 – 6,7) ^A
pH	7,8 ± 0,1 (7,7 – 7,9) ^A	7,7 ± 0 ^B	7,8 ± 0 ^A	7,9 ± 0,1 (7,8 – 8,0) ^A
Temp (°C)	29,7 ± 0,6 (29,1 – 30,8) ^A	29,3 ± 0,5 (28,8 – 30,3) ^A	29,6 ± 0,9 (28,1 – 30,8) ^A	30,0 ± 0,7 (29,1 – 30,9) ^A
Amônia (mg/L)	0 ± 0 ^A	0,08 ± 0,29 (0 – 1) ^A	0,02 ± 0,07 (0 – 0,25) ^A	0 ± 0 ^A
Nitrito (mg/L)	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A	0 ± 0 ^A
Nitrato (mg/L)	0 ± 0	10 ± 0	25 ± 0	50 ± 0

¹Letras maiúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença entre os tratamentos (p≤0,05). **OD** = Oxigênio dissolvido; **Temp** = Temperatura.

Para a contagem total de hemócitos (CTH) no experimento de diferentes concentrações de amônia na coleta 24h, o tratamento controle (0 mg/L) obteve a maior contagem total dentre os demais, e o tratamento 1mg/L diferiu estatisticamente das maiores concentrações (2 e 3,5mg/L), que não apresentaram diferença entre si. Após 48 horas de exposição, foi observado um aumento das médias da CTH dos tratamentos 1, 2 e 3,5mg/L, destacando o tratamento 2mg/L, o qual apresentou um valor médio de $2,34 \times 10^6 \pm 3,63 \times 10^5$ células/mL diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (0 mg/L) e 1mg/L (Tabela 2).

Tabela 2. Contagem Total de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de amônia

Variáveis	Tratamentos			
	0	1	2	3,5
	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)
24H				
	$1,01 \times 10^6 \pm 9,76 \times 10^5$ ($2,25 \times 10^5$ – $2,59 \times 10^6$) ^{ABa}	$2,38 \times 10^5 \pm 7,37 \times 10^4$ ($1,13 \times 10^5$ – $3,38 \times 10^5$) ^{Aa}	$8,75 \times 10^5 \pm 5,72 \times 10^5$ ($4,50 \times 10^5$ – $1,84 \times 10^6$) ^{Ba}	$6,25 \times 10^5 \pm 1,49 \times 10^5$ ($4,13 \times 10^5$ – $8,25 \times 10^5$) ^{Ba}
48H				
Contagem Total de Hemócitos (Células/mL)	$6,93 \times 10^5 \pm 2,23 \times 10^5$ ($4,13 \times 10^5$ – $9,38 \times 10^5$) ^{Aa}	$7,95 \times 10^5 \pm 5,17 \times 10^5$ ($4,13 \times 10^5$ – $1,50 \times 10^6$) ^{ABab}	$2,34 \times 10^6 \pm 3,63 \times 10^5$ ($1,95 \times 10^6$ – $2,81 \times 10^6$) ^{Ba}	$1,31 \times 10^6 \pm 9,18 \times 10^5$ ($6,38 \times 10^5$ – $2,96 \times 10^6$) ^{ABa}
72H				
	$4,97 \times 10^5 \pm 2,40 \times 10^5$ ($2,25 \times 10^5$ – $7,50 \times 10^5$) ^{ABa}	$3,69 \times 10^5 \pm 1,80 \times 10^5$ ($1,88 \times 10^5$ – $6,00 \times 10^5$) ^{ABab}	$1,11 \times 10^6 \pm 3,71 \times 10^5$ ($6,38 \times 10^5$ – $1,50 \times 10^6$) ^{Aa}	$1,03 \times 10^5 \pm 6,40 \times 10^4$ ($3,75 \times 10^4$ – $1,88 \times 10^6$) ^{Ba}
96H				
	$3,53 \times 10^6 \pm 8,23 \times 10^5$ ($2,59 \times 10^6$ – $4,43 \times 10^6$) ^{Aa}	$2,86 \times 10^6 \pm 5,65 \times 10^5$ ($2,29 \times 10^6$ – $3,45 \times 10^6$) ^{Ab}	$4,59 \times 10^5 \pm 2,19 \times 10^5$ ($1,88 \times 10^5$ – $7,13 \times 10^5$) ^{Ba}	$7,00 \times 10^5 \pm 5,18 \times 10^5$ ($1,13 \times 10^5$ – $1,43 \times 10^6$) ^{Ba}

¹Letras maiúsculas na mesma linha mostram diferença entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

²Letras minúsculas na mesma coluna mostram diferença entre pontos de coleta (ao longo do tempo) ($p \leq 0,05$).

Com 72 horas de exposição a diferentes concentrações de amônia, houve uma queda nos valores médios da CTH, com ênfase ao tratamento 3,5mg/L que apresentou o menor valor de contagem e a maior queda quando comparado a coleta às 48 horas. Completadas as 96 horas de exposição, os tratamentos 2 e 3,5mg/L obtiveram os menores valores médios da CTH, não apresentando diferença significativa entre si, assim como, o tratamento controle (0mg/L) e 1mg/L também não diferiram estatisticamente. Quando comparada as coletas 24 e 96 horas, o efeito da exposição de diferentes concentrações de amônia ao longo do tempo teve diferenças significativas apenas para o tratamento 1mg/L.

