

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DANIELE SALGUEIRO DE MELO

EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS NO CAMARÃO
Neocaridina davidi E NA RÃ *Aquarana catesbeiana*

Belo Horizonte

2023

Daniele Salgueiro de Melo

EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS NO CAMARÃO
Neocaridina davidi E NA RÃ *Aquarana catesbeiana*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Kleber Campos Miranda Filho

Co-orientadores: Prof. Daniel Pereira da Costa e Prof. Galileu Crovatto Veras

Belo Horizonte

2023

M528e Melo, Daniele Salgueiro de, 1993-
 Efeito de compostos nitrogenados no camarão neocaridina davidi e na
 rã aquarana catesbeiana / Daniele Salgueiro de Melo. – 2024.
 143f: il

 Orientador: Kleber Campos Miranda Filho
 Coorientadores: Daniel Pereira da Costa
 Galileu Crovatto Veras

 Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
 UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia
 Área de concentração: Produção Animal.
 Bibliografia: f. 136 – 140.

 1. Camarão - Teses – 2. Rã - Teses – 3. Rã touro - Teses – 4.
 Aquicultura – Teses – 5. Produção animal - Teses – 6. Água – Poluição
 – Teses – I. Miranda Filho, Kleber Campos – II. Costa, Daniel Pereira da
 – III. Veras, Galileu Crovatto – IV. Universidade Federal de Minas
 Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 639.3

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte - MG
TELEFONE (31) 3409-2173

www.vet.ufmg.br/cadadomicos/pes-gratucao
E-mail: cpzootec@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNA DANIELE SALGUEIRO DE MELO

Às 09:00 horas do dia 26 de abril de 2023, reuniu-se, a Comissão Examinadora de Tese, aprovada em reunião ordinária no dia 04/04/2023, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada:
EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS NO CALARÃO
NEOCARDINA DAVIDI E NA RÃ AQUARIANA CAPS DELANA

_____, como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia, área de concentração Produção Animal.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Kleber Campos Miranda Filho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof.(a)/Dr.(a) <u>Raquel Fernanda Salla Jacob</u>	☒	☐
Prof.(a)/Dr.(a) <u>ANDRE MUNIZ AFONSO</u>	☒	☐
Prof.(a)/Dr.(a) <u>Juliana Viana Texeira</u>	☒	☐
Prof.(a)/Dr.(a) <u>Maria Clara Vieira Martins Stalling</u>	☒	☐
Prof.(a)/Dr.(a) <u>Daniela Oliveira</u>	☒	☐
Prof.(a)/Dr.(a) <u>Kleber Campos Miranda Filho</u>	☒	☐

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):
☒ Aprovado (a)
☐ Reprovado (a)

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2023.

Assinatura dos membros da banca:

ANDRE MUNIZ

AFONSO-93160186768

Digitally signed by ANDRE MUNIZ
AFONSO-93160186768
Date: 2023.05.08 15:50:17 -03'00'

Doutorado/Atadefesa.doc

DEDICATÓRIA

À minha família, principalmente a meus pais, que sempre me incentivaram e me apoiaram nos estudos. Ao meu marido, Henrique, pelo apoio em cada etapa de nossas vidas e pela felicidade que nosso relacionamento me proporciona.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever este trabalho foi utilizar apenas uma página para agradecer as pessoas que fizeram parte da minha trajetória de 11 anos de UFMG. Vale salientar que 2 desses anos vivenciados na UFMG foram durante a pandemia de covid 19.

Quero expressar meus sinceros agradecimentos e profundo reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Inicio agradecendo à Deus por minha vida e saúde, por estar sempre comigo e por me dar forças para alcançar meus objetivos.

À minha família, a quem tanto devo. Em especial, meus pais, Sandra e Noraldino, pelos ensinamentos, incentivos e por estarem sempre presentes; meus irmãos, Luiz e Rodrigo, e minhas cunhadas, Isa e Júlia, pelos incentivos, companhia e cumplicidade sempre. Faço ainda um agradecimento especial ao meu padrinho André, que infelizmente não estará comigo em vida, mas que se faz presente com todos os seus ensinamentos. Gratidão a toda minha família pelo suporte e amor compartilhados.

Ao meu marido e amigo, Henrique, pelo apoio em cada etapa desses 15 anos de nossas vidas e pela presença constante e fundamental nos momentos de felicidade e também nas horas de incerteza. Os momentos difíceis não foram raros, mas você se fez sempre presente me fazendo acreditar que eu conseguiria chegar ao final desse percurso tão excepcional da minha vida.

À minha segunda família, a quem também tanto devo. Em especial, meus sogros queridos, Lindinéia e Osman, e meu cunhado, Bruno, pela amizade e pela força sempre.

À minha psicóloga, por existir.

Ao Professor Kleber, por sua orientação e sabedoria, ajudando no meu crescimento pessoal e intelectual durante o tempo convívio. Aos meus co-orientadores Professor Daniel e Professor Galileu por toda ajuda na execução do trabalho.

À Professora Lilian, por seu companheirismo, disponibilidade, colaboração no desenvolvimento deste trabalho, e também pela amizade construída durante toda minha vida acadêmica. Sou eternamente grata por todo seu acolhimento em todos esses anos de UFMG.

Aos amigos da vida, Brunas (Barçante e Faustino), Vinicius, Gean, Nayara, Maria Clara, João que se fizeram presente me apoiando em todas as etapas dessa caminhada. Obrigada por existirem! E agradeço também a todos os outros amigos que participaram de alguma forma dessa minha conquista!

Estendo meus agradecimentos aos funcionários da Escola de Veterinária, em especial à Érika, Suellen, Valéria e a Leimar, pelo apoio durante a execução deste trabalho.

À banca examinadora, por aceitarem participar da minha avaliação.

Ao Departamento de Zootecnia da EV/UFMG, por disponibilizar toda infraestrutura necessária à execução destas atividades. À UFMG pela disponibilidade de recursos para o desenvolvimento desse trabalho. Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pela bolsa de doutorado e também de IC, mestrado e doutorado dos outros alunos envolvidos.

EPÍGRAFE

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

RESUMO

O artigo examina o impacto de compostos nitrogenados (amônia e nitrito) e da eteramina sobre a sobrevivência e a saúde de organismos aquáticos, especificamente a rã-touro (*A. catesbeiana*) e o camarão (*N. davidi*). A pesquisa enfatiza a importância do gerenciamento da qualidade da água na aquicultura para reduzir estresse, doenças e mortalidade nos organismos cultivados. A amônia e o nitrito, embora ocorram naturalmente, são tóxicos para os animais aquáticos, especialmente em sistemas intensivos de cultivo como recirculação e bioflocos. O estudo também aborda a contaminação hídrica causada por atividades industriais, como a mineração, e o uso de produtos químicos como a eteramina, que pode ser prejudicial à fauna aquática. O trabalho analisa os efeitos tóxicos dessas substâncias, focando nas alterações teciduais nos órgãos dos animais expostos. O objetivo é fornecer dados sobre a tolerância desses organismos aos compostos, auxiliando na melhoria dos protocolos de cultivo e na promoção da sanidade dos animais em aquicultura.

Palavras-chave: amônia; nitrito; eteramina; *Aquarana catesbeiana*; *Neocaridina davidi*.

ABSTRACT

The article examines the impact of nitrogen compounds (ammonia and nitrite) and etheramine on the survival and health of aquatic organisms, specifically the bullfrog (*A. catesbeiana*) and the shrimp (*N. davidi*). The research emphasizes the importance of water quality management in aquaculture to reduce stress, diseases, and mortality in cultivated organisms. Ammonia and nitrite, although naturally occurring, are toxic to aquatic animals, especially in intensive farming systems such as recirculation and bioflocs. The study also addresses water contamination caused by industrial activities, such as mining, and the use of chemicals like etheramine, which can be harmful to aquatic fauna. The work analyzes the toxic effects of these substances, focusing on tissue changes in the organs of exposed animals. The goal is to provide data on the tolerance of these organisms to the compounds, assisting in the improvement of farming protocols and promoting the health of animals in aquaculture.

Keywords: ammonia; nitrite; etheramine; *Aquarana catesbeiana*; *Neocaridina davidi*.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1 - Efeito tóxico da amônia e do nitrito em girinos de rã-touro *Aquarana catesbeiana* em diferentes fases de vida

Figura 1. Teste de toxicologia aguda realizado em câmara de germinação DBO (SL-224). A – Experimento 1, B – Experimento 2.	44
Figura 2. Girino de rã-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960).....	45
Figura 3. Girino de rã-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960).....	46
Figura 4. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração). Fonte: Bernet et al. (1999).	47
Figura 5. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) expostas a níveis crescentes de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	50
Figura 6. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) expostos a níveis crescentes de nitrito.	50
Figura 7. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) expostas a níveis crescentes de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	51
Figura 8. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) expostos a níveis crescentes de nitrito.	52
Figura 9. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	52
Figura 10. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	53
Figura 11. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) renal durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	53
Figura 12. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).	54
Figura 13. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).	54
Figura 14. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) renal durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).	54
Figura 15. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	55
Figura 16. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada ($N-NH_3$).	55
Figura 17. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).	56
Figura 18. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).	56
Figura 19. Fotomicrografias de girinos de rã-touro <i>A. catesbeiana</i> no estágio 35 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de amônia por 96 h, onde se observa: A - Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B - Brânquias dos animais expostos a 10 mg.L ⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) em aumento de 100X; C - Brânquias dos animais expostos a 60 mg.L ⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) e fusão dos tufo branquiais (asterisco preto) em aumento de 100X; D - Fígado dos animais do grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (setas) em aumento de 400x; E - Fígado dos animais expostos a 45 mg.L ⁻¹ e F - Fígado dos animais expostos a 60 mg.L ⁻¹ de N-AT em aumento de 100X – observa-se em ambas as imagens o aumento da vacuolização dos hepatócitos e a congestão dos sinusóides, necrose (N), congestão dos sinusóides (C), vacuolização (V), veia central (Ve);	

G - Rim dos animais do grupo controle 100x, túbulos renais (setas pretas); H - Rim dos animais expostos a 50 mg.L⁻¹ de N-AT- desorganização tecidual; I – Rim dos animais expostos a 60 mg.L⁻¹ de N-AT, 100X - intensa desorganização tecidual com perda de estruturas celulares e áreas de necrose tecidual. Coloração HE.58

Figura 20. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* no estágio 35 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de N-NO₂⁻ por 96 h, onde se observa: A - Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B - Brânquias dos animais expostos a 50 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, hiperplasia (seta preta) em aumento de 100X; C - Brânquias dos animais expostos a 60 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, hiperplasia (seta preta), descolamento epitelial (asterisco branco) e fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) em aumento de 100X; D - Fígado dos animais do grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (H), sinusóides (S) em aumento de 100x; E - Fígado dos animais expostos a 2,5 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, congestão dos sinusóides (C), sinusóides (S) e melanomacrófagos (M) em aumento de 400x; F - Fígado dos animais expostos a 30 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, com intensa vacuolização dos hepatócitos (V), necrose (N) e congestão dos sinusóides (C) em aumento de 100x; G - Rim dos animais do grupo controle em aumento de 100x; H - Rim dos animais expostos a 10 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ com desorganização tecidual e túbulos renais hipertrofiados (setas pretas) em aumento de 100x; I - Rim dos animais expostos a 30 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, com intensa desorganização tecidual com perda de estruturas celulares e áreas de necrose tecidual em aumento de 100x. Coloração HE.59

Figura 21. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* estágio 25 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de N-AT por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B – Brânquias dos animais expostos a 30 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 58 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) e fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) em aumento de 400X; D – Fígado dos animais do grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (setas) em aumento de 400x; E - Fígado dos animais expostos a 30 mg.L⁻¹ e F - Fígado dos animais expostos a 58 mg.L⁻¹ de N-AT em aumento de 400X – observa-se em ambas as imagens o aumento da vacuolização dos hepatócitos e intensa desorganização tecidual com perda de estruturas celulares, necrose (N), congestão dos sinusóides (C), veia central (Ve), melanomacrófagos (M). Coloração HE.60

Figura 22. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* estágio 25 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de N-NO₂⁻ por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B – Brânquias dos animais expostos a 4 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, hiperplasia (seta preta), fusão dos tufos branquiais (asterisco preto), necrose (N) em aumento de 100X; C – Brânquias dos animais expostos a 12 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, hiperplasia (seta preta), fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) em aumento de 400X; D – Fígado dos animais do grupo controle hepatócitos poligonais arranjados em cordões (setas) em aumento de 100x; E - Fígado dos animais expostos a 6 mg.L⁻¹, congestão dos sinusóides (C), sinusóides (S), veia central (Ve) e melanomacrófagos (M) em aumento de 400x; F – Fígado dos animais expostos a 12 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, com intensa vacuolização dos hepatócitos, necrose (N) e presença de melanomacrófagos (M) em aumento de 400x. Coloração HE.61

ARTIGO 2- Efeito tóxico da amônia e do nitrito em juvenis de *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Atyidae)

Figura 1. Teste de toxicologia aguda realizado em câmara de germinação DBO (SL-224).....89

Figura 2. Camarão *N. davidi*.....89

Figura 3. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração). Fonte: Bernet et al. (1999).90

Figura 4. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de juvenis de *N. davidi* expostos a níveis crescentes de amônia não ionizada (N-NH₃).92

Figura 5. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de juvenis de *N. davidi* expostos a níveis crescentes de nitrito.93

Figura 6. Valores médios (± desvio padrão) dos Índices de reação do órgão (I_{org}) durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de *N. davidi* a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-H₃).94

Figura 7. Valores médios (± desvio padrão) dos Índices de reação do órgão (I_{org}) durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de *N. davidi* a diferentes concentrações de nitrito (N-NO₂⁻).94

Figura 8. Fotomicrografias de juvenis de *N. davidi* expostos a concentrações agudas de N-AT por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, lamelas secundárias (L) em aumento de 400x; B – Brânquias dos animais expostos a 10 mg.L⁻¹ de N-AT, fusão das lamelas branquiais (asterisco

preto), necrose (N), edema dos canais marginais (estrela preta) e hiperplasia (seta preta) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 42 mg.L ⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), descolamento epitelial (asterisco branco) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.....	95
Figura 9. Fotomicrografias de juvenis de <i>N. davidi</i> expostos a concentrações agudas de N-NO ₂ ⁻ por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, lamelas secundárias (L) em aumento de 400x; B – Brânquias dos animais expostos a 0,25 mg.L ⁻¹ de N-NO ₂ ⁻ com espessamento do epitélio lamelar (EEL), tumefação celular (TC) e presença de edemas em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 1,25 mg.L ⁻¹ de N-NO ₂ ⁻ , hiperplasia (seta preta), fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), descolamento epitelial (asterisco branco) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.	95
ARTIGO 3 - Tolerância de juvenis de camarões <i>Neocaridina davidi</i> (Bouvier, 1904) (Crustacea, Caridea, Atyidae) e girinos de rã-touro <i>Aquarana catesbeiana</i> (Shaw, 1802) expostos a eteramina	
Figura 1. A - Girino de rã-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960). B – Camarão <i>N. davidi</i>	121
Figura 2. Índice do órgão (I _{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração). Fonte: Bernet et al. (1999).	123
Figura 3. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (<i>A. catesbeiana</i>) expostos a níveis crescentes de eteramina.	125
Figura 4. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de juvenis de <i>N. davidi</i> expostos a níveis crescentes de eteramina.	125
Figura 5. Valores médios e desvio padrão do índice de órgãos de girinos de rã touro (<i>A. catesbeiana</i>) expostos a níveis crescentes de eteramina.	126
Figura 6. Valores médios e desvio padrão do índice de órgãos de juvenis de <i>N. davidi</i> expostos a níveis crescentes de eteramina.	127
Figura 7. Fotomicrografias de girinos de rã-touro <i>A. catesbeiana</i> estágio 25 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B – Brânquias dos animais expostos a 2 mg.L ⁻¹ de eteramina, fusão dos tufos branquiais (asterisco preto), necrose (N) e descolamento epitelial (asterisco branco) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 14 mg.L ⁻¹ de eteramina, hiperplasia (seta preta), fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.....	127
Figura 8. Fotomicrografias de juvenis de <i>N. davidi</i> expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, lamelas secundárias (L) em aumento de 400x; B – Brânquias dos animais expostos a 0,6 mg.L ⁻¹ de eteramina, fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), necrose (N), edema dos canais marginais (estrela preta) e hiperplasia (seta preta) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 2,1 mg.L ⁻¹ de eteramina, hiperplasia (seta preta), fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), descolamento epitelial (asterisco branco) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.	128

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - Efeito tóxico da amônia e do nitrito em girinos de rã-touro *Aquarana catesbeiana* em diferentes fases de vida

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia total (N-AT) e seu valor respectivo de amônia não ionizada (N-NH ₃).	48
Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO ₂ ⁻).	48
Tabela 3. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia total (N-AT) e seu valor respectivo de amônia não ionizada (N-NH ₃).	49
Tabela 4. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (<i>A. catesbeiana</i>), no estágio 25 de Gosner (1960), a diferentes concentrações de nitrito (N-NO ₂ ⁻).	49
Tabela 5. Valores das concentrações letais medianas (CL ₅₀) e intervalos de confiança (IC) da amônia (N-AT e N-NH ₃) e nitrito (N-NO ₂ ⁻) estimados durante a exposição dos girinos de rã-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 35 de Gosner (1960) e os respectivos níveis de segurança (NS).	51
Tabela 6. Valores das concentrações letais medianas (CL ₅₀) e intervalos de confiança (IC) da amônia (N-AT e N-NH ₃) e nitrito (N-NO ₂ ⁻) estimados durante a exposição dos girinos de rã-touro (<i>A. catesbeiana</i>) no estágio 25 de Gosner (1960) e o nível de segurança (NS).	52

ARTIGO 2- Efeito tóxico da amônia e do nitrito em juvenis de *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Atyidae)

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição de camarões (<i>N. davidi</i>) a diferentes concentrações de amônia total (N-AT) e seu respectivo valor de amônia não ionizada (N-NH ₃).	91
Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição de camarões (<i>N. davidi</i>) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO ₂ ⁻).	92
Tabela 3. Valores das concentrações letais medianas (CL ₅₀) (mg.L ⁻¹) e intervalos de confiança (IC) para amônia (N-AT e N-NH ₃) e nitrito (N-NO ₂ ⁻) estimados durante a exposição dos juvenis de <i>N. davidi</i> em 96 h de exposição aguda e os respectivos níveis de segurança (NS) (mg.L ⁻¹).	93
Tabela 4. Concentrações letais medianas (CL ₅₀) e níveis de segurança (NS) de amônia não ionizada (N-NH ₃) e nitrito (N-NO ₂ ⁻) estimado para diferentes estágios de vida de várias espécies de crustáceos.	100

ARTIGO 3 - Tolerância de juvenis de camarões *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Caridea, Atyidae) e girinos de rã-touro *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) expostos a eteramina

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão - d.v.) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rã-touro a diferentes concentrações de eteramina.	124
Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão - d.v.) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de <i>N. davidi</i> a diferentes concentrações de eteramina.	124
Tabela 3. Valores das concentrações letais medianas (CL ₅₀) e intervalos de confiança (IC) da eteramina estimados durante a exposição dos girinos de rã-touro e juvenis de <i>N. davidi</i> e o nível de segurança (NS) (mg.L ⁻¹) em 96 h.	126

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM - Sociedade americana para testes e materiais