No experimento de diferentes concentrações de nitrito, para os valores médios da contagem total de hemócitos (CTH) na coleta 24 horas, o tratamento 1mg/L obteve a maior contagem total dentre os demais. Após 48 horas de exposição, foi observado um aumento na média da CTH do tratamento 1,75mg/L, que apresentou um valor médio de $1,88 \times 10^6 \pm 3,00 \times 10^5$ células/mL, diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (0mg/L) e 2,8mg/L (Tabela 3).

Com 72 horas de exposição a diferentes concentrações de nitrito, houve uma queda nos valores médios da CTH dos tratamentos 1, 1,75 e 2,8mg/L, com ênfase ao tratamento 1,75mg/L que apresentou o menor valor de contagem e a maior queda quando comparado a coleta às 48 horas. Completadas as 96 horas de exposição, o tratamento 2,8mg/L obteve um dos menores valores médios da CTH, apresentando diferença significativa entre os demais. Contudo, os tratamentos 1 e 1,75mg/L que apresentaram alta dos valores médios da CTH não diferiram estatisticamente. Quando comparada as coletas 24 e 96 horas, o efeito da exposição de diferentes concentrações do nitrito apresentou diferenças significativas apenas no tratamento 2,8mg/L (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem Total de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de nitrito

Variáveis	Tratamentos			
	0	1	1,75	2,8
	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)
Contagem Total de Hemócitos (Células/mL)	24H			
	1,64x10 ⁶ ± 7,35x10 ⁵ (6,00x10 ⁵ – 2,33x10 ⁶) ^{Aa}	2,25x10 ⁶ ± 1,04x10 ⁶ (1,58x10 ⁶ – 3,45x10 ⁶) ^{Aa}	1,39x10 ⁶ ± 3,48x10 ⁵ (1,05x10 ⁶ – 1,69x10 ⁶) ^{Aa}	1,15x10 ⁶ ± 5,24x10 ⁵ (7,13x10 ⁵ – 1,88x10 ⁶) ^{Aa}
	48H			
	1,16x10 ⁶ ± 1,73x10 ⁵ (1,01x10 ⁶ – 1,31x10 ⁶) ^{Aa}	9,00x10 ⁵ ± 3,00x10 ⁵ (3,75x10 ⁵ – 1,20x10 ⁶) ^{ABab}	1,88x10 ⁶ ± 1,65x10 ⁶ (2,63x10 ⁵ – 3,71x10 ⁶) ^{ABa}	3,38x10 ⁵ ± 1,27x10 ⁵ (1,88x10 ⁵ – 5,25x10 ⁵) ^{Bb}
	72H			
1,60x10 ⁶ ± 7,51x10 ⁵ (5,63x10 ⁵ – 2,25x10 ⁶) ^{Aa}	3,75x10 ⁵ ± 1,76x10 ⁵ (1,88x10 ⁵ – 5,25x10 ⁵) ^{Bb}	3,09x10 ⁵ ± 2,09x10 ⁵ (1,13x10 ⁵ – 5,25x10 ⁵) ^{Bb}	3,38x10 ⁵ ± 1,19x10 ⁵ (2,25x10 ⁵ – 4,88x10 ⁵) ^{Bb}	
96H				
7,59x10 ⁵ ± 4,19x10 ⁵ (3,38x10 ⁵ – 1,31x10 ⁶) ^{ABa}	1,73x10 ⁶ ± 1,05x10 ⁶ (5,25x10 ⁵ – 3,26x10 ⁶) ^{Aab}	1,36x10 ⁶ ± 4,89x10 ⁵ (8,25x10 ⁵ – 2,18x10 ⁶) ^{Aa}	4,13x10 ⁵ ± 8,10x10 ⁴ (3,38x10 ⁵ – 5,25x10 ⁵) ^{Bb}	

¹Letras maiúsculas na mesma linha mostram diferença entre os tratamentos (p≤0,05).

²Letras minúsculas na mesma coluna mostram diferença entre pontos de coleta (ao longo do tempo) (p≤0,05).

No experimento de diferentes concentrações de nitrato, para os valores médios da CTH na coleta 24 horas, não foi observada diferença entre os tratamentos. Após 48h de exposição de nitrito, foi observado uma diminuição das médias da CTH de todos os tratamentos, destacando o tratamento 50mg/L que apresentou um valor médio de 2,75x10⁵ ± 1,64x10⁵ diferindo dos tratamentos controle (0mg/L) e 10mg/L (Tabela 4).

Nas 72 horas de exposição a diferentes concentrações de nitrato, houve um aumento nos valores médios da CTH, com ênfase para os tratamentos 25 e 50mg/L que apresentaram um maior aumento na contagem quando comparado à coleta de 48 horas. Com o final das 96 horas de exposição, os tratamentos 10, 25 e 50mg/L tiveram os menores valores médios da CTH, não apresentando diferença significativa entre si. Quando comparada às coletas 24 e 96 horas, o efeito da exposição de diferentes concentrações de nitrato ao longo do tempo apresentou diferença significativa nos tratamentos 10, 25 e 50mg/L (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem Total de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de nitrato.

Variáveis	Tratamentos			
	0	10	25	50
Contagem Total de Hemócitos (Células/mL)	24H			
	1,92x10 ⁶ ± 1,77x10 ⁶ (4,13x10 ⁵ – 4,50x10 ⁶) ^{Aa}	2,37x10 ⁶ ± 1,06x10 ⁶ (1,39x10 ⁶ – 3,75x10 ⁶) ^{Aa}	1,18x10 ⁶ ± 8,70x10 ⁵ (3,00x10 ⁵ – 2,25x10 ⁶) ^{Aa}	1,04x10 ⁶ ± 7,59x10 ⁵ (1,88x10 ⁵ – 1,95x10 ⁶) ^{Aa}
	48H			
	1,03x10 ⁶ ± 2,49x10 ⁵ (7,13x10 ⁵ – 1,39x10 ⁶) ^{Aa}	1,63x10 ⁶ ± 3,57x10 ⁵ (1,28x10 ⁶ – 2,00x10 ⁶) ^{Ba}	4,69x10 ⁵ ± 3,74x10 ⁵ (7,50x10 ⁴ – 1,01x10 ⁶) ^{Cb}	2,75x10 ⁵ ± 1,64x10 ⁵ (7,50x10 ⁴ – 4,50x10 ⁵) ^{Cb}
72H				
	4,38x10 ⁵ ± 3,17x10 ⁵ (1,13x10 ⁵ – 9,38x10 ⁵) ^{Aa}	1,17x10 ⁶ ± 3,16x10 ⁵ (8,63x10 ⁵ – 1,46x10 ⁶) ^{ABa}	1,27x10 ⁶ ± 1,35x10 ⁵ (1,09x10 ⁶ – 1,39x10 ⁶) ^{Ba}	1,78x10 ⁶ ± 6,23x10 ⁵ (1,13x10 ⁶ – 2,55x10 ⁶) ^{Ba}
96H				

$1,05 \times 10^6 \pm 3,06 \times 10^5$ ($7,50 \times 10^5 - 1,35 \times 10^6$) ^{Aa}	$1,66 \times 10^5 \pm 1,63 \times 10^4$ ($1,50 \times 10^5 - 1,88 \times 10^5$) ^{Bb}	$2,80 \times 10^5 \pm 9,29 \times 10^4$ ($1,95 \times 10^5 - 4,13 \times 10^5$) ^{Bb}	$4,50 \times 10^5 \pm 1,44 \times 10^5$ ($2,25 \times 10^5 - 6,00 \times 10^5$) ^{Bb}
--	---	---	---

¹Letras maiúsculas na mesma linha mostram diferença entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

²Letras minúsculas na mesma coluna mostram diferença entre pontos de coleta (ao longo do tempo) ($p \leq 0,05$).

A concentração média da contagem total de hemócitos (CTH) para diferentes espécies são descobertas através de estudos ecotoxicológicos dos indivíduos selvagens capturados ou através da submissão a condições experimentais. Para a espécie *M. rosenbergii*, estudos relacionados aos efeitos toxicológicos da exposição de amônia, nitrito e nitrato demonstram consequências adversas, principalmente quando estes animais são submetidos por um período de 96 horas de exposição (CHAND; SAHOO, 2006). De acordo com Zhang et al. (2015), os exemplares adultos de *M. rosenbergii* expostos ao nitrito tiveram pouca mudança fisiológica quando comparados aos animais expostos a amônia, contudo, esses compostos nitrogenados causaram uma série de estresse oxidativo combinado e apoptose em hemócitos no *M. rosenbergii*. Entretanto, no presente estudo após 96 horas de exposição dos compostos nitrogenados, o nitrito e nitrato tiveram baixas contagens celulares, podendo indicar que foram mais prejudiciais para os juvenis de *M. rosenbergii*.

Para outros crustáceos, como é o caso do decapoda *Astacus leptodactylus*, Sepici-dinçel et al. (2013) e Safaeian et al. (2019) encontraram os intervalos de referência média da CTH de $3,83 \times 10^4$ e $5,3 \times 10^4$ células/mL, respectivamente, quando esta espécie foi avaliada para o desenvolvimento e padronização da análise da hemolinfa como uma ferramenta de diagnóstico viável para estudos de bioensaio e aquicultura. Já para o peneídeo *P. vannamei*, os valores médios da CTH são considerados bons quando estão entre 10×10^6 a 15×10^6 células/mL (BARRETTO et al., 2012), quando estes animais estão em condições de cultivo.

No presente estudo, para o tempo máximo de exposição (96 horas), foram encontrados os valores médios $3,53 \times 10^6$ e $2,86 \times 10^6$ cél/mL nos tratamentos controle (0mg/L) e 1mg/L do experimento 1 (amônia) respectivamente, nos tratamentos 1 e 1,75mg/L do experimento 2 (nitrito) os valores médios foram $1,73 \times 10^6$ e $1,36 \times 10^6$ cél/mL respectivamente, para o tratamento controle (0 mg/L) do experimento 3 (nitrato), o valor médio foi de $1,05 \times 10^6$ cél/mL, podendo-se inferir uma