CEUA - Comissão de ética no uso de animal

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração

LAQUA - Laboratório de Aquacultura

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

UFMG - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

Fe²⁺ - ferro no estado ferroso

Fe³⁺ - ferro no estado férrico

g - grama

g L⁻¹ - gramas por litro

L - litro

mg - miligrama

mg.L⁻¹ - miligrama por litro

mL - mililitro

N-AT - nitrogênio na forma de amônia total

N-NH₃ - nitrogênio na forma de amônia não ionizada ou amônia gasosa

N-NH₄⁺ - nitrogênio na forma de amônia ionizada ou íon amônio

N-NO₂⁻ - nitrogênio na forma de íon nitrito

N-NO₃⁻ - nitrogênio na forma de íon nitrato

OH - hidroxila

P.A. - reagente com qualidade para análise

pH - potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	186
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1.	Compostos nitrogenados	19
2.2.	Mineração e o uso da eteramina	21
2.3.	Testes de toxicidade	23
2.4.	Biomarcadores.....	24
2.5.	Rã-touro - <i>Aquarana catesbeiana</i>	26
2.6.	“Red-Cherry” - <i>N. davidi</i>	28
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
	ARTIGO 1 - Efeito tóxico da amônia e do nitrito em girinos de rã-touro <i>Aquarana catesbeiana</i> em diferentes fases de vida.....	39
	RESUMO	39
	ABSTRACT	40
1.	INTRODUÇÃO	41
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1.	Instalações e Condições Experimentais	42
2.2.	Análises físico-químicas da água	46
2.3.	Estudo histológico.....	46
2.4.	Análise estatística e tratamento dos dados	47
3.	RESULTADOS	48
3.1.	Sobrevivência e CL ₅₀	49
3.2.	Biomarcadores morfológicos	52
4.	DISCUSSÃO.....	61
5.	CONCLUSÃO	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ARTIGO 2- Efeito tóxico da amônia e do nitrito em juvenis de <i>Neocaridina davidi</i> (Bouvier, 1904) (Crustacea, Atyidae)	84
	RESUMO	84
	ABSTRACT	85
1.	INTRODUÇÃO	86
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1.	Instalações e Condições Experimentais	87
2.2.	Análise físico-química da água	89
2.3.	Estudo Histológico.....	90
2.4.	Análise estatística e tratamento dos dados	90
3.	RESULTADOS	91
3.1.	Sobrevivência e CL ₅₀	92
3.2.	Biomarcadores morfológicos	93
4.	DISCUSSÃO.....	96
5.	CONCLUSÃO	108
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
	ARTIGO 3 - Tolerância de juvenis de camarões <i>Neocaridina davidi</i> (Bouvier, 1904) (Crustacea, Caridea, Atyidae) e girinos de rã-touro <i>Aquarana catesbeiana</i> (Shaw, 1802) expostos a eteramina	116
	RESUMO	116
	ABSTRACT	117
1.	INTRODUÇÃO	118
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1.	Instalações e Condições Experimentais	120
2.2.	Análise físico-química da água	122
2.3.	Estudo Histológico.....	122
2.4.	Análise estatística e tratamento dos dados	123
3.	RESULTADOS	123
3.1.	Sobrevivência e Concentração Letal Mediana - CL ₅₀	125
3.2.	Biomarcador morfológico	126
4.	DISCUSSÃO.....	128

5.	CONCLUSÃO	136
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	143

1. INTRODUÇÃO GERAL

O sucesso da aquicultura brasileira está relacionado com o estudo da sanidade dos organismos aquáticos e da qualidade do ambiente onde são criados. As atividades rotineiras na produção de organismos aquáticos como o transporte, biometrias, trocas de água e/ou a má qualidade da água do sistema de cultivo podem gerar aos animais distresse, doenças e mortalidade. O gerenciamento e a adoção de medidas que mitiguem o estresse sofrido pelo animal é essencial para otimizar a produção aquícola. Comercialmente, benefícios são vistos ao verificar o bem-estar dos animais e nas reduções de mortalidade, independente da fase da produção.

Protocolos e ferramentas devem ser incluídos e geridos corretamente na rotina da produção para maximizar resultados positivos. As variáveis da qualidade da água são fatores a serem considerados na elaboração destes protocolos. Neste contexto, destacam-se a amônia (NH_3) e o nitrito (NO_2^-) que são substâncias que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos, mas que são consideradas extremamente tóxicas para a maioria dos organismos aquáticos (Miranda-Filho et al., 2009; Miranda-Filho e Costa, 2016). Devido a isso, é imprescindível o conhecimento dos níveis desses metabólitos dissolvidos, NH_3 e NO_2^- , no ambiente de cultivo, principalmente em sistemas intensificados, em sistemas fechados (e.g. recirculação - RAS e bioflocos – BFT), e durante o transporte dos organismos cultivados.

Além dos compostos citados, atualmente, a contaminação dos recursos hídricos pode ser apontada como uma das consequências da busca contínua pelo desenvolvimento econômico mundial. Entre as possíveis fontes de contaminação dos recursos hídricos, encontram-se os efluentes domésticos e aqueles oriundos de processos industriais que se não forem tratados e destinados adequadamente podem acarretar sérios prejuízos ao ambiente.

A poluição química, seja de natureza orgânica ou inorgânica, decorrente da indústria, pode afetar seriamente o meio ambiente (Aguiar et al., 2002). A mineração é uma atividade industrial consumidora de grandes quantidades de água na etapa de beneficiamento, onde se separa o rejeito do minério. Devido à necessidade de aumentar a eficiência do processo de beneficiamento, vê-se uma intensificação do emprego de produtos químicos como depressores, dispersantes, floculantes, coletores, espumantes, dentre outros (Silva, 2009).

Esses químicos utilizados ficam contidos no rejeito do processo que é destinado às barragens de contenção, podendo ser uma forma de contaminação dos recursos hídricos.

Exemplos da extensão poluidora deste setor podem ser evidenciados quando do rompimento da barragem de rejeitos recentes, em Bumadinho em janeiro de 2019 e de Fundão da Samarco Mineração S.A., em novembro de 2015. Além da elevada quantidade de material sólido particulado, também estava presente o composto nitrogenado eteramina, coletor usado no processo de beneficiamento do minério de ferro, que tem potencial de interferir na comunidade aquática devido à sua toxicidade. No entanto, pouco se sabe sobre a ação da eteramina em sistemas biológicos, e, além disso, a sensibilidade (a contaminantes) existente dos organismos no meio aquático é diferente para cada espécie, fase de desenvolvimento do animal, gênero (Ribeiro et al., 2009), agente químico exposto e a severidade do efeito (Rand e Petrocelli, 1985). Os estudos toxicológicos são utilizados para garantir a integridade dos organismos, seja no ambiente natural, seja em cativeiro. Eles nos auxiliam mostrando o potencial deletério dos poluentes e a respectiva tolerância dos organismos expostos. Aliado aos estudos toxicológicos estão ferramentas como os biomarcadores, que são empregados para auxiliar na elucidação dos efeitos causados à biota por um determinado poluente ou agente estressor.

O uso de biomarcadores também se dá para o monitoramento da saúde do animal, tanto quanto da qualidade da água, e podem ser integrados à produção e ao biomonitoramento de ambientes atingidos, de forma a promover o gerenciamento do bem-estar, saúde e qualidade dos organismos aquáticos. Metodologias utilizando biomarcadores têm sido empregadas na aquicultura, apresentando resultados relevantes e auxiliando na tomada de decisão em aspectos relacionados a avaliação ambiental e dos sistemas de cultivo (Santos-Silva et al., 2018; Santos et al., 2021).

Nesse contexto, destacam-se duas espécies, que foram as utilizadas no presente estudo para compreender como esses compostos nitrogenados atuam. A primeira é a rã-touro *Aquarana catesbeiana*, única espécie de rã cultivada no Brasil (Valenti et al., 2021), e é o anfíbio mais cultivado no mundo (FAO, 2021); e a segunda espécie é o *Neocaridina davidi* que se popularizou entre os aquarofilistas, sendo produzida em vários países (Tropea e López-Greco, 2015), mas com uma demanda de informações não completamente descobertas para produção da espécie; sendo necessário portanto desenvolver informações para complementação do pacote tecnológico de ambas as espécies, com dados de tolerância para níveis de compostos nitrogenados comumente presentes em sistemas de cultivo.

De acordo com o que fora destacado, o objetivo deste trabalho foi demonstrar o efeito de diferentes concentrações de amônia e nitrito, e da eteramina sobre a sobrevivência de anfíbios (*A. catesbeiana*) e em camarões (*N. davidi*), bem como possíveis alterações teciduais nas brânquias, fígado e rins dos animais expostos, buscando compreender os danos gerados pelos referidos compostos nitrogenados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Compostos nitrogenados

As atividades rotineiras em uma ranicultura como transporte, biometrias, classificações, trocas de água, limpeza das baias, e/ou a má qualidade da água do sistema de cultivo podem gerar aos animais distresse, doenças e mortalidade. O gerenciamento e a adoção de medidas que mitiguem o estresse sofrido pelo animal é essencial no intuito de otimizar a produção. Comercialmente, benefícios nesse gerenciamento são vistos ao verificar o bem-estar dos animais e nas reduções de mortalidade, independente da fase da produção.

O produto do catabolismo proteico da maioria dos organismos aquáticos é a amônia (Nerici et al. 2012, Wright e Wood 2012), que no ambiente aquático, está presente na forma ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3); sendo que, o somatório das duas constitui a amônia total ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$). A proporção de cada uma destas duas formas no meio depende principalmente do pH e da temperatura (Boyd, 1982; Hargreaves, 1998). Quando o pH é neutro ou ácido, verifica-se que NH_4^+ predomina, enquanto NH_3 predomina quando o pH está acima de 7, sendo este último muito mais tóxico (Pereira e Mercante, 2005). Esses compostos nitrogenados ganham importância principalmente em sistemas intensivos de cultivo, pois a presença desses compostos demanda atenção mesmo em baixas concentrações, inferiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NH}_3$ e $1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$ (Pillay e Kutty, 2005).

O acúmulo de compostos nitrogenados nos sistemas de produção se dá em função da excreção dos animais e pela degradação da dieta não consumida que contém altos níveis protéicos. As concentrações subletais destes compostos são capazes de causar alterações fisiológicas e histológicas nos rins e fígado, em parâmetros sanguíneos (Wood, 2001), infertilidade, distúrbios imunológicos e genéticos, susceptibilidade a doenças (Suski et al., 2007), além de alterações nas brânquias (Benli et al., 2008).

A amônia pode ser tóxica em baixas concentrações em sua fração não ionizada ou gasosa, que é o NH_3 , e menos tóxica aos peixes na sua forma ionizada ou íon amônio NH_4^+ (Tomasso, 1994). A amônia em sua forma não ionizada (NH_3) é considerada mais tóxica devido a sua capacidade de difusão pelas membranas celulares (Regnault, 1987). A amônia não ionizada é de natureza lipofílica difundindo-se facilmente pelas membranas celulares causando lesões, já a amônia ionizada é de natureza lipofóbica, penetrando menos

rapidamente nas membranas que são de constituição lipoproteica (Kormanik e Cameron, 1981).

Dentro da célula, o NH_3 , proveniente do ambiente ou do metabolismo do animal, é transformado em NH_4^+ , liberando hidroxilas (Zhang et al., 2012). Esse aumento de amônia no sangue e consequentemente do pH, pode ter efeito sobre as enzimas e sobre a estabilidade de membranas (Pereira e Mercante, 2005). Geralmente é excretada pelas brânquias por difusão (Evans et al., 1999), no entanto, altas concentrações no meio podem interferir no processo de eliminação do composto, afetando a fisiologia do animal (Arana, 1997). Alterações morfológicas nas brânquias são vistas como consequências da exposição à amônia, além da mortalidade (Cardoso et al. 1996; Copatti et al., 2015).

Uma vez no ambiente aquático a amônia é oxidada, principalmente por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, em NO_2^- , esse por sua vez pode posteriormente ser oxidado em nitrato (NO_3^-), desta vez pela ação predominante de bactérias do gênero *Nitrobacter* (Martinez et al., 2006). Esta última é a forma nitrogenada menos tóxica para os organismos aquáticos. O NO_2^- , resultante da nitrificação da amônia a nitrato, é um composto tóxico para os organismos aquáticos, assim como a amônia (Yanbo et al., 2006).

Nas brânquias, o NO_2^- é absorvido através das células de cloreto localizadas na base das lamelas secundárias (Gisbert et al., 2004). Ao chegar na corrente sanguínea interfere nas trocas gasosas do animal pois oxida de forma reversível a molécula de ferro, do estado ferroso (Fe^{2+}) ao estado férrico (Fe^{3+}), na hemoglobina dando origem à metahemoglobina nos vertebrados (Lewis e Morris, 1986; Martinez e Souza, 2002), forma esta incapaz de se ligar ao oxigênio (Kosaka e Tyuma, 1987; Jensen, 2003). Para os crustáceos, a introdução de alta concentrações de NO_2^- no meio aquático pode levar a problemas hemolinfáticos devido a atuação sobre o processo de transporte de oxigênio, convertendo hemocianina em metahemocianina, pigmento que é incapaz de transportar oxigênio para os tecidos (Gross, 2004), podendo causar hipóxia e mortalidade dos animais acometidos pela intoxicação por NO_2^- (Barbieri et al., 2016). Como consequência destas intoxicações podem ocorrer lesões teciduais (Gisbert, 2004), e distúrbios fisiológicos possivelmente resultando em mortalidade dos organismos cultivados (Jensen, 2003). A exposição ao NO_2^- pode causar alterações branquiais (Wang et al., 2015), estresse fisiológico, alterando parâmetros hematológicos, como aumento dos níveis de metahemoglobina (Costa et al., 2004).

Testes de toxicidades com NH_3 e NO_2^- são usados para desenvolver protocolos de gerenciamento para o controle de suas respectivas concentrações nos sistemas aquáticos, sobretudo em sistemas fechados e de altas densidades de estocagem.

2.2. Mineração e o uso da eteramina

A mineração Brasileira busca o aproveitamento de seus recursos naturais. A mineração é um dos setores básicos da economia do Brasil, sendo Minas Gerais, o estado pioneiro na produção de minério de ferro do país e do mundo (Passos et al., 2017). O país tem uma diversidade geológica propícia à existência de jazidas de vários minerais, conquistando posição de destaque no cenário global, tanto em reservas quanto em produção mineral (IBRAM, 2015). O setor minerário envolve atividades para pesquisar, extrair, beneficiar e transformar recursos minerais, tornando-os proveitos econômicos e sociais (IBRAM, 2016), que envolve uma política de incentivo e desenvolvimento do setor. Entretanto, apesar do crescimento incessante do setor, grandes responsabilidades seguem adjacentes à atividade de mineração devido ao seu potencial impacto poluidor. Atualmente, faz-se necessária a adoção de medidas que reduzam os resíduos gerados em determinadas atividades. Dilema que pressiona o setor minerário, onde a eficiência no uso dos recursos e o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de resíduos são ações estratégicas a serem pensadas para desenvolvimento do setor (IBRAM, 2016).

O ferro é a matéria-prima básica utilizada no avanço tecnológico da humanidade, tratando-se de um dos recursos minerais mais baratos e com uma ampla aplicação em todas as áreas industriais (Magriotis et al., 1995). Segundo relatório da Samarco (2015), a etapa de separação do minério, basicamente desassocia a matéria prima em minério, rejeito e estéril; onde o rejeito é o material sem valor econômico após o beneficiamento do minério, e que é armazenado em barragens ou pilhas; e o estéril é o material que envolve o minério, que é removido no processo de lavra, ainda na mina.

Devido à diminuição das reservas de minério de ferro, vê-se a necessidade de otimização de processos que concentrem o produto extraído (Teodoro e Leão, 2004) e que sejam aceitos comercialmente. A técnica de flotação reversa é a mais utilizada entre os processos de concentração de minério de ferro (Magriotis et al., 1995; Teodoro e Leão, 2004). Muitas mineradoras utilizam coletores catiônicos, pertencentes ao grupo das aminas, como a eteramina, para flotar o quartzo; e o amido, para deprimir o minério no procedimento para concentrar o produto final (Magriotis et al., 1995; Pires et al., 2003; Araújo et al., 2005; Silva, 2009; Matos et al., 2021); sendo os coletores, os reagentes mais importantes para os sistemas de flotação (Nakhaei e Irannajad, 2018). Segundo Pires et al. (2003), tanto o depressor como o coletor são compostos orgânicos anfipáticos, onde a eteramina vai adsorver o quartzo sobre

sua superfície, tornando-o hidrofóbico, promovendo sua flotação e descarte desse rejeito. Os autores enfatizam que a flotação é chamada de reversa, pois ao se usar um coletor catiônico retira-se o constituinte de menor interesse do produto final, sendo posteriormente destinado à barragem de rejeitos.

As aminas são compostos orgânicos que contêm o grupo NH_2 ligado a um grupo alquil ou aril (Peres et al., 2000). São classificadas como primárias, secundárias e terciárias (Colling e Rizzo, 2017), e são formadas a partir da substituição, respectivamente, de um, dois ou três átomos de hidrogênio da molécula de amônia por um radical alquil (Calgaroto, 2014). Já a eteramina forma-se com a introdução de um grupo $\text{O}-(\text{CH}_2)_3$ entre os radicais alquil e o átomo de nitrogênio (Peres et al., 2000). Apesar do caráter biodegradável, o processo em si e os produtos formados, não estão completamente compreendidos (Araújo et al., 2010), podendo ocorrer a conversão em outros compostos nitrogenados como amônia, nitrito e nitrato (Teodoro e Leão, 2004), que também podem ocasionar sérios problemas ambientais, como eutrofização dos recursos hídricos e intoxicação dos animais aquáticos por serem compostos extremamente tóxicos.

Pesquisas sobre flotação de minérios de ferro tiveram início em 1931, sendo largamente empregada pelas empresas, usando amina como coletor, nos anos 60 (Houot, 1983), sendo que o processo foi considerado o maior descobrimento da indústria de minerais ferrosos por décadas (Uwadike, 1992). No entanto, o processo encontra alguns problemas como alto custo da amina como coletor, e a perda de mineral de interesse na deslamagem (Ma, 2012).

Segundo Stapelfeldt et al. (2002), parte da amina utilizada no processo de flotação fica na polpa do rejeito, que na maioria das vezes é descartada em barragens, podendo, esse rejeito, segundo Silva et al. (2012) ter a presença de substâncias químicas tóxicas (Silva et al., 2012). A escolha da forma como lidar com os resíduos é fundamental para entender o quanto de risco ambiental eles oferecem (Cardozo et al., 2016). No Brasil, na maioria das vezes, barragens de contenção de rejeitos de mineração são utilizadas para descarte dos resíduos após o processo de obtenção do mineral de interesse; que podem romper, devido a falhas na gestão de uso, e também em decorrência de abalos sísmicos (Oliveira et al., 2021). O rompimento de barragens de rejeito é um risco inerente à indústria de mineração devido à dinâmica econômica do setor mineral (Mansur et al., 2016). Apesar disto, a atenção dada a essa problemática não tem sido suficiente, visto os repetidos eventos de rompimento de barragens de mineração no Brasil e no mundo. Quando essas barragens rompem, liberam uma lama de caráter tóxico para cursos d'água, os quais podem chegar a quilômetros da área de mineração (Cardozo, 2016; IBRAM, 2016), afetando, portanto, regiões adjacentes.

Tanto no rejeito, quanto na água do processo, encontram-se eteraminas em diferentes estágios de degradação (Colling e Rizzo, 2017). Essas substâncias poderiam ter suas funções otimizadas antes do descarte, a partir de um reaproveitamento no processo de flotação, fato que representaria economia no custo de operação (Gonçalves et al., 2009) e uma redução de possíveis impactos ambientais. Há a necessidade de estudos de viabilidade econômica e técnica com ponto de vista ambiental para reaproveitamento dessas substâncias consideradas tóxicas para o ambiente. Alguns estudos afirmam a possibilidade de reaproveitamento das aminas utilizadas no processo de flotação (Stapelfeldt et al., 2002; Araújo et al., 2008), o que pode favorecer a redução da disposição de substâncias tóxicas no ambiente em casos de desastres ambientais.