alteração na contagem total de hemócitos causada pela exposição contínua da amônia nos tratamentos 2 e 3,5mg/L, do nitrito no tratamento 2,8 mg/L e do nitrato nos tratamentos 10, 25 e 50mg/L. Tais resultados de contagem de hemócitos estão em consonância com o estudo realizado por Pinto et al. (2016) sobre os efeitos do estresse de amônia no *Macrobrachium amazonicum* onde foi visto que quanto maior as concentrações de amônia menor a contagem total de hemócitos. Em relação aos resultados de nitrito, em um estudo realizado por Xian et al. (2011) foi verificado que a exposição ao nitrito nas concentrações 10 e 20 mg/L induz à redução na contagem de hemócitos em *Penaeus monodon*, devido a superprodução de espécies reativas do oxigênio (ROI), que então resultaria em danos no DNA e em apoptose celular, e subsequentemente causou a redução da CTH, efeito este encontrado no presente estudo. Estudos relacionados a exposição de nitrato em decapoda e seu efeito na contagem total de hemócitos não foram encontrados.

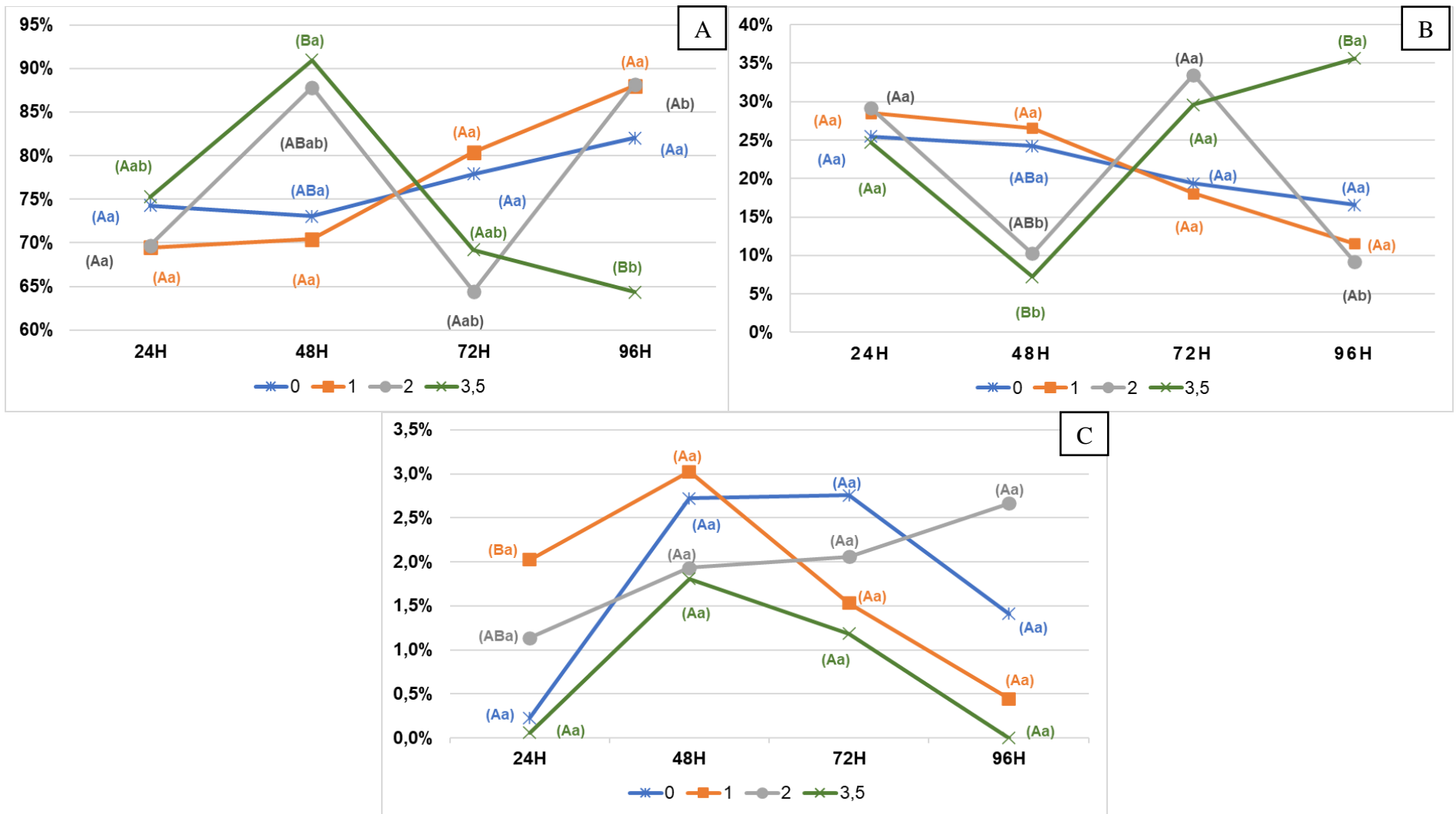
De acordo com Liang et al. (2016); Qiu et al. (2018); Zhou et al. (2018) quando os níveis dos compostos nitrogenados na água excedem o limite de tolerância dos camarões, podem ocorrer danos nos tecidos como brânquias e hepatopâncreas, bem como afetar a respiração, metabolismo, imunidade, regulação osmótica, excreção, muda e crescimento, formação de metacianina, causar hipoxia no tecido, prejudicar a respiração metabólica e deprimir a capacidade imunológica. Em *P. vannamei*, níveis elevados de amônia afetam a atividade de enzimas metabolizadoras da excreção da amônia (CUI Y et al., 2017; XIAO J et al., 2019). No final dos experimentos 1, 2 e 3, foi observado que os valores médios da contagem total de hemócitos (CTH) dos tratamentos de maiores concentrações (3,5, 2,8 e 50 mg/L, respectivamente) foram reduzindo quando comparados ao início da exposição, indicando resposta fisiológica do *M. rosenbergii*.

Em relação a contagem diferencial de hemócitos (CDH) do experimento de diferentes concentrações de amônia, os valores médios da contagem variaram de 64,4% a 90,96% para as células hialinas, 7,23% a 35,63% para as células semi-granulares e 0% a 3,03% para as células granulares (Figura 1). Com 24 horas de exposição, o tratamento 3,5mg/L de amônia teve a maior abundância na contagem das células hialinas e o menor valor médio da contagem das células semi-granulares e granulares. Dentre os resultados, apenas para o tratamento 1mg/L houve diferença significativa na contagem das células granulares (Figura 1). Completadas as 96 horas de exposição de amônia, apenas o tratamento 3,5 mg/L apresentou queda na contagem das células hialinas e alta na contagem das células semi-granulares, diferindo estatisticamente dos tratamentos controle

(0mg/L), 1 e 2mg/L. A maior contagem das células granulares foi no tratamento 2mg/L, em contrapartida, o tratamento 3,5mg/L não teve registro dessa célula (Figura 1).

Em relação do efeito da amônia ao longo do tempo, quando comparada as coletas de 24 e 96 horas, foram observadas diferenças significativas ao final do experimento nos tratamentos 2 e 3,5mg/L, para a contagem das células hialinas. Para as células semi-granulares, apenas o tratamento 2mg/L diferiu entre as coletas, e as células granulares não tiveram diferenças significativas nessa comparação ao longo do tempo (Figura 1).

Figura 1. Contagem Diferencial de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações da amônia.