Atualmente, há poucas informações sobre a toxicidade de substâncias empregadas no processo de mineração, sendo que os efeitos nos organismos, ainda não foram suficientemente pesquisados. As aminas utilizadas como agente de flotação na mineração, possuem as seguintes características: corrosividade, provocando queimaduras quando em contato com a pele e toxicidade para organismos aquáticos (Clariant, 2009a; Clariant, 2014). Neste contexto, percebe-se a amplitude dos desastres envolvendo rompimentos de barragens ao entender que seus efeitos vão além dos afetados diretamente pelo rejeito, sendo propagados ao longo do ecossistema ao afetar os recursos hídricos e organismos diretamente e indiretamente dependentes. Portanto, uma das medidas de proteção ao meio ambiente é de que o reagente não atinja os recursos hídricos, sendo complementada com estudos toxicológicos para elucidar os efeitos deletérios causados aos organismos teste.

2.3. Testes de toxicidade

Para uma completa avaliação e interpretação dos contaminantes lançados no ambiente e seu potencial de acometimento, é necessário o monitoramento de substâncias químicas nos recursos hídricos, sendo de extrema importância avaliar o efeito para os organismos aquáticos, acompanhando a forma de atuação destas substâncias e as interferências sobre um sistema biológico. Neste contexto, os estudos toxicológicos se tornam relevantes, pois complementam as análises físico-químicas do meio aquático, e auxiliam na determinação do perigo potencial de uma substância tóxica sobre a biota aquática. Os testes de toxicidade são bioensaios que avaliam a toxicidade de um produto, por meio da exposição de organismos a concentrações conhecidas, medindo posteriormente a resposta biológica, permitindo a

avaliação do efeito da substância testada (Ribo, 1997), podendo ser classificados como: teste de toxicidade aguda, subcrônico ou crônico.

Os testes de toxicidade aguda apresentam método padrão de quantificação e comparação da toxicidade das substâncias químicas, baseado na concentração que afeta 50% dos organismos testados, assumindo a denominação de concentração letal mediana (CL₅₀) (APHA, 1985). Ocorrem por um curto período de exposição (normalmente até 96 h) e estimam a concentração da substância que causa dano à biota (ABNT, 2016). Com relação à renovação da solução teste, os testes de toxicidade aguda podem ser estáticos, ou seja, sem renovação, semi-estático ou com fluxo contínuo, sendo que os dois últimos apresentam renovações periódicas do meio testado. O efeito adverso observado nos testes de toxicidade aguda normalmente é uma resposta severa e rápida exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico, sendo a mortalidade a resposta mais comumente obtida (Gherardi-Goldstein et al., 1990). Já os testes de toxicidade subcrônica e crônica podem abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo, podendo submeter o animal a concentrações sub-letais de determinada substância química e observar as respostas metabólicas frente a tal exposição (Gherardi-Goldstein et al., 1990).

Para padronização de métodos para os testes de toxicidade na comunidade científico-acadêmica, existem normas ditando como proceder a execução destes (OECD, 1992; ASTM, 2012, 2014; ABNT, 2016; USEPA, 2016; ABNT, 2017; ABNT, 2021). Assim, os testes de toxicidade podem auxiliar na avaliação da ação dos compostos nitrogenados sobre os organismos vivos no meio aquático.

2.4. Biomarcadores

A otimização da produção aquícola está relacionada com a constância de monitoramentos da sanidade dos organismos aquáticos e do ambiente de cultivo. Protocolos e ferramentas precisam ser incluídos e geridos corretamente na rotina de uma atividade aquícola para que os resultados sejam positivos. O uso de biomarcadores para monitoramento da saúde do animal tanto quanto da qualidade da água podem ser integrados à produção, de forma a promover o gerenciamento do bem-estar, saúde e qualidade dos organismos aquáticos. Metodologias utilizando biomarcadores têm sido muito empregadas na aquicultura, apresentando resultados relevantes e auxiliando na tomada de decisão em aspectos relacionados a avaliação ambiental e dos sistemas de cultivo (Romano e Zeng, 2007; Negro 2015; Ribeiro et al., 2017; Jesus et al., 2020; Brazão et al., 2021; Xing et al., 2023).

Embora o monitoramento da qualidade da água seja muito importante, analisar apenas seus parâmetros não é suficiente para quantificar e qualificar os riscos para os organismos aquáticos de alguma exposição. Devido à dinamicidade desses ecossistemas, os parâmetros comumente analisados refletem o estado momentâneo daquele corpo hídrico. Assim, o uso de biomarcadores ganha destaque, complementando as análises físico-químicas, e mostrando-se relevantes na tomada de decisões na produção e em ambientes contaminados (Pérez-Iglesias et al., 2019; Fernandes et al., 2021; Viriato et al., 2021).

Aliado aos testes de toxicidade, o uso de biomarcadores auxilia na detecção dos efeitos gerados por compostos tóxicos presentes no ambiente. Os poluentes atuam em um sistema biológico em níveis crescentes de organização biológica, do nível molecular para o nível morfofisiológico, até os níveis da população e ecossistema (Stegeman et al., 1992).

Biomarcadores são sinalizadores das respostas biológicas que ocorrem em um organismo frente a exposição a algum agente estressor. São alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares ou teciduais (Walker, 1995), e até mesmo mudanças nos parâmetros comportamentais, que podem ser mensurados, e que indicam um possível efeito causados por contaminantes (Monserat et al., 2007). Por refletir a condição do organismo, os biomarcadores auxiliam na tomada de decisões que evitem ou mitiguem danos no sistema produtivo.

Os biomarcadores de organismos aquáticos são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema, tendo sido incluídos em vários estudos de monitoramento ambiental (Huey e Beitinger, 1980b; Marco e Blaustein., 1999; Shinn et al., 2013). Existem diferentes grupos de biomarcadores, sendo os mais habitualmente usados os hematológicos, morfológicos, genéticos e bioquímicos.

A histopatologia tem sido utilizada como biomarcador morfológico, mostrando grandes benefícios em função da praticidade e da constatação de efeitos observáveis. As alterações histopatológicas podem ser o resultado de mudanças bioquímicas e fisiológicas adversas em um organismo, podendo indicar órgãos-alvo, tecidos, células e organelas que estejam afetadas (Hinton e Laurén, 1990). Bernet et al. (1999) indicam, para peixes, o estudo histopatológico de brânquias, por estarem expostas permanentemente a potenciais agentes tóxicos no ambiente aquático, e o fígado, por ser um órgão essencial ao metabolismo, excreção de metabólitos e osmorregulação.

As brânquias são o local inicial de absorção e biotransformação de substâncias tóxicas, sendo conseqüentemente vulneráveis aos compostos tóxicos (Wolf et al., 2015). Por responderem rapidamente às alterações ambientais, a estrutura branquial, apresenta

modificações não específicas do poluente, mas cujos efeitos dependem da intensidade e duração da exposição (Rašković et al. 2010). Essas alterações podem causar distúrbios metabólicos e fisiológicos, resultando em consequências adversas na biologia e sobrevivência dos animais (Stoyanova et al., 2015).

A inclusão de parâmetros histopatológicos em testes de toxicidade (aguda e crônica) pode revelar efeitos tóxicos estruturais e específicos em diferentes órgãos (Dutra et al., 2017). Portanto, a histopatologia tem sido usada em avaliações de toxicidade com o objetivo de identificar danos teciduais em animais aquáticos expostos a contaminantes (Miron et al., 2008; Dutra et al., 2017). Diversos estudos têm sido conduzidos utilizando a histopatologia como biomarcador, inclusive para estudos toxicológicos com compostos nitrogenados (Thurston et al., 1978; Benli et al., 2008; Santos-Silva et al., 2018). Neste trabalho, a histologia foi utilizada como biomarcador morfológico, permitindo avaliar as respostas frente à exposição à eteramina, NH_3 e NO_2^- nas brânquias, fígado e rins dos girinos de rã-touro e nas brânquias e fígado dos juvenis de *N. davidi*.

2.5. Rã-touro - *Aquarana catesbeiana*

Os anfíbios constituem um componente notável da fauna mundial estando presentes em praticamente todos os ambientes aquáticos e terrestres do mundo (Denver et al., 2002). Contribuem amplamente para os serviços ecossistêmicos, desempenhando papel importante no controle de surtos de pragas; na dinâmica da cadeia alimentar, para a ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos e terrestres (Pinto-Vidal et al., 2022) e alguns participando da cadeia de fornecimento da alimentação humana como a rã-touro.

A rã-touro (*Aquarana catesbeiana*, Shaw, 1802) é um anfíbio da ordem Anura e família Ranidae, naturalmente distribuído na América do Norte (Frost, 2006), sendo que atualmente é a única espécie de rã cultivada no Brasil (Valenti et al., 2021), e é o anfíbio mais cultivado no mundo (FAO, 2021). Ganhou destaque devido ao seu desempenho zootécnico, adaptabilidade ao cativeiro e qualidade nutricional de sua carne (Ide et al., 2017), sendo que no contexto experimental também é um animal de fácil manutenção em ranários.

Atualmente, os principais produtores de rãs estão sediados na Ásia (Taiwan, Malásia, Cingapura e China) e na América Latina (Brasil, México e Equador) (FAO, 2019; Mello et al., 2016). Apesar da produção de rã-touro ainda não ser tão representativa quanto a de outras espécies aquáticas, sua produção está crescendo, sendo que de 2010 a 2018, a produção média mundial foi de aproximadamente 3.200 toneladas de rã-touro por ano (FAO, 2021). Os dados

de produção no Brasil do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE são imprecisos devido a categorização conjunta da produção, colocando ali rãs, jacarés, siris, caranguejos, lagostas e outros organismos não especificados. No entanto, dados apontam Minas Gerais como o principal estado produtor de rãs no país, sendo responsável por gerar aproximadamente 1,4 milhões de reais no ano de 2020 (IBGE, 2021).

A adaptabilidade às condições ambientais juntamente com o desenvolvimento de tecnologias de produção, auxiliam na popularidade da espécie no país (Pahor-Filho et al., 2019; Valenti et al., 2021). A espécie apresenta características favoráveis à ranicultura, como prolificidade, rápido crescimento, grande tamanho (Lutz e Avery, 1999; Cribb et al., 2013), rápida maturação sexual (Lima et al., 1998) e capacidade de adensamento no sistema de cultivo. Além disso, sua carne é considerada leve e saborosa, com alta digestibilidade e completa nutricionalmente, uma vez que possui todos os aminoácidos essenciais ao ser humano (Afonso, 2012).

São animais ectotérmicos, sendo sua temperatura e metabolismo dependentes da variação da temperatura ambiental (Nascimento et al., 2013), onde a faixa ideal para um desenvolvimento otimizado da espécie é entre 25°C e 28°C (Mazzoni, 2001). Esses animais sofrem metamorfose, tendo um ciclo de vida dividido em duas fases. A primeira fase que vai da fecundação ao final da metamorfose, sendo totalmente aquática, e uma fase aquática e terrestre, de imago a adulto. Os girinos, denominação da primeira fase de vida desses animais após a fase de larva, desenvolvem-se aparecendo membros posteriores e anteriores, perdem a cauda e as brânquias no processo de metamorfose, transformando-se em imagos, que já são similares aos animais na vida adulta (Lima e Agostinho, 1992).

Os adultos apresentam dimorfismo sexual, sendo que os machos têm membranas timpânicas com diâmetro maior que o dos olhos, a região gular amarelada e calo nupcial desenvolvido, além de coaxarem no período reprodutivo. A reprodução das rãs touro acontece com a fecundação externa. O macho abraça a fêmea pela posição dorsal do corpo, até que ela libere os óvulos e posteriormente o macho libere os espermatozóides utilizando os membros posteriores para auxiliar na fecundação. Segundo Marques et al. (2017) após a fecundação, o ovo inicia seu desenvolvimento de embrião para larva, apresentando botão caudal e brânquias externas inicialmente. Os autores destacam que os animais gradativamente começam a se modificar; sendo que as brânquias passam a funcionar internamente, permanecendo a abertura do sifão lateral, por onde ocorre o fluxo da água possibilitando a respiração.

A partir do momento em que a larva eclode, passando pela fase de girino até chegar a fase de imago, os animais passam por várias mudanças morfológicas e fisiológicas,

possibilitando a sua adaptação ao ambiente terrestre e aquático (Gosner, 1960). A fase de larvicultura e girinagem é um período de complexidade na criação de rãs pela fragilidade do animal e está sujeita a situações que podem piorar a qualidade da água. As larvas, e posteriormente os girinos, passam a receber alimentação exógena em abundância para estimular o consumo e diminuir a competição por alimento entre os animais na tentativa de se manter um crescimento homogêneo. Contudo, parte desta dieta não é consumida, o que pode levar a acúmulos de compostos nitrogenados no sistema.

Cuidados devem ser tomados com a escolha do sistema de cultivo devido às possibilidades de aumento desses compostos se o manejo de limpeza não for gerido de forma adequada. Além disso, se utilizado sistemas de recirculação de água, os mesmos devem ser bem dimensionados para manutenção desses compostos no meio aquático.

2.6. “Red-Cherry” - *N. davidi*

Muitas espécies de camarão do gênero *Neocaridina* sp. são usadas na aquariofilia (Turkmen e Karadal, 2012), incluindo a espécie *N. davidi* que é onívora (Pantaleão et al., 2015), se alimentando de algas, biofilme e detritos (Klotz et al., 2013). O camarão atídeo *N. davidi* (Bouvier, 1904), é nativo da China, Japão, Coréia, Taiwan e Vietnã (Cai, 1996; Liang, 2004), sendo que a variedade mais comumente conhecida da espécie é o camarão “red cherry”, denominação dada aos animais por apresentarem cor vermelha pronunciada (Vazquez et al., 2017).

Sua variabilidade de cores garante diferentes linhagens para o grupo, como: “Red Fire Shrimp”, “Yellow Fire Shrimp”, “Sakura Shrimp”. Esses crustáceos possuem tolerância a diferentes variáveis de qualidade da água, rendendo à espécie a popularidade no mercado de aquariofilia (Karge e Klotz 2008). É uma espécie pequena e prolífica, com as fêmeas carregando os ovos até as larvas estarem quase totalmente desenvolvidas. Os animais adultos podem alcançar de 1,5 a 3,0 cm de comprimento, sendo abundantes em vários ambientes aquáticos de água doce (Weber e Traunspurger, 2016; Tropea et al., 2018). Seu dimorfismo sexual é evidente, sendo as fêmeas maiores e com cores mais intensas do que os machos (Vazquez et al., 2017; Tropea et al., 2018). As fêmeas em estado de maturação sexual ficam evidentes com a presença do ovário de coloração alaranjada na região do cefalotórax (Nur e Christianus, 2013).

Como em muitas espécies de água doce, *N. davidi* apresenta desenvolvimento direto, o que somado ao seu comportamento gregário, facilita a reprodução (Vazquez, et al., 2017). As

fêmeas desovam várias vezes ao longo de uma vida útil de 1,5 anos (Klotz e Karge, 2007; Marciano et al., 2018), com curtos intervalos entre as desovas (Tropea e López-Greco, 2015; Tropea et al., 2018).

As larvas atingem o estágio juvenil com aproximadamente 60 dias de vida, e após esse estágio levam 15 dias para atingir a idade adulta e a maturidade sexual (Nur e Christianus, 2013). Marciano et al. (2018) enfatizam que o tempo pode ser reduzido, com a maturidade sexual a partir de 50 dias de vida, dependendo da densidade de criação. Os ovos fertilizados são ligados aos pleópodos das fêmeas durante todo o período de incubação, que dura aproximadamente 15 dias, dependendo da temperatura (Tropea et al., 2018). Após o período de incubação o número de juvenis nascidos pode variar de 21 a 51 larvas por eclosão (Nur e Christianus, 2013).

Devido a facilidade de criação e manutenção, o camarão *N. davidi* tornou-se uma escolha frequente entre aquaristas e pesquisadores (Tropea e López-Greco, 2015). Não obstante sua popularidade, conhecimento básico da biologia e condições ótimas de criação são escassos, sendo de fundamental importância entender seus requisitos ótimos de parâmetros de qualidade de água para o sucesso da produção (Vazquez, et al., 2017). Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de informações de tolerância aos compostos nitrogenados, substâncias rotineiramente presentes em sistemas de produção e até mesmo nos aquários.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Janeiro, 2016.
- _____. NBR: 13373. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), 2017.
- _____. NBR 15470: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda e crônica - Método de ensaio com *Hyalella* spp. (Amphipoda) em sedimentos. 2021.
- AFONSO, A.M. Ranicultura se Consolida com Cadeia Produtiva Operando em Rede Interativa. Visão Agrícola, n.11, p.33-35, 2012.
- AGUIAR, R.M.P.; NOVAES, A.C.; GUARINO, A.W.S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. Quim. Nova, v.25, n.6B, p.1145-1154, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700015>
- APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th. Washington, DC: APHA, 1992.
- _____. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. APHA, Washington, DC, USA.1995. 1082p.
- ARANA, L.V. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis: Editora da UFSC, 1997. 166p.
- ARAÚJO, A.C.; VIANA, P.R.M.; PERES, A.E.C. Reagents in iron ores flotation. Miner. Eng., v. 18, n.2, p.219-224, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2004.08.023>
- ARAÚJO, D.M.; YOSHIDA, M I.; CARVALHO, C F.; STAPELFELDT, F. Reciclagem de aminas na flotação de minério de ferro. REM: R. Esc. Minas, v.61, n.4, p.455-460, 2008.
- ARAÚJO, D.M.; YOSHIDA, M.I.; TAKAHASHI, J.A.; CARVALHO, C.F.; STAPELFELDT, F. Biodegradation studies on fatty amines used for reverse flotation of iron ore. Int. Biodeterior. Biodegradation, v.64, n.2, p.151-155, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.01.004>
- ASTM - American Society for Testing and Materials. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX), 2012, p.16
- _____. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians. West Conshohocken, PA, 2014, p. 218-238.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V.; MELO, C.B.; HENRIQUES, M.B. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. Aquac. Res., v.47, n.4, p.1260-1268, 2016. <https://doi.org/10.1111/are.12583>.
- BENLI, A.Ç,K.; KÖKSAL, G; ÖZKULC, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere, v.72, n.9, p.1355-1358, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.037>
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis., v.22, p.25-34, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- BOUVIER, E.L. Crevettes de la famille des Atyidés: espèces qui font partie des collections du Muséum d'Histoire Naturelle. Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., v.10, p.129-138, 1904.
- BOYD, C.E. Water quality management for pond fish culture. Developments in aquaculture and fisheries science (9). Elsevier Scientific Publishing Company, 1982, 318 pp.
- BRAZÃO, C.C.; KRACIZY, R.O.; DUTRA, F.M.; OLIVEIRA, A.P.; SILVA, R.I.; BALLESTER, E.L.C. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. Aquaculture, v.533, n.25, p.736204, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736204>
- BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.

- _____.Ministério da Saúde. Portaria nº. 2914/2011. Estabelece as responsabilidades e procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.
- _____.Anuário Mineral Brasileiro: Principais Substâncias Metálicas. Brasília: DNPM, 2017.
- CAI, Y. A revision of the genus *Neocaridina* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Acta Zootaxonomica Sin.*, v.21, n.2, p.129-160, 1996.
- CALGAROTO, S. Propriedades interfaciais de nanobolhas e estudos na flotação de quartzo e precipitados coloidais de amina. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CARDOSO, E.L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R.M.A.; POLI, C.R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to um-ionized ammonia. *J. Fish Biol.*, v. 49, p.778-787, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb00078.x>
- CARDOZO, F.A.C.; PIMENTA, M.M.; ZINGANO, A.C. Métodos construtivos de barragens de rejeitos de mineração – Uma revisão. *Holos*, v.8, p.77-85, 2016. <https://doi.org/10.15628/holos.2016.5367>.
- CLARIANT, FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos em acordo com a NBR-14725 Flotigam EDA 3, 2009a. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- _____.FLOTIGAM EDA C, 2014. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- COLLING, A.V.; RIZZO, A.C.L. Biodegradação de aminas: recuperação ambiental e viabilidade econômica do processo. In: Série Tecnologia Ambiental, 98. Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2017, 53p.
- COPATTI, C.E.; ROSSO, F.L.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. Tolerance of piava juveniles to different ammonia concentrations. *Semin. Cienc. Agrar.*, v.36, n.6, p.3991-4002, 2015. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6p3991>
- COSTA, O.T.F.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, v.232, p.627-636, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00524-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00524-6)
- CRIBB, A.Y.; AFONSO, A.M.; MOSTÉRIO, C.M.F. Manual técnico de ranicultura. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Brasília, DF, 2013.
- DENVER, R.J.; GLENEMEIER, K.A.; BOORSE, G.C.. Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In: D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Etgen, S.E. Fahrbach, R.T. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (1 ed.), Elsevier, San Diego, 2002.
- DUTRA, F.M.; RÖNNAU, M.; SPONCHIADO, D.; FORNECK, S.C.; FREIRE, C.A.; BALLESTER, E.L.C. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquat. Toxicol.*, v.187, p.115-123, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.003>
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; POTTS, W.T.W. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.*, v.283, p.641-652, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990601\)283:7<641::AID-JEZ3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990601)283:7<641::AID-JEZ3>3.0.CO;2-W)
- FAO - Food and Agriculture Organization. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO Annuaire. (2019) (Rome).
- FAO - Food and Agriculture Organization. Global Aquaculture Production 1950–2018. Fishery Statistical Collections. (2021). <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>
- FERNANDES, I.F.; UTSUNOMIYA, H.S.M.; VALVERDE, B.S.L.; FERRAZ, J.V.C.; FUJIWARA, G.H.; GUTIERRES, D.M.; OLIVEIRA, O.; BELUSSI, L.F.; FERNANDES, M.N.; CARVALHO, C.S. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological

- biomarkers in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802). Chemosphere, v.275, 130000, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130000>
- FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; SA, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.E.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W. The amphibian tree of life. Bull. Am. Mus. Nat. Hist., v.297, 370p. 2006. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)297\[0001:TATOL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)297[0001:TATOL]2.0.CO;2)
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, P.A.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.; LORENZETTI, M. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). São Paulo SP, p17, 1990.
- GISBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; CARDONA, L.; HUERTAS, M.; GALLARDO, M.A.; SARASQUETE, C.; SALA-RABANALD, M.; IBARZD, A.; SÁNCHEZD, J.; CASTELLO-ORVAY, F. Recovery of Siberian sturgeon yearlings after an acute exposure to environmental nitrite: changes in the plasmatic ionic balance, Na⁺-K⁺ ATPase activity, and gill histology. Aquaculture, v.239, n.16, p.141-154, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.019>
- GONÇALVES, A.A.D.S.; SILVA, F.M.F.; CARVALHO, C.F. Reúso e biodegradabilidade de efluentes gerados na flotação catiônica reversa do minério de ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 49, 2009, Porto Alegre. Anais Congresso Brasileiro de Química, a Química e a Sustentabilidade. Rio de Janeiro: ABQ, 2009. (Resumo).
- GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, v.16, p.183-190, 1960.
- GROSS, A. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. J. World Aquac. Soc., v.35, n.3, p.315-321, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00095.x>
- HARGREAVES, J.A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture, v.166, p.181-212, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00298-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00298-1)
- HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Chelsea, USA, 1990.
- HOUOT, R. Beneficiation of iron ore by flotation - Review of industrial and potential applications. Int. J. Miner. Process., v.10, p.183-204, 1983. [https://doi.org/10.1016/0301-7516\(83\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0301-7516(83)90010-8)
- HUEY, D.W.; BEITINGER, T.L. Hematological responses of larval *Rana catesbeiana* to sublethal nitrite exposures. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.25, p.574-577, 1980. <https://doi.org/10.1007/BF01985574>
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal 2021, atualizado em 29 de setembro de 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#notas-tabela>>. Acesso em: 20 de março de 2022.
- IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração. Informações sobre a Economia Mineral Brasileira. 2015. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- _____. Gestão e Manejo de Rejeitos da Mineração. 1.ed. - Brasília, 2016. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- IDE, L.K.; MOREIRA, T.M.R.; SILVA, S.H.A. Técnicas de desossa da carcaça de rã-touro e utilização do esqueleto para fins comestíveis. Semioses, v.11, p.1-6, 2017. <https://doi.org/10.15202/1981996x.2017v11n2p58>
- JENSEN, F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry Physiology, Part A, v.135, p.9-24, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00323-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00323-9)

- JESUS, W.B.; OLIVEIRA, S.R.S.; ANDRADE, T.S.O.M.; SOUSA, J.B.M.; PINHEIRO-SOUSA, D.B.; SANTOS, D.M.S.; CARDOSO, W.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biological responses in gills and hepatopancreas of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) as indicative of environmental contamination in mangrove areas in Maranhão State, Brazil. Lat. Am. J. Aquat. Res., v.48, n.2, p.226-236, 2020. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue2-fulltext-2374>
- KARGE, A.; KLOTZ, W. Süßwassergarnelen aus aller Welt [Fresh water shrimps of the world]. 2. Auflage, (Dähne Verlag) Ettlingen, 2008, 216 pp.
- KLOTZ, W.; KARGE, A. Süßwassergarnelen aus aller Welt; Dähne Verlag; Allemagne (Ettlingen), 2007, 216 p.
- KLOTZ, W.; MIESEN, F.W.; HÜLLEN, S.; HERDER, F. Two Asian fresh water shrimp species found in a thermally polluted stream system in North Rhine-Westphalia, Germany. Aquat. Invasions, v.8, n.3, p.333-339, 2013. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.09>
- KORMANIK, G.A.; CAMERON, J.N. Ammonia excretion in animals that breath water: A review. Mar. Biol. Lett., v.2, p.11-23, 1981.
- KOSAKA, H.; TYUMA, I. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhaemoglobin by nitrite. Environ. Health Perspec., v.73, p.147-151, 1987. <https://doi.org/10.1289/ehp.8773147>
- LEWIS, J.W.; MORRIS, D.P. Toxicity of nitrite to fish: a review. Trans. Am. Fish., v.115, p.183-195, 1986. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1986\)115<183:TONTF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1986)115<183:TONTF>2.0.CO;2)
- LIANG, X.Q. Fauna Sinica. Invertebrata: Crustacea: Decapoda: Atyidae. Beijing, China, Science Press, 2004.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. Tecnologia de criação de rãs. Imprensa Universitária: Viçosa, 1992.
- LIMA, S.L.; COSTA, C.L.S.; AGOSTINHO, C.A.; ANDRADE, D.R.; PEREIRA-FILHO, H.P. Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no Sistema Anfigranja de Criação Intensiva. R. Bras. Zootec., v.27, n.3, p.416-420, 1998.
- LUTZ, C.G.; AVERY, J.L. Bullfrog culture. South. Reg. Aquac. Cent, v. 436, p1-4, 1999.
- MA, M. Froth Flotation of Iron Ores. Int. J. Min. Miner. Eng., v.1, n.2, p.56-61, 2012. <https://doi.org/10.5923/j.mining.20120102.06>
- MAGRIOTIS, R.S.; PERES, A.E.C.; BRANDÃO, P.R.G. Efeito do Tipo de Amina na Flotação Catiónica Reversa de um Minério Itabirítico. In: XVI Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e hidrometalurgia, 1999, Rio de Janeiro. Anais do XVI Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e hidrometalurgia. Rio de Janeiro: COPPE, v. 1, p. 382-396, 1995.
- MANSUR, M.S.; WANDERLEY, L.J.; MILANEZ, B.; SANTOS, R.S.P.; PINTO, R.G.; GONÇALVES, R.J.A.F.; COELHO, T.P. Antes fosse mais leve a carga: Introdução aos argumentos e recomendações referente ao desastre da Samarco/Vale/Bhp Billiton. In: ZONTA, M.; TROCATE, C. (Orgs.). A questão mineral no Brasil - v.2 Antes fosse mais leve a carga: Reflexões sobre o desastre da Samarco/Vale/BHP Billiton. Marabá, PA: Editorial Iguana, 2016. 237p.
- MARCIANO, A.; TROPEA, C.; LÓPEZ-GRECO, L.S. Effect of multiple spawning on female reproductive output and offspring quality in a freshwater caridean shrimp with direct development. Invertebr. Biol., v. 137, n. 1, p. 66-77, 2018. <https://doi.org/10.1111/ivb.12206>.
- MARCO, A.; BLAUSTEIN, A.R. The effects of nitrite on the behavior and metamorphosis in cascades frogs (*Rana cascadae*). Environ. Toxicol. Chem., v.18, n.5, p.946- 949, 1999. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180519>
- MARQUES, E.M.; LIMA, H.R.; TAVARES, P.V.; MODESTO, T.; PEREIRA, M.M. Biologia da rã touro. In: SEIXAS FILHO, J.T.; PEREIRA, M.M.; MELLO, S.C.R.P. Manual de Ranicultura para o Produtor. 2017

- MARTINEZ, C.B.R.; SOUZA, M.M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, v.133, p.151-160, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00144-7)
- MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. (Org.). *Tópicos Especiais 68 em Biologia Aquática e Aquicultura*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática - Aquabio, 2006, p.81-95.
- MATOS, V.E.; NOGUEIRA, S.C.S.; KOWALCZUK, P.B.; SILVA, G.R.; PERES, A.E.C. Differences in Etheramines Froth Properties and the Effects on Iron Ore Flotation. Part I: Two-Phase Systems. *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.*, v.43, n.2, 2021. <https://doi.org/10.1080/08827508.2021.1875461>
- MAZZONI, R. *Ranicultura: manual básico para inversores*. Montevideo: Proyecto Ranicultura Dinara - IIP, 2001, 20 p.
- MELLO, S.C.R.P.; OLIVEIRA, R.R.; PEREIRA, M.M.; RODRIGUES, E.; SILVA, W.N.; SEIXAS-FILHO, J.T. Development of a water recirculating system for bullfrog production: technological innovation for small farmers. *Cienc. Agrotecnol.*, v.40, p. 67-75, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542016000100006>
- MIRANDA-FILHO, K.C.; PINHO, G.L.L.; WASIELESKY, W.J.; BIANCHINI, A. Long-term ammonia toxicity to pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.150, p.377-382, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.06.001>
- MIRANDA-FILHO, K.C.; COSTA, L.D.F. Deleterious effects of ammonia and nitrite to fish and crustaceans, chapter 26. In: TAVARES-DIAS, M., MARIANO, W.S. (Eds.), *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. v.2. São Carlos, Pedro & João Editores, 2016, pp. 545-578.
- MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.G.; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.146C, p.221-234, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>
- NAKHAEI, F.; IRANNAJAD, M. Reagents types in flotation of iron ore oxide minerals: A review. *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.*, v.39, n.2, p.89-124, 2018. <https://doi.org/10.1080/08827508.2017.1391245>
- NASCIMENTO, R.; MELLO, S.C.R.P.; SEIXAS FILHO, J.T. *Manual prático para criação de rãs com reuso de água: girinagem e metamorfose*. Rio de Janeiro: SUAM, 2013, 82 p.
- NEGRO, C.L. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.113, p.87-94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.025>
- NERICI, C.; SILVA, A.; MERINO, G. Effect of two temperatures on ammonia excretion rates of *Serirolella violacea* (Palm fish) juveniles under rearing conditions. *Aquac. Eng.*, v.46, p.47-52, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.11.003>
- NUR, F.; CHRISTIANUS, A. Breeding and life cycle of *Neocaridina denticulata sinensis* (Kemp, 1918). *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, v.8, p.108-115, 2013. <https://doi.org/10.3923/ajava.2013.108.115>
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. 1992. 10p. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf>. Acesso em: 22 jan 2018.
- OLIVEIRA, L.L.F.; SANTOS, H.B.; THOMÉ, R.G.; CHEQUER, F.M.D. Toxic effects to human health and the environment caused by the spillage of ore tailings from the Fundão dam. *J. Health Biol Sci*, v.9, n.1, p.1-17, 2021. <https://doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v9i1.3535.p1-17.2021>
- PAHOR-FILHO, E.; MANSANO, C.F.M.; PEREIRA, M.M.; STÉFANI, M.V. The most frequently bullfrog productive systems used in Brazilian aquaculture: A review. *Aquac. Eng.*, v.87, p. 102023, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102023>

- PANTALEÃO, J.A.F.; GREGATI, R.A.; COSTA, R.C.; LOPEZ-GRECO, L.S.; NEGREIROS-FRANSOZO, M.L. Post-hatching development of the ornamental ‘red cherry shrimp’ *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea Caridae, Atyidae) under laboratorial conditions. *Aquac. Res.*, v.48, n.2, p.1-17, 2015. <https://doi.org/10.1111/are.12903>
- PASSOS, F.L.; COELHO, P.; DIAS, A. (Des) territórios da mineração: planejamento territorial a partir do rompimento em Mariana, MG. *Cad. Metrop.*, v.19, n.38, p.269-297, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-9996.2017-3811>
- PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *B. Inst. Pesca*, v.31, n.1, p.81-88, 2005.
- PERES, A.; AGARWAL, N.; BARTALINI, N.; BEDA, D. Environmental impact of etheramine utilized as flotation collector. In: INTERNATIONAL MINE WATER ASSOCIATION CONGRESS – 7th, 2000, Ustron, Poland. International mine water association Congress. Richmond: International Mine Water Association, p.464-471, 2000.
- PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; NATALE, G.S.; OLIVEIRA, C. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environ. Pollut.*, v.244, p.733-746, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>
- PILLAY, T.V.R.; KUTTY, M.N. *Aquaculture: Principles and Practices* 2ed. Wiley Blackwell, p.640, 2005.
- PINTO-VIDAL, F.A.; CARVALHO, C.S.; ABDALLA, F.C.; UTSUNOMIYA, H.S.M.; SALLA, R.F.; JONES-COSTA, M. Effects of lithium and selenium in the tail muscle of American bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) during premetamorphosis. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v.29, p.1975-1984, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15686-5>
- PIRES, J.M.M.; LENA, J.C. de; MACHADO, C.C.; PEREIRA, R.S. Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco mineração: estudo de caso da barragem de Germano. *Rev. Árvore*, v.27, n.3, p.393-397, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000300017>
- RAND, G.M.; PETROCELLI P.R. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Ed. Taylor & Francis, USA, 1985, 666p.
- REGNAULT, M.. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacean. *Biol. Ver.*, v.62, p.1-24, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1987.tb00623.x>
- RIBEIRO, F.A.S.; CARVALHO JUNIOR, J.R.; FERNANDES, J.B.K.; NAKAYAMA, L. Cadeia produtiva do peixe ornamental. *Panor. Aquic.*, v.19, n.112, p.36-45, 2009.
- RIBEIRO, M.C.; MORON, S.E.; LOPES, J.M. Histological analysis of *Bryconops caudomaculatus* gills and liver under different concentrations of ammonia. *B. Inst. Pesca*, v.43, n.1, p.35-43, 2017. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p35>
- RIBO, J.M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. *Environ. Toxicol.*, v.12, n.4, p.283-294, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:4<283::AID-TOX2>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:4<283::AID-TOX2>3.0.CO;2-4)
- ROMANO, N.; ZENG, C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, v.266, p.246–254, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.035>
- SAMARCO. Relatório Anual de Sustentabilidade 2014. Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <<https://www.samarco.com/wp-content/uploads/2016/08/2014-Relatorio-Anual-de-Sustentabilidade.pdf>>. Acessado em: 08 jun. 2018.
- SANTOS-SILVA, M.J.; COSTA, F.F.B.; LEME, F.P.; TAKATA, R.; COSTA, D.C.; MATTIOLI, C.C.; LUZ, R.K.; MIRANDA-FILHO, K.C. Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *Sci. Total Environ.*, v.616-617, p.1566-1575, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.157>
- SHAW, G. *General Zoology or Systematic Natural History*. Volume III, Part 1. Amphibia. London, 1802.

- SHINN, C.; MARCO, A.; SERRANO, L. Influence of low levels of water salinity on toxicity of nitrite to anuran larvae. *Chemosphere*, v.92, p.1154-1160, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.079>
- SILVA, F.M.F. Quantificação de eteraminas em rejeitos da flotação de minério de ferro em função da granulometria. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- SILVA, A.P.M.D.; VIANA, J.P.; CAVALCANTE, A.L.B. Diagnóstico dos resíduos sólidos da atividade de mineração de substâncias não energéticas: Relatório de Pesquisa IPEA [Internet]. Brasília: IPEA; 2012. Disponível em: https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120814_relatorio_atividade_mineracao.pdf.
- STAPELFELDT, F.; CARVALHO, C.F.; REIS O.B. Quantificação, Decomposição e Reciclagem de aminas nos resíduos de flotação reversa de minério de ferro. XIX Encontro Nacional de Tratamento de Minérios & Metalurgia Extrativa, 2002.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; LARS, F.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VELD, P.A.V. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. 1992. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds.). *Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. 100p.
- STOYANOVA, S.; YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; ATANASOVA, P.; GEORGIEVA, E. Thiamethoxam causes histochemical changes in the liver of *Aristichthys nobilis* Rich., 1845. *J. BioSci. Biotechnol.*, v.4, n.3, p.321-325, 2015.
- SUSKI, C.D.; KIEFFER, J.D.; KILLEN, S.S.; TUFTS, B.L. Sub-lethal ammonia toxicity in largemouth bass. *Comp. Biochem. Physiol A*, v.146, p.381-389, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.11.005>
- TEODORO, A.L.; LEÃO, V.A. Recuperação de aminas, utilizadas na flotação de minério de ferro, utilizando-se zeólitas naturais. *R. Esc. Minas*, v.57, n.3, p.197-201, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0370-44672004000300010>
- THURSTON, R.V.; RUSSO, R.C.; SMITH, C.E. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Trans. Am. Fish Soc.*, v.107, p.361-368, 1978. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1978\)107<361:ATOAAAN>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1978)107<361:ATOAAAN>2.0.CO;2)
- TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish. Sci.*, v.2, n.4, p.291-314, 1994. <https://doi.org/10.1080/10641269409388560>
- TROPEA, C.; LÓPEZ-GRECO, L.S. Female growth and offspring quality over successive spawnings in a caridean shrimp *Neocaridina davidi* (Decapoda, Atyidae) with direct development. *Biol. Bull.*, v.229, p.243-254, 2015. <https://doi.org/10.1086/BBLv229n3p243>
- TROPEA, C.; LAVARÍAS, S.M.L.; LÓPEZ GRECO, L.S. Getting ready for mating: the importance of male touching as an accelerator of ovarian growth in a caridean shrimp. *Zoology*, v.130, p.57-66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.08.003>
- TURKMEN, G.; KARADAL, O. The survey of the imported freshwater decapod species via the ornamental aquarium trade in Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.*, v.11, n.15, p.2824-2827, 2012.
- USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Ecological effects test guidelines 850-1075. Fish acute toxic test, 2016. 19p. Disponível em: <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850-ecological-effects-test-guidelines>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- UWADIALE, G.G.O.O. Flotation of iron oxides and quartz - A review. *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.*, v.11, p.129-161, 1992. <https://doi.org/10.1080/08827509208914209>
- VALENTI, W.C.; BARROS, H.P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G.W.; CAVALLI, R.O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquac. Rep.*, v.19, p.100611, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>.