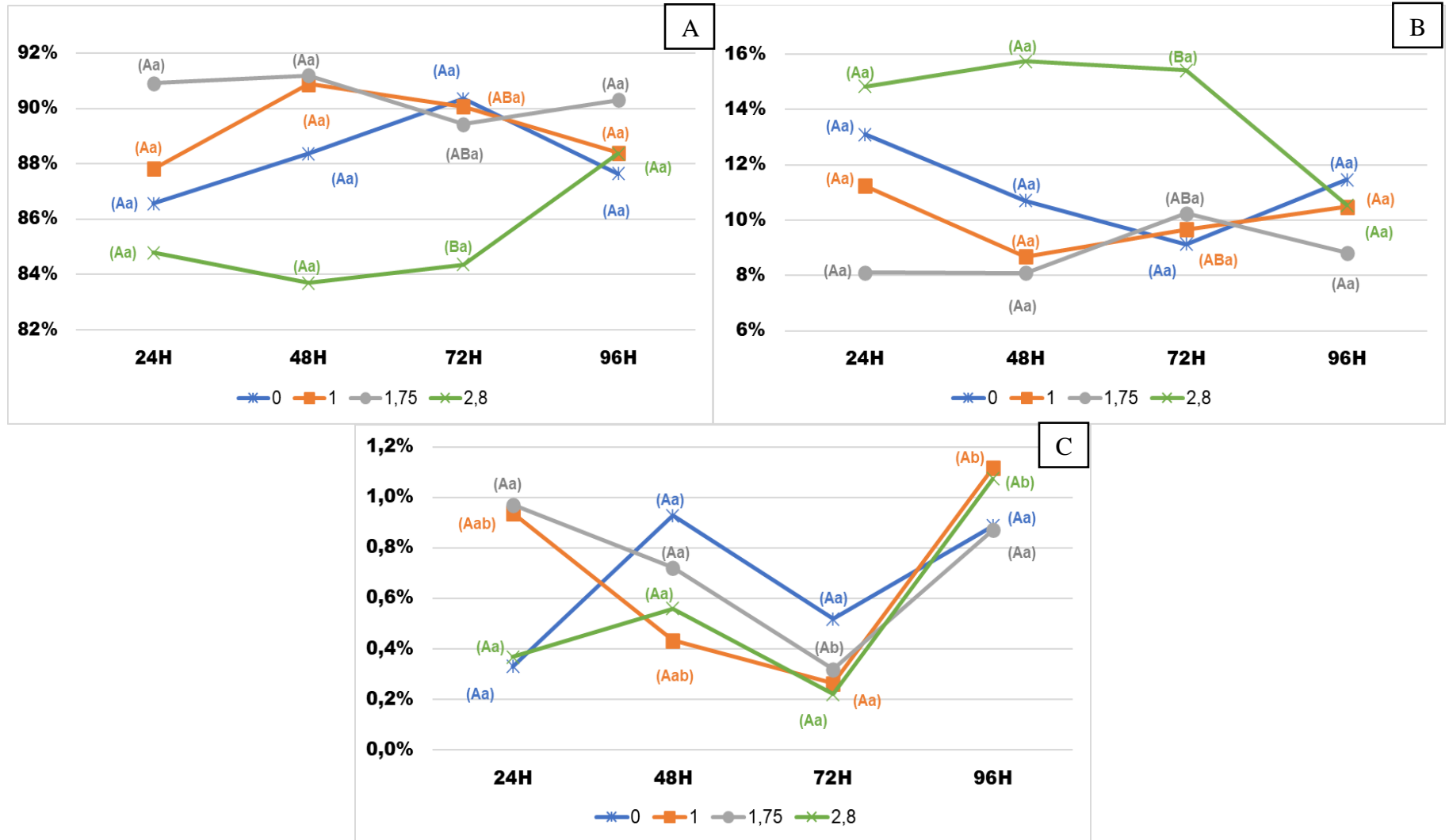


¹Letras maiúsculas mostram diferença entre os tratamentos e, letras minúsculas, mostram diferença entre pontos de coleta (ao longo do tempo) ($p \leq 0,05$). (A) células hialinas, (B) células semi-granulares e (C) células granulares.

Na contagem diferencial de hemócitos (CDH) do experimento de diferentes concentrações de nitrito, os valores médios da contagem variaram de 83,7% a 91,2% para as células hialinas, de 8,1% a 15,7% para as células semi-granulares e, de 0,22% a 1,12%, para as células granulares (Figura 2). Após 24 horas de exposição ao nitrito, o tratamento 1,75mg/L teve as maiores contagens das células hialinas e granulares, mas com a menor contagem das células semi-granulares, contudo, não foram identificadas diferenças entre os tratamentos (Figura 2).

No final do experimento 2, o tratamento 1,75 mg/L continuou com as maiores contagens das células hialinas e a menor contagem das células semi-granulares, não diferindo dos demais tratamentos. Nas células granulares, todos os tratamentos tiveram alta nas contagens, mas não diferiram entre si (Figura 2). Em relação ao efeito do nitrito nas células hialinas e semi-granulares ao longo do tempo, quando comparada as coletas 24 e 96 horas, não houve diferença significativa, sendo identificada diferença, apenas ao final do experimento, nos tratamentos 1 e 2,8mg/L para as células granulares.

Figura 2. Contagem Diferencial de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações de nitrito.