- VAZQUEZ, N.D.; DELEVATI-COLPO, K.; SGANGA, D.E.; LÓPEZ-GRECO, L.S. Density and gender segregation effects in the culture of the caridean ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* Bouvier, 1904 (Caridea: Atyidae). J. Crustac. Biol., v.37, n.4, p.367-373, 2017. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/rux051>
- VIRIATO, C.; FRANÇA, F.M.; SANTOS, D.S.; MARCANTONIO, A.S.; BADARÓ-PEDROSO, C.; FERREIRA, C.M. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Aquarana catesbeiana*). Chemosphere, v.266, p.129018, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>
- WALKER, C.H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology - some recent developments. Sci. Total Environ., v.171, p.189-195, 1995. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04720-6](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04720-6)
- WANG, W.; WANG, H.; CHUNYAN YU, C.; JIANG, Z. Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae. Chem. Speciat. Bioavailab., v.27, n.4, p.147-155, 2015.
- WEBER, S.; TRAUNSPURGER, W. Influence of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) on freshwater meiofaunal assemblages. Limnologica, v.59, p.155-161, 2016.
- WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: SCHLENK, D.; BENSON, W.H. (Eds). Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London: Taylor and Francis, v.1, 2001, 89p.
- WOLF, J.C.; BAUMGARTNER, W.A.; BLAZER, V.S.; CAMUS, A.C.; ENGELHARDT, J.S.; FOURNIE, J.W.; FRASCA JR, S.; GROMAN, D.B.; KENT, M.L.; KHOO, L.H.; LAW, J.M.; LOMBARDINI, E.D.; RUEHL-FEHLERT, C.; SEGNER, H.E.; SMITH, S.A.; SPITSBERGEN, J.M.; WEBER, K.; WOLFE, M.J. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: A guide for investigators, Authors, Reviewers, and Readers. Toxicol. Pathol., v.43, n.3, p.297-325, 2015. <https://doi.org/10.1177/0192623314540229>
- WRIGHT, P.A.; WOOD, C.M. Seven things fish know about ammonia and we don't. Respir. Physiol. Neurobiol., v.184, p.231-240, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.07.003>
- XING, Y.; ZHU, X.; DUAN, Y.; HUANG, J.; NAN, Y.; ZHANG, J. Toxic effects of nitrite and microplastics stress on histology, oxidative stress, and metabolic function in the gills of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Mar. Pollut. Bull., v.187, p.114531, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114531>
- YANBO, W.; WENJU, Z.; WEIFEN, L.; ZIRONG, X. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. Fish. Physiol. Biochem., v.32, p.49-54, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10695-005-5744-2>
- ZHANG, B.L.; XIONG, D.M.; LI, B.; ZHAO, Z.G.; FRANG, W.; YANG, K.; FRAN, Q.-X. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). J. Appl. Ichthyol., v.28, p.82-86, 2012.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estimar a concentração letal mediana (CL_{50}); e analisar os efeitos histopatológicos gerados nas brânquias, fígado e rins de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), e nas brânquias de juvenis de *N. davidi*, após exposição à amônia e nitrito, através de testes de toxicidade aguda.

Estimar a concentração letal mediana (CL_{50}); e analisar os efeitos histopatológicos gerados nas brânquias de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) e de juvenis de *N. davidi*, após exposição à eteramina, por meio de testes de toxicidade aguda.

4.2. Objetivos específicos

- Estimar as concentrações letais medianas (CL_{50}) e os respectivos níveis de segurança para os compostos nitrogenados (amônia e nitrito) em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) em diferentes fases de vida, e em juvenis de camarão (*N. davidi*).

- Estimar a concentração letal mediana (CL_{50}) e os respectivos níveis de segurança para o composto eteramina em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) e em juvenis de *N. davidi*.

- Descrever as principais alterações histopatológicas causadas pela exposição às diferentes concentrações de amônia e nitrito nas brânquias, fígado e rins em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*).

- Descrever as principais alterações histopatológicas causadas pela exposição às diferentes concentrações de amônia e nitrito nas brânquias de juvenis de *N. davidi*.

- Descrever as principais alterações histopatológicas nas brânquias causadas pela exposição às diferentes concentrações de eteramina em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) e em juvenis de *N. davidi*.

ARTIGO 1 - Efeito tóxico da amônia e do nitrito em girinos de rã-touro *Aquarana catesbeiana* em diferentes fases de vida

RESUMO

Amônia e nitrito são dois dos compostos mais frequentemente detectados em sistemas fechados de produção, apresentando um provável cenário de intoxicação se a qualidade da água não for devidamente gerenciada. O objetivo do presente estudo foi investigar a tolerância à amônia e nitrito em girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) por meio de uma abordagem baseada na estimativa da concentração letal mediana (CL₅₀) e no estudo de biomarcadores histopatológicos. No experimento 1, 120 girinos no estágio 35 de Gosner (1960) foram expostos a 0 (controle), 40, 45, 50, 55 e 60 mg.L⁻¹ de N-AT (amônia total), respectivo a 0,07 (controle), 1,33, 1,48, 1,72, 1,86 e 2,01 mg.L⁻¹ de N-NH₃ por 96 h; e 0 (controle), 2,5, 5, 10, 20 e 30 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ (nitrito) por 96 h. Os resultados apontaram

CL₅₀-96h de 45,9 mg.L⁻¹ para N-AT, CL₅₀-96h de 1,66 mg.L⁻¹ para N-NH₃ e CL₅₀-96h de 6,43 mg.L⁻¹ para N-NO₂⁻. No experimento 2, 120 girinos no estágio 25 de Gosner (1960) foram expostos a 0 (controle), 30, 37, 44, 51 e 58 mg.L⁻¹ de N-AT, respectivo a 0,01 (controle), 0,98, 1,21, 1,48, 1,68 e 1,95 mg.L⁻¹ de N-NH₃ por 96 h; e 0 (controle), 4, 6, 8, 10, e 12 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ por 96 h. Os resultados apontaram CL₅₀-96h de 40,62 mg.L⁻¹ para N-AT, CL₅₀-96h de 0,93 mg.L⁻¹ para N-NH₃ e CL₅₀-96h de 6,94 mg.L⁻¹ para N-NO₂⁻. A exposição crescente aos compostos nitrogenados refletiu em um aumento na frequência de alterações histopatológicas nas brânquias, fígado e nos rins ao longo das 96 h de exposição no experimento 1, e alterações histopatológicas nas brânquias, fígado no experimento 2, mostrando que os biomarcadores histológicos são importantes para explicar o impacto, da amônia e do nitrito presente no ambiente, nos animais cultivados.

Palavras-chave: compostos nitrogenados; qualidade da água; biomarcador; histopatologia; toxicologia.

ABSTRACT

Ammonia and nitrite are two of the most frequently detected compounds in closed production systems, presenting a probable scenario of intoxication if the water quality is not properly managed. The aim of the present study was to investigate the tolerance to ammonia and nitrite in bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) using an approach based on the estimation of the median lethal concentration (LC_{50}) and on the study of histopathological biomarkers. In experiment 1, 120 tadpoles at Gosner stage 30 (1960) were exposed to 0 (control), 40, 45, 50, 55 and 60 $mg.L^{-1}$ of N-AT (total ammonia), respectively 0.07 (control), 1.33, 1.48, 1.72, 1.86 and 2.01 $mg.L^{-1}$ of N-NH₃ for 96 h; and 0 (control), 2.5, 5, 10, 20 and 30 $mg.L^{-1}$ of N-NO₂⁻ (nitrite) for 96 h. The results pointed LC_{50} -96h of 45.9 $mg.L^{-1}$ for N-AT, LC_{50} -96h of 1.66 $mg.L^{-1}$ for N-NH₃ and LC_{50} -96h of 6.43 $mg.L^{-1}$ for N-NO₂⁻. In experiment 2, 120 tadpoles at stage 25 of Gosner (1960) were exposed to 0 (control), 30, 37, 44, 51 and 58 $mg.L^{-1}$ of N-AT, respectively 0.01 (control), 0.98, 1.21, 1.48, 1.68 and 1.95 $mg.L^{-1}$ of N-NH₃ for 96 h; and 0 (control), 4, 6, 8, 10, and 12 $mg.L^{-1}$ of N-NO₂⁻ for 96 h. The results indicated an LC_{50} -96h of 40.62 $mg.L^{-1}$ for N-AT, an LC_{50} -96h of 0.93 $mg.L^{-1}$ for N-NH₃ and an LC_{50} -96h of 6.94 $mg.L^{-1}$ for N-NO₂⁻. Increasing exposure to nitrogenous compounds reflected in an increase in the frequency of histopathological changes in the gills, liver and kidneys over the 96 h of exposure in experiment 1, and histopathological changes in the gills, liver in experiment 2, showing that histological biomarkers are important to explain the impact of ammonia and nitrite present in the environment on farmed animals.

Keywords: nitrogen compounds; water quality; biomarker; histopathology; toxicology.

1. INTRODUÇÃO

Para otimizar a produção de rãs é necessário buscar viabilidade econômica, adequar-se a legislação ambiental vigente, e mitigar os impactos causados ao ambiente, sendo necessário atentar-se em relação às características abióticas do cultivo. Os parâmetros de qualidade da água são características a serem gerenciadas, e como exemplo têm-se: oxigênio dissolvido, temperatura, alcalinidade, dureza, pH, condutividade e substâncias potencialmente tóxicas.

Dentre as substâncias potencialmente tóxicas que podem estar presente em sistemas de cultivo, merecem destaque os compostos nitrogenados. A amônia, o nitrito e o nitrato são considerados compostos nitrogenados naturalmente encontrados em sistemas aquícolas, dos quais o conhecimento sobre os níveis letais e concentrações limitantes à criação auxiliam na definição de protocolos de monitoramento para a espécie produzida (Kroupova et al., 2005; Miron et al., 2008). Portanto, cuidados devem ser tomados ao se utilizar altas densidades de estocagem e rações inadequadas para a produção de rãs no intuito de atingir a potencialidade zootécnica, pois pode favorecer o acúmulo de compostos nitrogenados no sistema, bem como no efluente por eles produzido.

Rotineiramente, o excesso destes compostos é reduzido com renovações constantes de água. No entanto, as tendências atuais dos órgãos de regulamentação ambiental, estão questionando essa prática, inviabilizando o uso de grandes volumes de água para diluir estes e outros poluentes acumuláveis nos sistemas de produção (Zhang et al., 2012). O acúmulo de matéria orgânica juntamente com os compostos nitrogenados dissolvidos são fatores deteriorantes da qualidade da água dos ambientes de cultivo. Devido a isso, vê-se a necessidade de se estabelecer os níveis de tolerância que o animal pode estar exposto sem que o mesmo sofra efeitos deletérios ao seu crescimento e sobrevivência.

A utilização de testes de toxicidade permite uma rápida detecção do efeito de contaminantes e poluentes no meio, bem como as respostas dos organismos testados a estes compostos e às distintas variáveis ambientais. Além dos referidos testes, outras ferramentas têm sido empregadas para auxiliar a detecção dos efeitos danosos gerados

por compostos tóxicos presentes no ambiente. O uso de biomarcadores para monitoramento da saúde do animal tanto quanto da qualidade da água podem ser integrados à produção, de forma a promover o gerenciamento do bem-estar, saúde e qualidade dos organismos aquáticos.

Metodologias utilizando biomarcadores têm sido utilizadas na aquicultura, complementando as análises físico-químicas da água, apresentando resultados relevantes e auxiliando na tomada de decisão em aspectos relacionados à avaliação ambiental e dos sistemas de cultivo (Svobodová et al., 2005; Miron et al., 2008; Hegazi et al., 2010). Por refletir a condição de saúde do organismo, esses parâmetros são considerados importantes, pois podem auxiliar na tomada de decisões que evitem ou mitiguem danos no sistema produtivo.

Como biomarcador morfológico, as alterações histopatológicas podem ser o resultado de mudanças bioquímicas e fisiológicas adversas observadas no organismo, podendo indicar órgãos-alvo, tecidos e células que estejam afetadas (Hinton e Laurén, 1990), auxiliando na compreensão de determinadas situações, como a exposição à substâncias químicas.

O conhecimento sobre a tolerância aos compostos nitrogenados e efeitos gerados no organismo de produção pode viabilizar a tomada de decisões no setor de forma a diminuir o potencial impacto gerado por eles. O objetivo deste trabalho foi estimar a concentração letal mediana (CL₅₀) da amônia e do nitrito para girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), assim como seus respectivos níveis de segurança, descrever as principais alterações histológicas causadas, e avaliar possíveis efeitos deletérios aos animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de acordo com o protocolo de nº 34/2022.

2.1. Instalações e Condições Experimentais

O trabalho foi desenvolvido no setor de maricultura e qualidade da água do laboratório de Aquicultura – LAQUA da Escola de Veterinária da Universidade Federal

de Minas Gerais - UFMG. O trabalho de processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFMG.

Experimento 1

Os animais utilizados no experimento foram obtidos de reprodutores do setor de Ranicultura do LAQUA/UFMG. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas três vezes ao dia (8:00, 12:00 e 16:00 h) até o início dos testes de toxicidade, quando os animais estavam no estágio de desenvolvimento 35 de Gosner (1960). Os girinos foram alimentados com ração comercial para peixes carnívoros da marca Guabi[®] (44% proteína bruta, 8% extrato etéreo, 4% fibra bruta, 15% matéria mineral) com granulometria de 2 a 4 mm. Os peletes da ração foram triturados em um moinho de discos (Inbramaq[®]) para obtenção de uma fração farelada. Antes da realização do experimento, os girinos foram mantidos em piscinas plásticas de 400 L em uma densidade aproximada de 2,5 girinos/L. As piscinas foram abastecidas com água de poço artesiano, mantidas à temperatura de $25 \pm 1,80$ °C, e fotoperíodo de 14 h de luz. Os girinos foram pesados em balança analítica (Bel Engineering) e foi mensurado o comprimento total (extremidade anterior do focinho até a extremidade distal da cauda) usando paquímetro.

Para avaliar a sensibilidade das espécies e definir as concentrações dos compostos nitrogenados a serem utilizadas nos tratamentos, foi realizado um teste toxicológico agudo preliminar para determinar a menor concentração letal para 100% dos indivíduos em 96 horas de exposição. O teste foi realizado para definir a faixa letal de amônia e nitrito para girinos de rã-touro. As concentrações dos testes definitivos foram definidas como o limite inferior, aquele que não apresentou mortalidade, e o limite superior, a concentração mais baixa que apresentou 100% de mortalidade no teste preliminar. Com base no conhecimento da faixa letal de exposição, foram iniciados os testes definitivos de toxicidade aguda.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos com duas repetições, e as concentrações nominais testadas foram: 0 (controle), 40, 45, 50, 55 e 60 mg.L⁻¹ de N-AT (amônia total), respectivo a 0,07 (controle), 1,33, 1,48, 1,72, 1,86 e 2,01 mg.L⁻¹ de N-NH₃; e 0 (controle), 2,5, 5, 10, 20 e 30 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ (nitrito). As concentrações de amônia e nitrito foram preparadas a partir de soluções estoque de

amônia (10 g.L^{-1} de N-NH_4^+) e nitrito (20 g.L^{-1} de N-NO_2^-), utilizando cloreto de amônio P.A. (Synth[®]) e o nitrito de sódio P.A. (Synth[®]), respectivamente. Renovações totais dos meios experimentais foram feitas diariamente configurando um modelo de exposição semi-estático. Dez girinos de *A. catesbeiana* ($1,08 \pm 0,19\text{g}$; $3,85 \pm 0,33 \text{ cm}$) no teste de amônia e dez ($0,85 \pm 0,15\text{g}$; $3,81 \pm 0,34 \text{ cm}$) no teste de nitrito, foram colocados em cada unidade experimental, em recipiente circular de polietileno (4 L), de acordo com as normas da ASTM (2014) e posteriormente armazenados em câmara de germinação tipo DBO (SL-224) com controle de temperatura, fotoperíodo de 14 h de luz e aeração constante (Fig. 1). Os girinos foram mantidos em jejum 24 h antes dos testes, e permaneceram em jejum durante as exposições agudas com o objetivo de se manter a integridade dos ambientes experimentais (Fig. 2).

A água utilizada foi obtida de poço artesiano do LAQUA/UFGM. Ao longo das 96 h de teste de toxicidade aguda, os animais mortos (sem reação observável ao estímulo físico) foram retirados, registrados e fixados em Bouin. Os animais que sobreviveram a cada tempo experimental foram eutanasiados com cloridrato de benzocaína, concentração de 50 mg.L^{-1} administrados na água; fixados em Bouin e transferidos para álcool 70%, para posterior estudo histológico.



Figura 1. Teste de toxicologia aguda realizado em câmara de germinação DBO (SL-224). A – Experimento 1, B – Experimento 2.



Figura 2. Girino de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960).

Experimento 2

Os animais do experimento 2 também foram obtidos de reprodutores do setor de Ranicultura do LAQUA/UFGM. As condições de manutenção e a alimentação foram feitas da mesma forma do experimento 1 até o início dos tratamentos, quando os animais estavam no estágio de desenvolvimento 25 de Gosner (1960). Os girinos foram pesados em balança analítica (Bel Engineering) e foi mensurado o comprimento total (extremidade anterior do focinho até a extremidade distal da cauda) usando paquímetro.

Para a definição das concentrações que seriam testadas no teste de toxicidade agudo definitivo, foi realizado um teste toxicológico agudo preliminar. Definidas as faixas a serem testadas, o delineamento utilizado nos testes definitivos foi inteiramente casualizado com seis tratamentos com duas repetições, e as concentrações nominais testadas foram: 0 (controle), 30, 37, 44, 51 e 58 mg.L^{-1} de N-AT (amônia total), respectivo a 0,01 (controle), 0,98, 1,21, 1,48, 1,68 e 1,95 mg.L^{-1} de N-NH₃ por 96 h; e 0 (controle), 4, 6, 8, 10, e 12 mg.L^{-1} de N-NO₂⁻ (nitrito). As concentrações de amônia e nitrito foram preparadas a partir de soluções estoque de amônia (10 g.L^{-1} de N-NH₄⁺) e nitrito (20 g.L^{-1} de N-NO₂⁻), utilizando cloreto de amônio P.A. (Synth®) e o nitrito de sódio P.A. (Synth®), respectivamente. Renovações totais dos meios experimentais foram feitas diariamente configurando um modelo de exposição semi-estático. Dez girinos de *A. catesbeiana* ($41,44 \pm 4,48$ mg; $0,94 \pm 0,14$ cm) no teste de amônia e ($41,22 \pm 4,87$ mg; $0,99 \pm 0,13$ cm) no teste de nitrito, foram testados em cada unidade experimental, em um béquer (1 L), de acordo com as normas descritas pela ASTM (2014), em câmara de germinação do tipo DBO (SL-224) com controle de temperatura, fotoperíodo de 14 h de luz e aeração constante. Os girinos foram mantidos em jejum 24 h antes dos testes, e permaneceram em jejum durante as 96 h de exposição definitiva com o objetivo de se manter a integridade do ambiente experimental.

A coleta dos animais para estudo histológico e eutanásia dos animais foram realizadas igual ao experimento 1.



Figura 3. Girino de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960).

2.2. Análises físico-químicas da água

Para ambos os experimentos, duas vezes ao dia (8:00 e às 16:00h) foram registrados, de todas as unidades experimentais, os dados de pH e temperatura com pHmetro portátil (Hanna®, modelo HI 98130), o oxigênio dissolvido (OD) com sonda portátil (YSI 550A). A cada 24 h foi realizado análise de alcalinidade e dureza pelo método titulométrico, e os compostos nitrogenados por espectrofotometria (Biochrom Libra S22) (APHA, 1992).