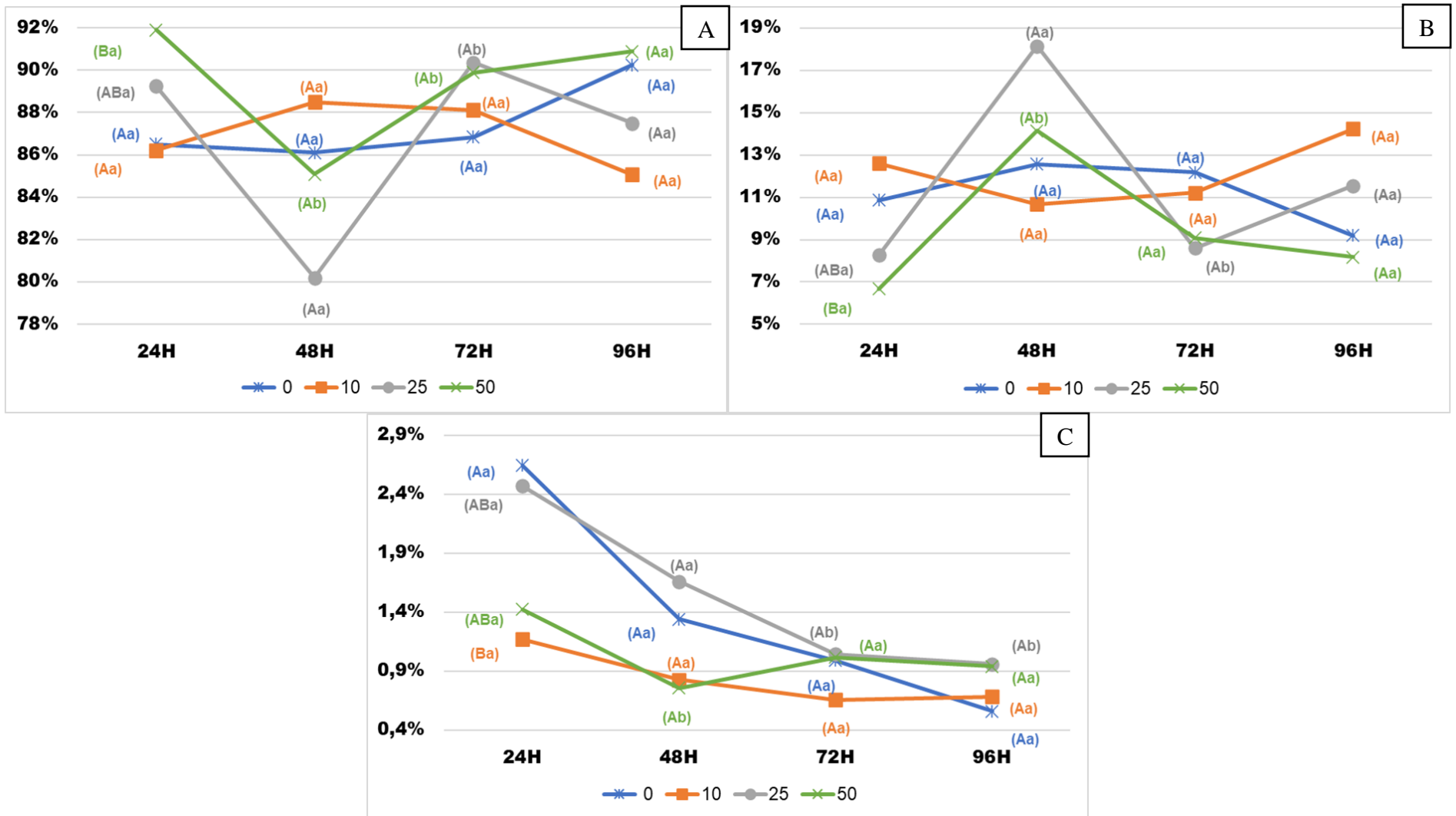


¹Letras maiúsculas mostram diferença entre os tratamentos e, letras minúsculas, mostram diferença entre pontos de coleta (ao longo do tempo) (A) células hialinas, (B) células semi-granulares e (C) células granulares

Na contagem diferencial de hemócitos (CDH) do experimento de diferentes concentrações de nitrato, os valores médios da contagem variaram de 80,19% a 91,90% para as células hialinas, de 6,68% a 18,15% para as células semi-granulares e, de 0,56% a 2,64%, para as células granulares (Figura 3).

Após 24 horas de exposição ao nitrato, o tratamento 50mg/L teve a maior contagem das células hialinas, mas com a menor contagem das células semi-granulares diferindo dos outros tratamentos (Figura 3). No final do experimento 3, o tratamento 50mg/L continuou com as maiores contagens das células hialinas e a menor contagem das células semi-granulares, não diferindo dos demais. Os tratamentos controle (0mg/L), 25 e 50mg/L tiveram queda nas contagens das células granulares, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3). Não foram determinadas diferenças significativas, para o efeito do nitrato ao longo do tempo, quando comparada as coletas 24 e 96 horas, para as células hialinas e semi-granulares, sendo identificada diferença, apenas ao final do experimento no tratamento 25mg/L, para as células granulares.

Figura 3. Contagem Diferencial de Hemócitos durante o experimento de diferentes concentrações do nitrato



¹Letras maiúsculas mostram diferença entre os tratamentos e, letras minúsculas, mostram diferença entre pontos de coleta (ao longo do tempo) ($p \leq 0,05$). (A) células hialinas, (B) células semi-granulares e (C) células granulares.

A classificação dos hemócitos em invertebrados aquáticos ainda não atingiu um padrão uniforme, no entanto, a maioria dos autores concordam na classificação das células em hialinas, granulares e semi-granulares, estando as hialinas relacionadas ao processo de iniciação da coagulação da hemolinfa, enquanto as granulares e semi-granulares, agem na defesa celular, sendo responsáveis pelos processos de fagocitose e encapsulação (HU et al., 2011; PARRINELLO et al., 2015; VÁZQUEZ et al., 1997; WU et al., 2019). No presente estudo foram encontrados os três tipos de células em todos os experimentos, contudo, variaram de acordo com os pontos de coletas.

De acordo com Sierra et al. (2001) as células hialinas são geralmente encontradas em maior abundância no sistema circulatório do *M. rosenbergii*, variando em torno de 70%, contudo, as células granulocíticas, semi-granulares e granulares, variam em torno de 25% e 5% respectivamente. No presente estudo, após 96 horas de exposição dos compostos nitrogenados em juvenis de *M. rosenbergii*, é visto que o tratamento de maior concentração da amônia (3,5mg/L) induziu a redução da contagem das células hialinas para 64,37%, as contagens das semi-granulares aumentaram para 35,63% e, as granulares, não foram registradas. O tratamento de maior concentração de nitrito (2,8mg/L) resultou em um aumento nas contagens das células hialinas e granulares para 88,4% e 1,07% respectivamente, mas a contagem das células semi-granulares diminuiu para 10,5%. O tratamento de maior concentração de nitrato (50mg/L) também resultou em um aumento nas contagens das células hialinas para 90,89%, contudo, as contagens das células semi-granulares e granulares diminuiu para 8,17% e 0,94%, respectivamente.

Diante do supracitado, nota-se que as contagens total e diferencial de hemócitos são influenciadas em relação as altas concentrações de amônia a 3,5mg/L, de nitrito a 2,8mg/L e de nitrato a 50mg/L. É observado também, que as contagens diante do tempo de exposição, para cada concentração, variaram entre os três experimentos, sendo significativa na contagem total de hemócitos (CTH) dos experimentos de nitrito e nitrato e, na contagem diferencial de hemócitos (CDH) de nitrato.

5 Considerações finais

Fundamentado nos resultados encontrados, conclui-se que as concentrações de amônia a 3,5mg/L, de nitrito a 2,8mg/L e de nitrato a 50mg/L influenciam nas contagens total e diferencial (CTH e CDH, respectivamente) de juvenis de *M. rosenbergii*, sendo as respectivas concentrações de nitrito e nitrato mais prejudiciais quando expostos a um período de 96 horas.

6 Referências

- BALLESTER, E. L. C. et al. Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 9, p. 4748–4755, 1 set. 2017.
- BARBIERI, E. et al. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 4, p. 1260–1268, 1 abr. 2016.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: Morales V, Cuéllar-Anjel J (Org.) **Guía Práctica – Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. 2ed. ed. Panamá: OIRSA: 2014.
- BARRETTO, A. C. G. et al. Influência da refrigeração na preservação do número total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados utilizando-se citrato de sódio. **Ciência Animal Brasileira**, p. 520–524, out. 2012.
- CAMPOS, B. R. DE et al. The chronic toxicity of ammonia, nitrite and nitrate on juvenile *Farfantepenaeus brasiliensis* (crustacea: decapoda). v. 41, n. 2, p. 261–269, 2015.
- CELI, M. et al. Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. **The Journal of experimental biology**, v. 216, n. Pt 4, p. 709–718, fev. 2013.
- CHAND, R. K.; SAHOO, P. K. Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1–4, p. 150–156, 31 ago. 2006.
- CHENG, W.; CHEN, J. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & shellfish immunology**, v. 11, n. 1, p. 53–63, 2001.
- CUI Y et al. Effects of ammonia-N stress on metabolic and immune function via the neuroendocrine system in *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 64, p. 270–275, 1 maio 2017.
- DUTRA, F.; BORGES NETO, P.; et al. Desempenho do camarão *Macrobrachium amazonicum* (heller, 1862) (crustacea: decapoda: palaemonidae), em diferentes densidades. **Rev. Bras. Eng. Pesca**, p. 27–36, 2016.

DUTRA, F. M.; et al. Amônia e nitrito – Efeito sobre a estrutura branquial do camarão-da-amazônia. **Aquaculture Brasil**, 2017.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1–4, p. 346–358, 30 jun. 2006.

ELLIS, R. P. et al. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 6, p. 1209–1222, 2011.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief**, 8 jun. 2020.

HU, M. et al. Effect of starvation on the energy budget of two Asian horseshoe crab species: *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* (Chelicerata: Xiphosura). **Marine Biology** 2011 **158:7**, v. 158, n. 7, p. 1591–1600, 24 mar. 2011.

KIMPARA, J. M. et al. ABC da Agricultura Familiar - Camarao-da-malásia. **Embrapa**, p. 1–49, 2019.

KUBITZA, F. A água na aquicultura. **Panorama da aquicultura**, p. 14–27, 2017.

LIANG Z et al. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & shellfish immunology**, v. 54, p. 523–528, 1 jul. 2016.

NEGRINI, C. et al. Stocking density for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae) in biofloc system. **Latin american journal of aquatic research**, v. 45, n. 5, p. 891–899, 1 nov. 2017.

NEW, M. B.; KUTTY, M. N. **Freshwater Prawns: Biology and Farming**. 2010.

NUNES, L. J. L. ; ET AL. Engorda do camarão *Macrobrachium rosenbergii* em sistema com tecnologia de bioflocos . **Aquaculture Brasil**, 2018.

PARRINELLO, D. et al. Hemocyte types and some plasmatic properties of two edible crabs *Cancer borealis* and *Cancer pagurus*. **ISJ-Invertebrate Survival Journal**, v. 12, p. 195–202, 2015.

PINTO, M. R. et al. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 13–23, 1 jan. 2016.

QIU, L. et al. Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress. **Frontiers in Physiology**, v. 0, n. MAR, p. 211, 23 mar. 2018.

SAFAEIAN, S. et al. Biochemical and total hemocyte count profiles of long-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) as a reference interval in southern Iran. **Comparative Clinical Pathology** **2019 29:2**, v. 29, n. 2, p. 361–368, 6 nov. 2019.

SEPICI-DINÇEL, A. et al. Hemolymph biochemical parameters reference intervals and total hemocyte counts of narrow clawed crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). **Ecological Indicators**, v. 24, p. 305–309, 1 jan. 2013.

SIERRA, C. et al. Sialylation is modulated through maturation in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 130, n. 2, p. 179–189, 2001.

THURSTON, R. Some factor affecting the toxicity of ammonia to fishes. **EPA Ecol. Res. Ser.**, 1980.

TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M. **Water Quality. In: Recirculating aquaculture.** New Yorque, USA: 2007.

VÁZQUEZ, L. et al. Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Morphol**, v. 234, p. 147–153, 1997.

WU, F. et al. Classification and characterization of hemocytes from two Asian horseshoe crab species *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda*. **Scientific Reports** **2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 8 maio 2019.

XIAN, J. A. et al. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. **Aquaculture**, v. 317, n. 1–4, p. 240–244, 4 jul. 2011.

XIAO J et al. Stress response and tolerance mechanisms of ammonia exposure based on transcriptomics and metabolomics in *Litopenaeus vannamei*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 180, p. 491–500, 30 set. 2019.

YANG, L. et al. Metabolic, immune responses in prawn (*Penaeus monodon*) exposed to ambient ammonia. **Aquaculture International 2014 23:4**, v. 23, n. 4, p. 1049–1062, 26 nov. 2014.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, 2013.

ZHANG, Y. et al. 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 (London, England)**, v. 24, n. 7–8, p. 1601–1610, 1 out. 2015.

ZHOU K et al. Characterization and expression analysis of a chitinase gene (PmChi-5) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogens infection and ambient ammonia-N stress. **Fish & shellfish immunology**, v. 72, p. 117–123, 1 jan. 2018.