2.3. Estudo histológico

Para o tratamento do material biológico, foi utilizada a metodologia descrita por Luna (1968). No experimento 1 a região cranial dos girinos foi fixada, juntamente com o fígado e os rins; e no experimento 2 os animais foram fixados inteiros em líquido de Bouin por 8 h e transferidos para álcool 70%. Posteriormente, foi realizado o processamento histológico seguindo os processos de desidratação em série crescente de álcoois, diafanização em xilol, impregnação e inclusão dos tecidos em parafina. As peças foram seccionadas em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M15) com cortes de 3 µm de espessura para montagem das lâminas histológicas, sendo posteriormente coradas em hematoxilina e eosina (HE). As preparações foram montadas com Entellan New, observadas e fotografadas microscópio óptico (Nikon® eclipse SI) equipado com uma câmera (Prime cam intervision®) e visualizado no software PRIME CAM.

As alterações histopatológicas foram avaliadas de acordo com o método descrito por Bernet et al. (1999). As análises foram realizadas utilizando-se o Índice do Órgão (Fig. 3), calculado com os respectivos fatores de importância da lesão (w), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando cessado a exposição a agentes estressores; (2) importância moderada, reversível na maioria dos casos, se o estressor for neutralizado; e (3) marcada como patológica importante, geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão. Além do fator de importância, o grau de ocorrência (α) também é considerado nos cálculos, onde são atribuídos valores para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) inalterado, (2) ocorrência leve, (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência severa. A partir das classificações foi calculado o Índice do Órgão (I_{org}) (Fig. 4).

$$I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

Figura 4. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração). Fonte: Bernet et al. (1999).

2.4. Análise estatística e tratamento dos dados

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. As concentrações letais medianas (CL_{50}) e os intervalos de confiança (95%) foram estimados para amônia (N-AT e N-NH₃) e N-NO₂⁻ de acordo com os dados de mortalidade durante as 96 h de exposição, com o programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977) e o nível de segurança (NS) conforme descrito por Sprague (1971).

Todas as análises foram submetidas à avaliação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Levene), e cumprido os requisitos, posteriormente foi feita análise de regressão. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico R Studio Versão 1.2.5033.

3. RESULTADOS

Na tabela 1 e 2 estão apresentadas as variáveis físico-químicas da água correspondente aos girinos de rã-touro no estágio 35 de Gosner (1960) para exposição a N-AT e ao N-NO₂⁻, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia total (N-AT) e seu valor respectivo de amônia não ionizada (N-NH₃).

Parâmetros de qualidade de água	N-AT (mg.L ⁻¹) - Nominal					
	0	40	45	50	55	60
N-AT (mg.L ⁻¹) - Real	1,91 $\pm$ 0,15	41,56 $\pm$ 4,41	49,43 $\pm$ 3,34	53,55 $\pm$ 5,27	57,51 $\pm$ 3,97	62,64 $\pm$ 2,93
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	0,07 $\pm$ 0,01	1,33 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 0,03	1,72 $\pm$ 0,01	1,86 $\pm$ 0,01	2,01 $\pm$ 0,03
Temperatura (°C)	25,6 $\pm$ 0,17	25,7 $\pm$ 0,14	25,6 $\pm$ 0,12	25,6 $\pm$ 0,10	25,7 $\pm$ 0,10	25,7 $\pm$ 0,11
pH	7,76 $\pm$ 0,13	7,74 $\pm$ 0,11	7,78 $\pm$ 0,10	7,72 $\pm$ 0,15	7,71 $\pm$ 0,12	7,69 $\pm$ 0,13
OD (mg.L ⁻¹)	5,86 $\pm$ 0,51	6,03 $\pm$ 0,53	6,15 $\pm$ 0,48	5,99 $\pm$ 0,48	5,94 $\pm$ 0,42	6,02 $\pm$ 0,38
OD (%)	80,0 $\pm$ 6,17	82,3 $\pm$ 5,37	81,6 $\pm$ 6,55	80,9 $\pm$ 5,66	79,4 $\pm$ 5,91	81,4 $\pm$ 4,60
Alcalinidade*	99,0 $\pm$ 3,16	98,5 $\pm$ 2,41	99,5 $\pm$ 4,37	100 $\pm$ 3,33	98,5 $\pm$ 3,37	99,0 $\pm$ 3,94
Dureza*	64,3 $\pm$ 2,47	63,0 $\pm$ 0,71	64,0 $\pm$ 2,83	63,3 $\pm$ 1,06	63,3 $\pm$ 1,06	64,0 $\pm$ 2,83

* (mg.L⁻¹) CaCO₃

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO₂⁻).

Parâmetros de qualidade de água	N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹) - Nominal					
	0	2,5	5	10	20	30
N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹) - Real	0,24 $\pm$ 0,07	2,62 $\pm$ 0,32	5,77 $\pm$ 0,42	11,04 $\pm$ 0,49	20,67 $\pm$ 0,81	31,33 $\pm$ 0,57
Temperatura (°C)	25,6 $\pm$ 0,26	25,6 $\pm$ 0,11	25,6 $\pm$ 0,08	25,5 $\pm$ 0,27	25,6 $\pm$ 0,21	25,5 $\pm$ 0,25
pH	7,75 $\pm$ 0,13	7,74 $\pm$ 0,11	7,73 $\pm$ 0,09	7,72 $\pm$ 0,10	7,67 $\pm$ 0,09	7,75 $\pm$ 0,10
OD (mg.L ⁻¹)	6,11 $\pm$ 0,41	5,98 $\pm$ 0,25	5,91 $\pm$ 0,29	5,97 $\pm$ 0,37	5,88 $\pm$ 0,31	6,07 $\pm$ 0,27
OD (%)	83,0 $\pm$ 3,68	82,2 $\pm$ 3,54	80,8 $\pm$ 2,36	81,4 $\pm$ 3,27	79,3 $\pm$ 2,62	81,06 $\pm$ 2,84
Alcalinidade*	99,5 $\pm$ 2,83	99,0 $\pm$ 3,95	97,5 $\pm$ 2,63	98,5 $\pm$ 2,41	99,3 $\pm$ 3,45	98,54 $\pm$ 3,77
Dureza*	64,2 $\pm$ 2,55	63,4 $\pm$ 0,21	62,6 $\pm$ 0,85	61,4 $\pm$ 0,12	62,6 $\pm$ 0,11	62,3 $\pm$ 0,35

* mg.L⁻¹ CaCO₃

Na tabela 3 e 4 estão apresentadas as variáveis físico-químicas da água dos girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner (1960) para exposição a N-AT, N-NH₃ e ao N-NO₂⁻, respectivamente.

Tabela 3. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia total (N-AT) e seu valor respectivo de amônia não ionizada (N-NH₃).

Parâmetros de qualidade de água	N-AT (mg.L ⁻¹) - Nominal					
	0	30	37	44	51	58
N-AT (mg.L ⁻¹) - Real	0,76 $\pm$ 0,12	30,62 $\pm$ 0,53	37,51 $\pm$ 0,31	44,82 $\pm$ 0,93	51,53 $\pm$ 0,89	58,24 $\pm$ 0,64
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	0,01 $\pm$ 0,01	0,98 $\pm$ 0,01	1,21 $\pm$ 0,02	1,48 $\pm$ 0,10	1,68 $\pm$ 0,03	1,95 $\pm$ 0,04
Temperatura (°C)	25,22 $\pm$ 0,29	25,45 $\pm$ 0,32	25,33 $\pm$ 0,29	25,43 $\pm$ 0,30	25,39 $\pm$ 0,33	25,51 $\pm$ 0,31
pH	7,75 $\pm$ 0,03	7,74 $\pm$ 0,04	7,74 $\pm$ 0,04	7,75 $\pm$ 0,04	7,74 $\pm$ 0,04	7,75 $\pm$ 0,04
OD (mg.L ⁻¹)	5,76 $\pm$ 0,36	5,70 $\pm$ 0,40	5,83 $\pm$ 0,62	5,75 $\pm$ 0,40	5,91 $\pm$ 0,20	5,81 $\pm$ 0,20
OD (%)	77,90 $\pm$ 6,26	75,24 $\pm$ 7,46	79,15 $\pm$ 1,44	78,08 $\pm$ 3,58	79,4 $\pm$ 1,83	78,40 $\pm$ 1,98
Alcalinidade*	84,0 $\pm$ 5,16	83,0 $\pm$ 4,83	84,0 $\pm$ 6,15	84,0 $\pm$ 6,14	83,5 $\pm$ 6,25	84,0 $\pm$ 6,15
Dureza*	64,2 $\pm$ 2,40	63,2,5 $\pm$ 2,86	63,6 $\pm$ 2,63	63,6 $\pm$ 2,63	63,2 $\pm$ 2,86	63,2 $\pm$ 2,86

* mg.L⁻¹ CaCO₃

Tabela 4. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*), no estágio 25 de Gosner (1960), a diferentes concentrações de nitrito (N-NO₂⁻).

Parâmetros de qualidade de água	N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹) - Nominal					
	0	4	6	8	10	12
N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹) - Real	0,21 $\pm$ 0,03	4,46 $\pm$ 0,31	6,31 $\pm$ 0,35	8,29 $\pm$ 0,25	10,54 $\pm$ 0,36	12,61 $\pm$ 0,28
Temperatura (°C)	25,17 $\pm$ 0,32	25,29 $\pm$ 0,45	25,51 $\pm$ 0,25	25,32 $\pm$ 0,23	25,15 $\pm$ 0,17	25,35 $\pm$ 0,32
pH	7,70 $\pm$ 0,05	7,72 $\pm$ 0,04	7,71 $\pm$ 0,04	7,72 $\pm$ 0,04	7,72 $\pm$ 0,03	7,71 $\pm$ 0,05
OD (mg.L ⁻¹)	5,81 $\pm$ 0,20	5,84 $\pm$ 0,24	5,86 $\pm$ 0,24	5,79 $\pm$ 0,35	5,74 $\pm$ 0,15	5,96 $\pm$ 0,36
OD (%)	78,0 $\pm$ 2,08	78,82 $\pm$ 2,97	79,88 $\pm$ 1,81	79,26 $\pm$ 2,14	78,73 $\pm$ 2,10	80,39 $\pm$ 2,87
Alcalinidade*	84,0 $\pm$ 6,14	83,0 $\pm$ 4,83	83,0 $\pm$ 4,83	82,22 $\pm$ 5,06	84,28 $\pm$ 5,34	84,28 $\pm$ 5,35
Dureza*	64,6 $\pm$ 2,50	63,0 $\pm$ 3,16	63,6 $\pm$ 2,63	62,70 $\pm$ 2,65	61,42 $\pm$ 2,51	62,57 $\pm$ 2,51

* mg.L⁻¹ CaCO₃

Os parâmetros de qualidade de água neste estudo encontravam-se em conformidade com as condições de cultivo para os girinos de rã-touro (Hayashi et al., 2004; Cribb et al., 2013).

3.1. Sobrevivência e CL₅₀

Não foi observada mortalidade nos tratamentos controle dos testes de toxicidade aguda para amônia e nitrito e para ambas as fases de vida de *A. catesbeiana* (Fig. 5-8).

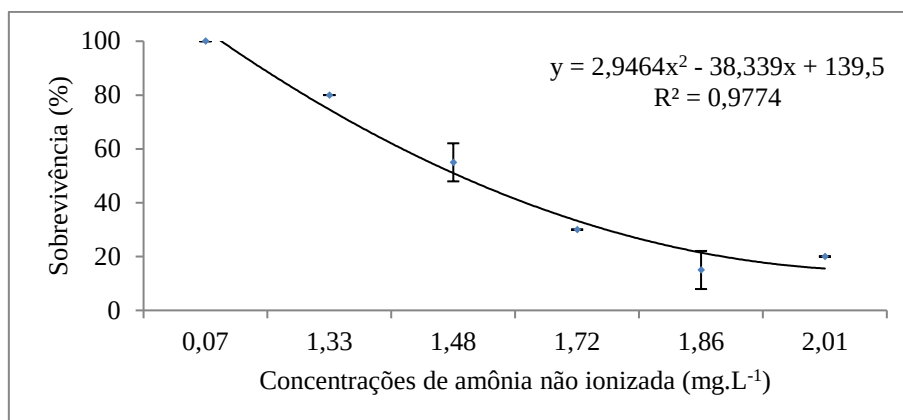


Figura 5. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) expostas a níveis crescentes de amônia não ionizada (N-NH₃).

No experimento 1, na concentração de 30 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, todos os animais foram acometidos antes de completar as 96 h de teste (Fig. 6).

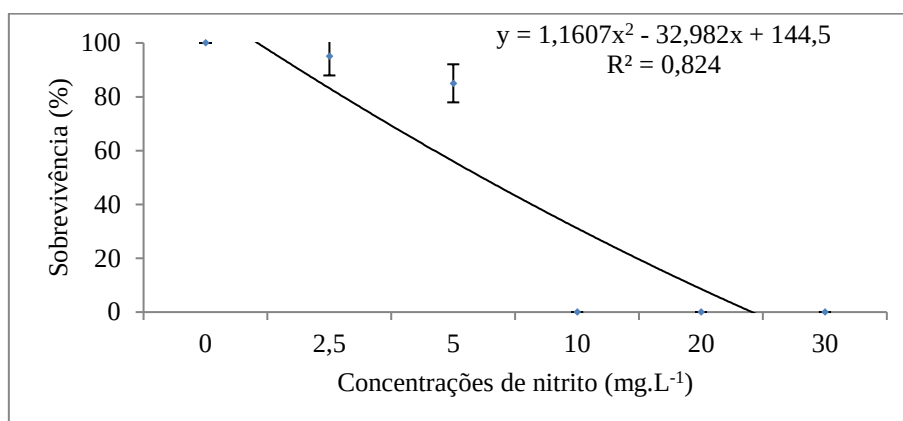


Figura 6. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) expostos a níveis crescentes de nitrito.

No experimento 1 foi possível observar o efeito da amônia na sobrevivência dos animais já nas primeiras 48 h de exposição em todas as concentrações, sendo possível estimar a CL₅₀-48h em 1,76 mg.L⁻¹ N-NH₃ e 48,7 mg.L⁻¹ N-AT. A CL₅₀-96 h de N-NH₃ foi estimada em 1,66 mg.L⁻¹ e 45,9 mg.L⁻¹ para N-AT. Os níveis de segurança calculados para N-NH₃ e N-AT foram 0,17 mg.L⁻¹ e 4,5 mg.L⁻¹, respectivamente (Tab. 3). Já com relação ao nitrito, no experimento 1, foi possível observar o efeito na sobrevivência dos animais nas primeiras 24 h de exposição. A CL₅₀-24 h de N-NO₂⁻ foi estimada em 8,35 mg.L⁻¹. O nível de segurança estimado para N-NO₂⁻ foi 0,64 mg.L⁻¹ (Tab. 5).

Tabela 5. Valores das concentrações letais medianas (CL_{50}) e intervalos de confiança (IC) da amônia (N-AT e N-NH₃) e nitrito (N-NO₂⁻) estimados durante a exposição dos girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) e os respectivos níveis de segurança (NS).

CL_{50} (mg.L ⁻¹)	Tempo (h)				Nível de segurança (mg.L ⁻¹)
	24	48	72	96	
N-AT (mg.L ⁻¹)	-	48,7 (45,6 - 50,9)	47,06 (43,5 - 50,8)	45,9 (43,4 - 48,6)	4,59
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	-	1,76 (1,38 - 1,83)	1,69 (1,32 - 1,83)	1,66 (1,32 - 1,75)	0,17
N- NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	8,35 (7,3 – 9,5)	7,52 (6,5 - 8,7)	6,83 (6,1 - 7,7)	6,43 (5,7 - 7,3)	0,64

No experimento 2 foi possível determinar a CL_{50} da amônia na sobrevivência dos animais para 72 h de exposição (Fig. 7). A CL_{50} -72 h de N-NH₃ foi estimada em 1,07 mg.L⁻¹, e a N-AT de 47,06 mg.L⁻¹ (Tab. 6). Os níveis de segurança calculados para N-AT e N-NH₃ foram 4,06 mg.L⁻¹ e 0,09 mg.L⁻¹, respectivamente. Já com relação ao nitrito, no experimento 2 também foi possível observar o efeito na sobrevivência dos animais nas primeiras 24 h de exposição (Fig. 8). A CL_{50} -24 h de N-NO₂⁻ foi estimada em 8,69 mg.L⁻¹ (Tab. 4). O nível de segurança estimado para N-NO₂⁻ foi 0,69 mg.L⁻¹ baseado na CL_{50} -96h de 6,94 mg.L⁻¹ N-NO₂⁻.

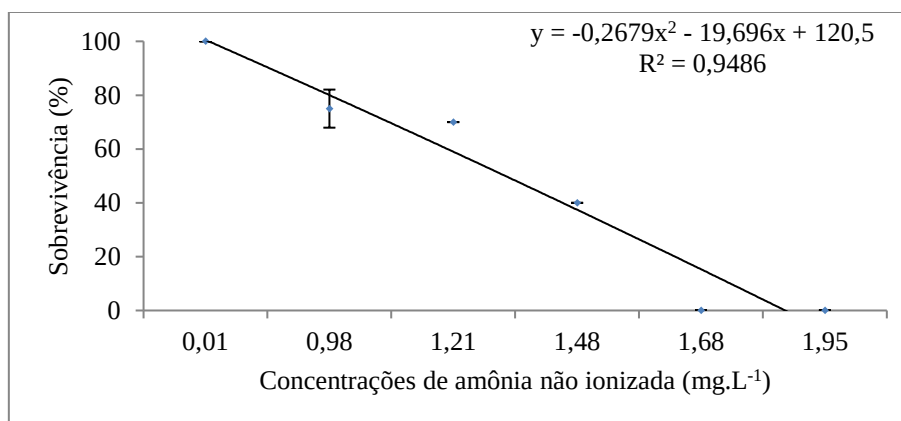


Figura 7. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) expostas a níveis crescentes de amônia não ionizada (N-NH₃).

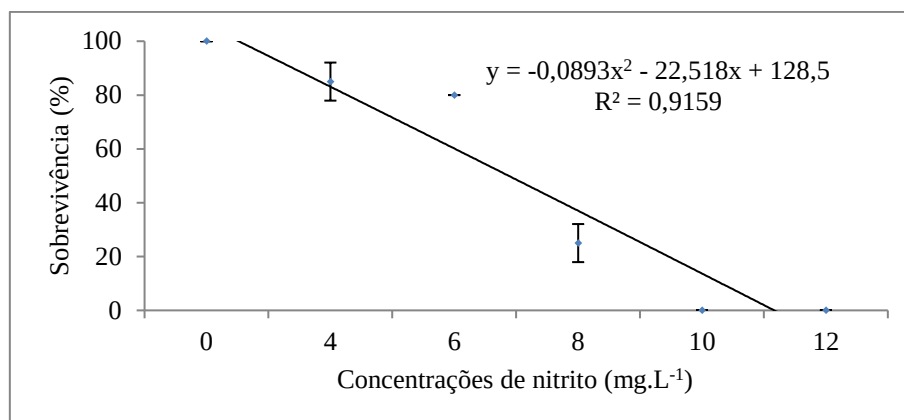


Figura 8. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) expostos a níveis crescentes de nitrito.

Tabela 6. Valores das concentrações letais medianas (CL₅₀) e intervalos de confiança (IC) da amônia (N-AT e N-NH₃) e nitrito (N-NO₂⁻) estimados durante a exposição dos girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) e o nível de segurança (NS).

CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Tempo (h)				Nível de segurança (mg.L ⁻¹)
	24	48	72	96	
N-AT (mg.L ⁻¹)	-	-	47,06 (44,1 - 50,3)	40,62 (38,5 - 42,8)	4,06
N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	-	-	1,07 (1,0 - 1,14)	0,93 (0,84 - 1,03)	0,09
N- NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	8,69 (8,0 - 9,44)	7,75 (7,17 - 8,37)	7,13 (6,67 - 7,63)	6,94 (6,18 - 7,80)	0,69

3.2. Biomarcadores morfológicos

Nas Figuras 9, 10 e 11 podem ser observados os dados de índice de reação do órgão (I_{org}) para amônia não ionizada (N-NH₃) do experimento 1.

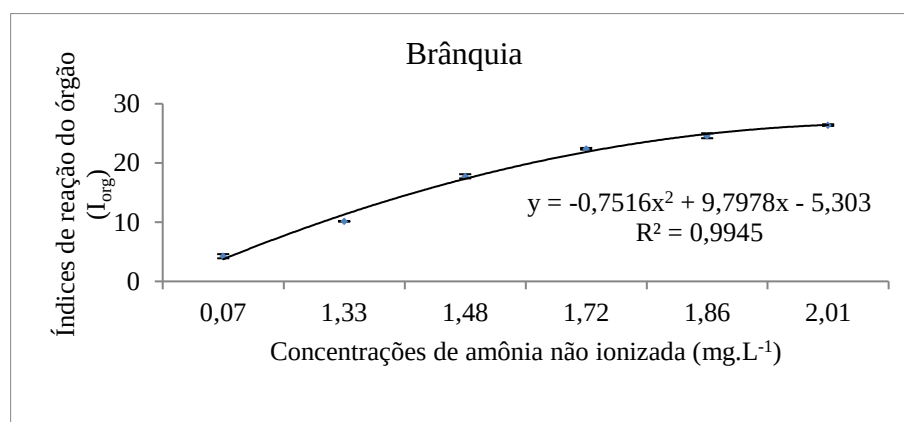


Figura 9. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-NH₃).

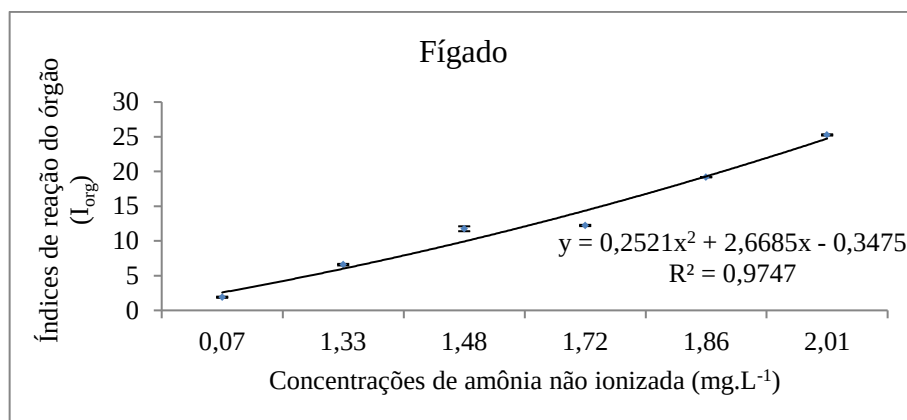


Figura 10. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-NH_3).

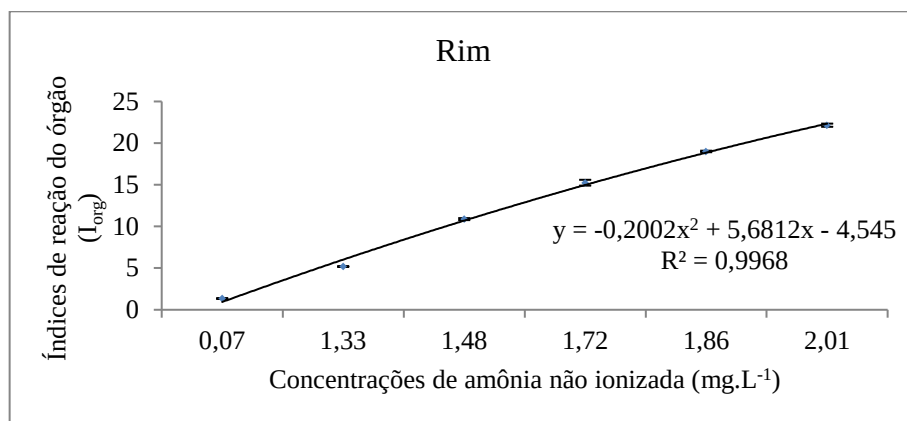


Figura 11. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) renal durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-NH_3).

Nas Figuras 12, 13 e 14 podem ser observados os dados de índice de reação do órgão (I_{org}) para nitrito do experimento 1.

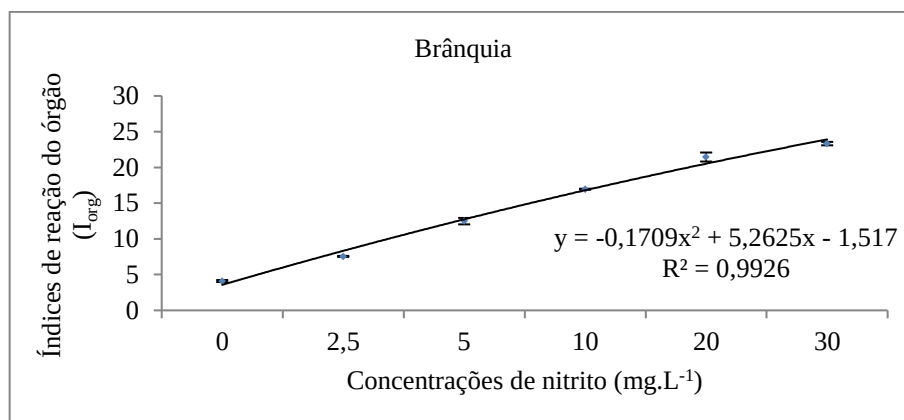


Figura 12. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO_2^-).

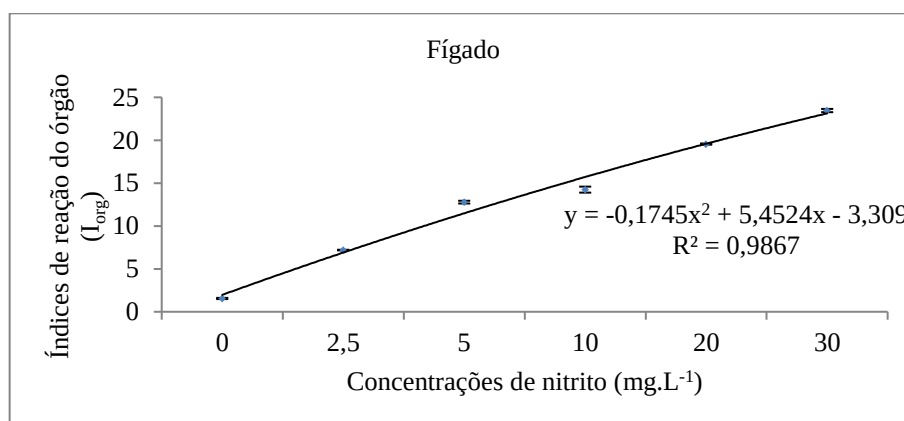


Figura 13. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO_2^-).

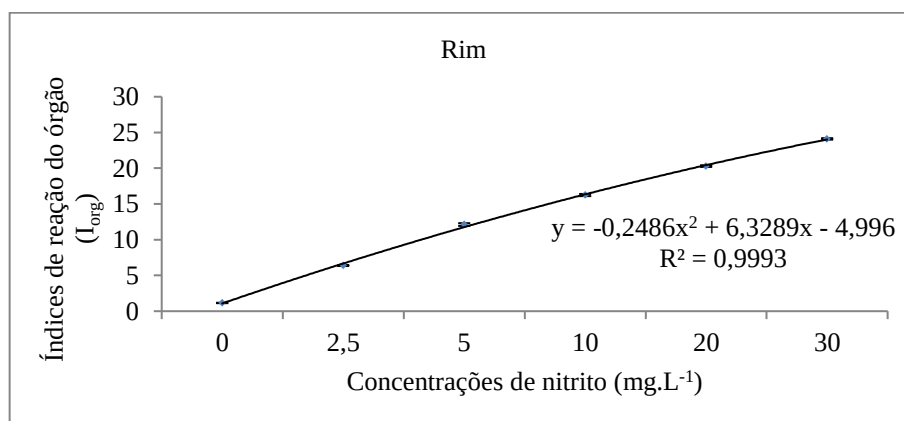


Figura 14. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) renal durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO_2^-).

Os três índices I_{org} (brânquia, fígado e rim) do experimento 1 aumentaram quando os animais foram expostos a concentrações a partir de $1,33 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-NH_3 , e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-NO_2^- , e as alterações se intensificaram a medida em que as concentrações aumentaram.

Nas Figuras 15 e 16 podem ser observados os dados de índice de reação do órgão (I_{org}) para amônia não ionizada (N-NH_3) do experimento 2.

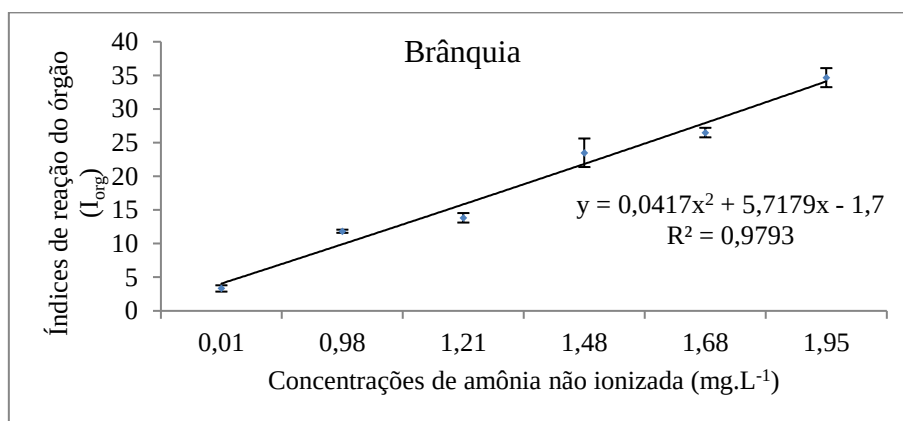


Figura 15. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-NH_3).

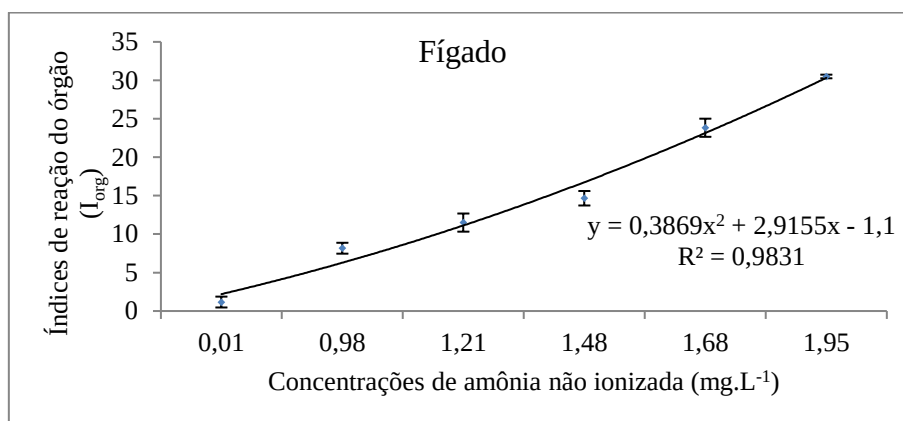


Figura 16. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-NH_3).

Nas Figuras 17 e 18 podem ser observados os dados de índice de reação do órgão (I_{org}) para nitrito do experimento 2.

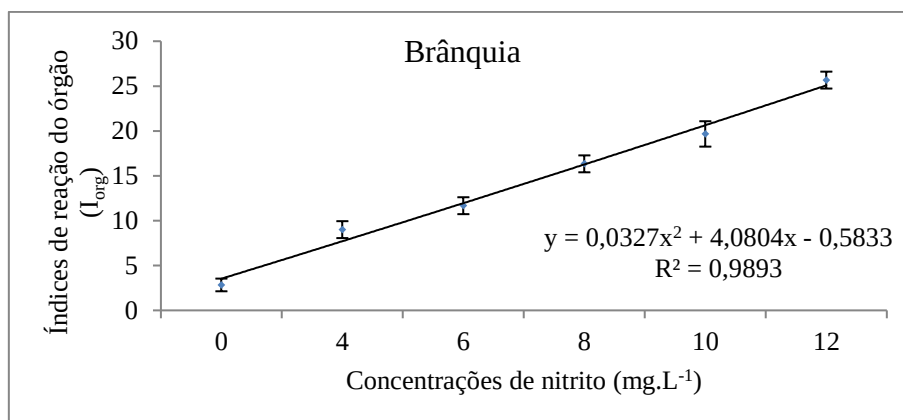


Figura 17. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) branquial durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).

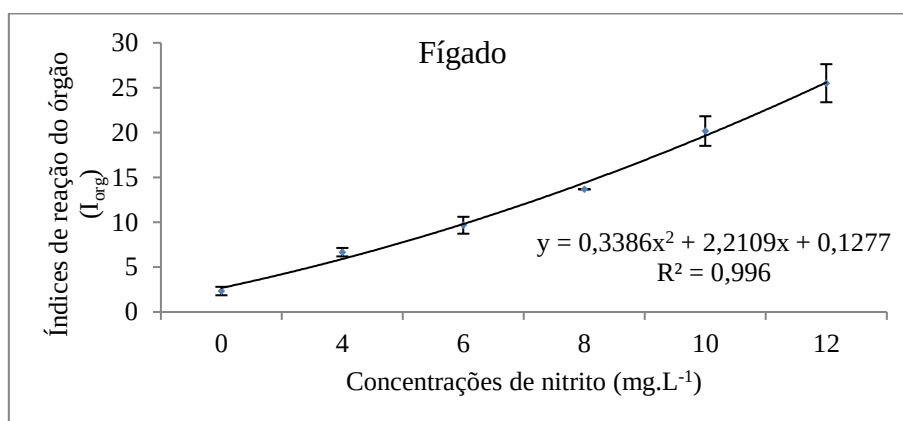


Figura 18. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do Índice de reação do órgão (I_{org}) hepático durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rãs touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960) a diferentes concentrações de nitrito ($N-NO_2^-$).

A amônia e o nitrito foram capazes de causar alterações morfológicas nas brânquias, fígado e rins neste estudo (Fig. 19, 20, 21 e 22). As brânquias no grupo controle de ambos os compostos, nos dois experimentos, apresentaram hiperplasia leve e desprendimento do epitélio respiratório (Fig. 19A, 20A, 21A e 22A). Essas alterações branquiais são comuns, e pequenas alterações são esperadas por estarem em contato contínuo com a água.

As alterações encontradas nas brânquias dos animais expostos à $N-NH_3$ e $N-NO_2^-$ foram hipertrofia das células, descolamento do epitélio, desorganização, ruptura do epitélio lamelar e fusões de tufos branquiais. Lesões que se tornaram mais frequentes, com a intensidade variando de moderada a severa, nas maiores concentrações testadas de ambos compostos nitrogenados (Fig. 19 B-C, 20 B-C, 21 B-C e 22B-C), assim como mostra o índice de órgão.

A análise histológica do fígado dos girinos do grupo controle de ambos os compostos exibiu uma arquitetura parenquimatosa normal para espécie, com hepatócitos em arranjo cordonal, citoplasma homogêneo com núcleo centralizado, vasos sinusóides e presença de células de Kupffer (Fig. 19D). Já nos girinos expostos aos compostos nitrogenados, as alterações histopatológicas observadas foram: dilatação dos sinusóides, hepatócitos em desarranjo cordonal, vacuolização dos hepatócitos, degeneração celular e nuclear, congestão sanguínea e necrose (Fig. 19E-F, 20E-F, 21 E-F e 22 E-F).

A arquitetura renal dos girinos do tratamento controle de ambos os testes apresentaram características normais para a espécie (Fig. 19G e 20G). Houve alterações histopatológicas nos rins dos girinos quando comparados ao controle após as exposições a ambos os compostos nitrogenados. Os girinos de todos os tratamentos apresentaram desorganização tecidual, hipertrofia dos túbulos renais e áreas de necrose.

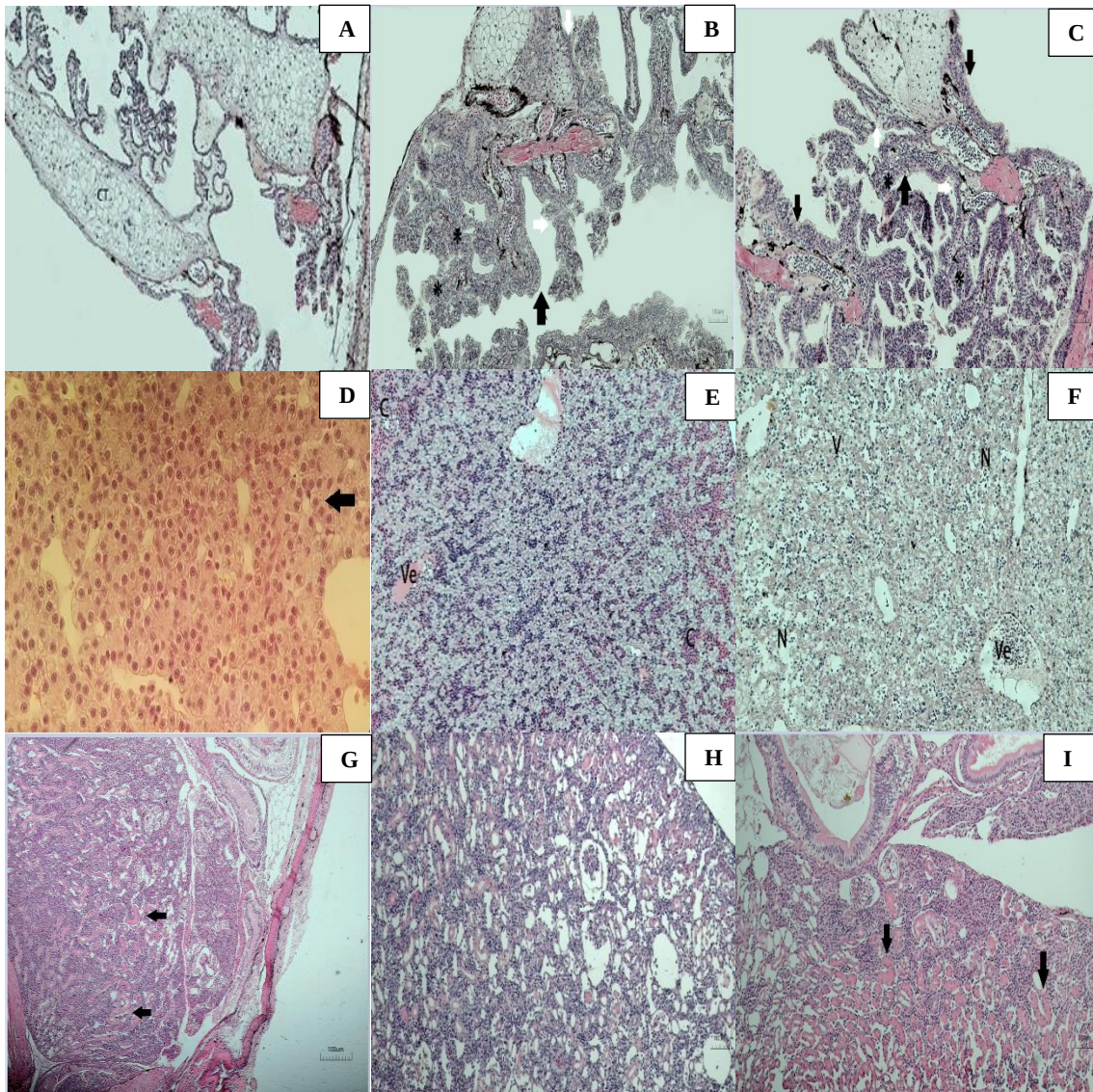


Figura 19. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* no estágio 35 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de amônia por 96 h, onde se observa: A - Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B - Brânquias dos animais expostos a 10 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) em aumento de 100X; C - Brânquias dos animais expostos a 60 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) e fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) em aumento de 100X; D - Fígado dos animais do grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (setas) em aumento de 400x; E - Fígado dos animais expostos a 45 mg.L⁻¹ e F - Fígado dos animais expostos a 60 mg.L⁻¹ de N-AT em aumento de 100X – observa-se em ambas as imagens o aumento da vacuolização dos hepatócitos e a congestão dos sinusóides, necrose (N), congestão dos sinusóides (C), vacuolização (V), veia central (Ve); G - Rim dos animais do grupo controle 100x, túbulos renais (setas pretas); H - Rim dos animais expostos a 50 mg.L⁻¹ de N-AT- desorganização tecidual; I – Rim dos animais expostos a 60 mg.L⁻¹ de N-AT, 100X - intensa desorganização tecidual com perda de estruturas celulares e áreas de necrose tecidual. Coloração HE.

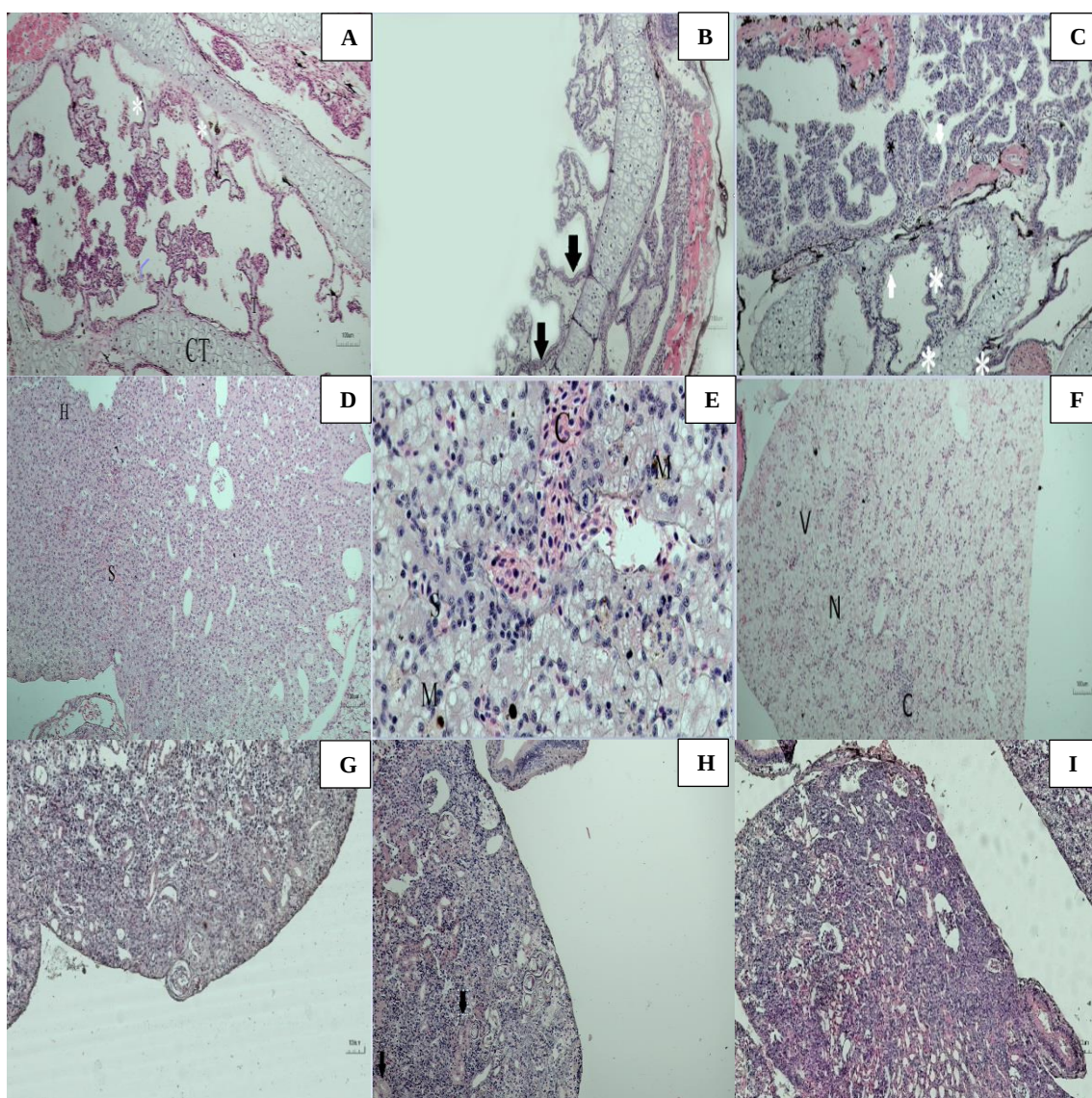


Figura 20. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* no estágio 35 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de N-NO_2^- por 96 h, onde se observa: A - Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B - Brânquias dos animais expostos a 50 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , hiperplasia (seta preta) em aumento de 100X; C - Brânquias dos animais expostos a 60 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , hiperplasia (seta preta), descolamento epitelial (asterisco branco) e fusão dos tufo branquais (asterisco preto) em aumento de 100X; D - Fígado dos animais do grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (H), sinusóides (S) em aumento de 100x; E - Fígado dos animais expostos a $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-NO_2^- , congestão dos sinusóides (C), sinusóides (S) e melanomacrófagos (M) em aumento de 400x; F - Fígado dos animais expostos a 30 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , com intensa vacuolização dos hepatócitos (V), necrose (N) e congestão dos sinusóides (C) em aumento de 100x; G - Rim dos animais do grupo controle em aumento de 100x; H - Rim dos animais expostos a 10 mg.L^{-1} de N-NO_2^- com desorganização tecidual e túbulos renais hipertrofiados (setas pretas) em aumento de 100x; I - Rim dos animais expostos a 30 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , com intensa desorganização tecidual com perda de estruturas celulares e áreas de necrose tecidual em aumento de 100x. Coloração HE.

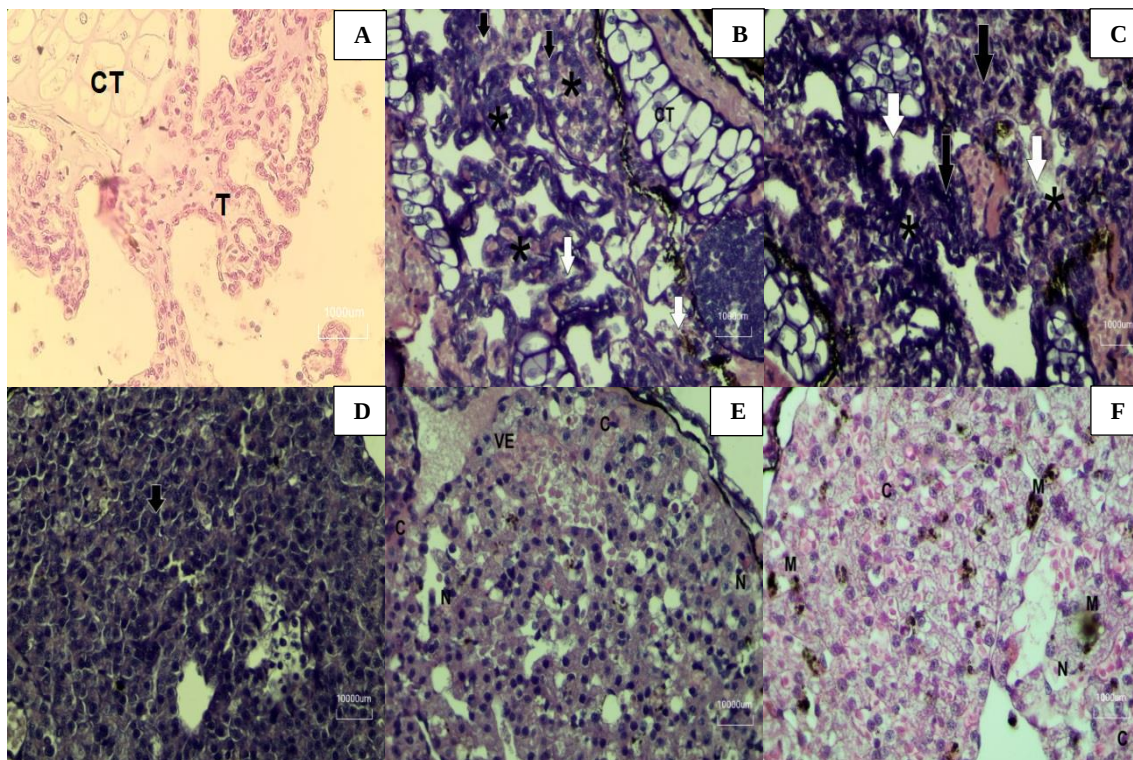


Figura 21. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* estágio 25 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de N-AT por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B – Brânquias dos animais expostos a 30 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 58 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), necrose (seta branca) e fusão dos tufos branquais (asterisco preto) em aumento de 400X; D – Fígado dos animais do grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (setas) em aumento de 400x; E - Fígado dos animais expostos a 30 mg.L⁻¹ e F - Fígado dos animais expostos a 58 mg.L⁻¹ de N-AT em aumento de 400X – observa-se em ambas a imagens o aumento da vacuolização dos hepatócitos e intensa desorganização tecidual com perda de estruturas celulares, necrose (N), congestão dos sinusóides (C), veia central (Ve), melanomacrófagos (M). Coloração HE.

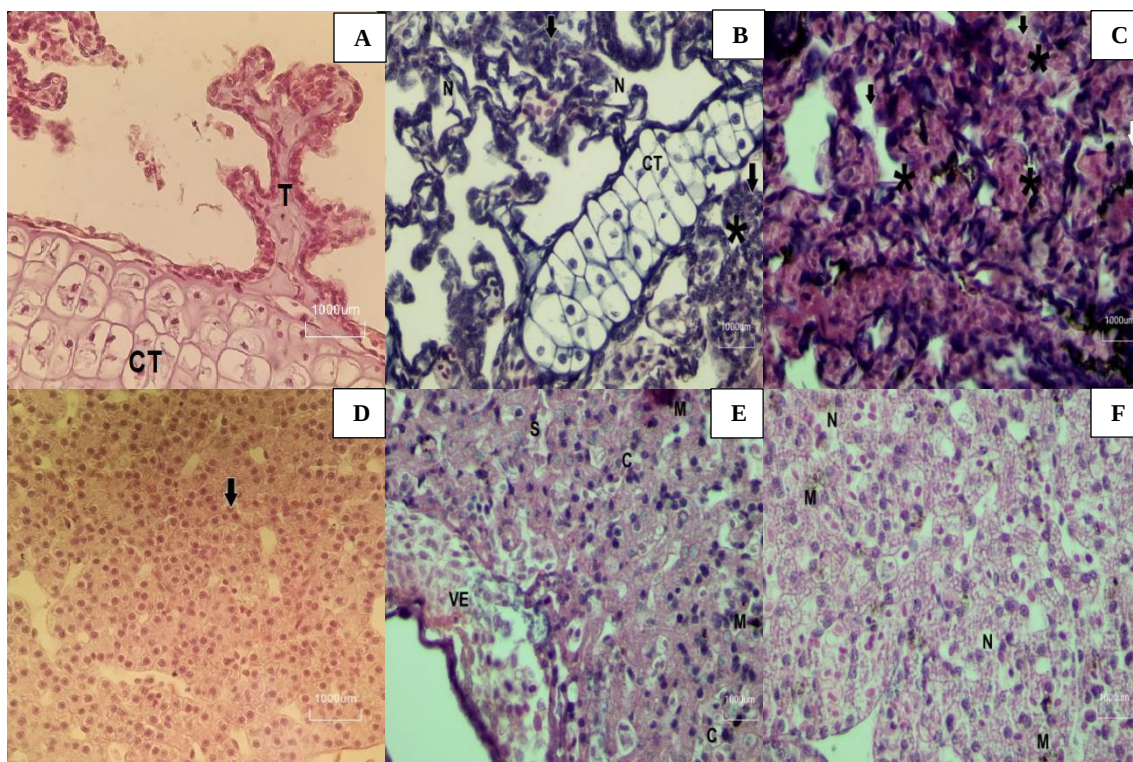


Figura 22. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* estágio 25 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de N-NO_2^- por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B – Brânquias dos animais expostos a 4 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , hiperplasia (seta preta), fusão dos tufos branquiais (asterisco preto), necrose (N) em aumento de 100X; C – Brânquias dos animais expostos a 12 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , hiperplasia (seta preta), fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) em aumento de 400X; D – Fígado dos animais do grupo controle hepatócitos poligonais arranjados em cordões (setas) em aumento de 100x; E - Fígado dos animais expostos a 6 mg.L^{-1} , congestão dos sinusóides (C), sinusóides (S), veia central (Ve) e melanomacrófagos (M) em aumento de 400x; F – Fígado dos animais expostos a 12 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , com intensa vacuolização dos hepatócitos, necrose (N) e presença de melanomacrófagos (M) em aumento de 400x. Coloração HE.

4. DISCUSSÃO

A amônia e o nitrito são compostos tóxicos para os organismos aquáticos (Miranda-Filho et al., 2009, Miranda-Filho e Costa, 2016). Ao se interpretar dados toxicológicos de amônia, deve-se atentar também aos parâmetros de qualidade de água do ambiente em que o animal estava exposto. No contexto toxicológico, quando o pH é neutro ou ácido, verifica-se que NH_4^+ predomina, enquanto NH_3 tende a ser tóxico quando o pH é alcalino, ou seja, básico (Pereira e Mercante, 2005). Para anfíbios, a tolerância a valores de pH mais ácido é influenciado por fatores taxonômicos,

geográficos, ambientais, ecológicos e genéticos (Pierce, 1985). Em extremos ácidos e básicos de pH vê-se efeito negativo sobre as taxas de crescimento e anormalidades de desenvolvimento (Farquharson et al., 2016). Mudanças bruscas no pH podem gerar também mortalidades em anuros, enquanto pequenas mudanças, próximas a neutralidade do pH, podem gerar efeitos subletais como anormalidades e atrasos no desenvolvimento embrionário, malformações e natação errática nos girinos, que posteriormente podem se refletir em mortalidades (Muñoz e Batista, 2011). No presente estudo, o pH manteve-se próximo a 7,7, fazendo com que uma pequena fração da amônia não ionizada (NH_3), estivesse presente; sabe-se que mesmo em concentrações muito baixas a amônia gasosa pode ser responsável pela intoxicação dos animais.

O acúmulo de amônia no sistema de cultivo, juntamente com o aparecimento do nitrito pelo processo de nitrificação levam a intoxicação, deformidade das larvas (Jensen, 2003), interferência sobre o crescimento e mortalidades (Luo et al., 2016). Uma vez no ambiente aquático a amônia é oxidada, principalmente por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, em nitrito (NO_2^-), esse por sua vez pode posteriormente ser oxidado em nitrato (NO_3^-), desta vez pela ação predominante de bactérias do gênero *Nitrobacter* (Martinez et al., 2006). Esta última é a forma nitrogenada menos tóxica para os organismos aquáticos, já o nitrito é tóxico, assim como a amônia (Yanbo et al., 2006).

Quando os níveis de NH_3 na água se elevam, as concentrações no plasma do animal, assim como, de outros tecidos como brânquias, fígado, cérebro, músculo e rim também se elevam (Zhang et al., 2012), pela redução da difusão pelo gradiente de concentração entre o animal e a água circundante. A amônia não ionizada é de natureza lipofílica difundindo-se facilmente pelas membranas celulares (Kormanik e Cameron, 1981) por difusão (Roumieh et al., 2012), sendo que a maioria das membranas biológicas é permeável ao NH_3 , mas relativamente impermeável aos íons amônio (Randall e Tsui, 2002).

Dentro da célula, no citosol, o NH_3 sofre protonação, sendo transformado em NH_4^+ , liberando hidroxilas (OH^-), e interferindo sobre pH sanguíneo, conferindo a ele caráter alcalino; sendo que essa alteração de pH pode ter efeito sobre as ações das enzimas e sobre a estabilidade das membranas (Arana 1997; Pereira e Mercante, 2005; Zhang et al., 2012).

A toxicidade aguda da amônia deve-se principalmente ao seu efeito no sistema nervoso central dos vertebrados, podendo causar convulsões, coma e morte dos animais acometidos (Randall e Tsui 2002). Schimdt et al. (1993) enfatizam que altos níveis de amônia no cérebro levam a altos níveis de glutamato extracelular, aumentando a liberação de glutamato e/ou diminuindo a recaptação sináptica de glutamato. Também foi proposto que a toxicidade da amônia seja mediada pela ativação excessiva dos receptores de glutamato do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato) (Marcaida et al., 1992). A ativação excessiva desses receptores leva ao influxo de Ca^{2+} e Na^+ , podendo o Ca^{2+} intracelular aumentado ativar enzimas dependentes dessa substância e ocorrer uma cascata de reações que podem resultar em apoptose celular (Randall e Tsui 2002).

Já o amônio pode atuar no sítio de ligação do K^+ junto à enzima Na^+/K^+ ATPase e na $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransportador, afetando o mecanismo osmorregulatório e o equilíbrio iônico em peixes (Randall e Tsui, 2002; Roumieh et al., 2012). Randall e Tsui (2002) enfatizam que a principal causa da toxicidade da amônia pode ser o efeito de despolarização do NH_4^+ nos neurônios, levando à ativação excessiva dos receptores NMDA e subsequente morte celular. Em águas alcalinas, a quantidade de H^+ é baixa, o que interfere na dinâmica de equilíbrio da conversão de NH_3 para NH_4^+ e nestas condições, o gradiente de difusão do plasma para a água é prejudicado, resultando no acúmulo no plasma e nos tecidos (Wilkie e Wood, 1996).

A comparação dos animais em diferentes fases de vida justifica-se devido as necessidades de adensamento dos animais nos sistemas de cultivo, e na percepção se os girinos de rãs-touro são mais sensíveis nesses diferentes estágios de vida. Percebe-se que os girinos no estágio 25 de Gosner (1960), tiveram uma tolerância a NH_3 , baseada na interpretação da $\text{CL}_{50-96\text{h}}$, relativamente menor do que os girinos no estágio 35 de Gosner (1960), ou seja, os girinos mais jovens são mais sensíveis, indicando que a toxicidade da amônia para a espécie é influenciada pela idade. Já com relação ao NO_2^- , girinos no estágio 25 de Gosner (1960), tiveram uma tolerância relativamente maior do que os girinos no estágio 35 de Gosner (1960).

Utilizando diferentes espécies de peixes para comparar com a mesma substância teste do estudo, Cardoso et al. (1996) estimaram $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ em juvenis (0,4 g) de pacamã (*Lophosilurus alexandri*) em 0,92 mg.L^{-1} de N- NH_3 , e Santos-Silva et al. (2018), com a mesma espécie (33,87 g) estimaram $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ de 4,57 mg.L^{-1} de N- NH_3 . Já para larvas

de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (56 mg) e alevinos (10,11 g), Benlí e Köksal (2005) estimaram CL_{50-48h} de 1,01 $mg.L^{-1}$ e 7,40 $mg.L^{-1}$ de $N-NH_3$, respectivamente. Para juvenis (11,04 g) de jundiá (*Rhamdia quelen*) a CL_{50-96h} foi estimada em 2,09 $mg.L^{-1}$ de $N-NH_3$ (Miron et al., 2008), e para juvenis (26 g) de piava (*Leporinus obtusidens*) em 0,27 $mg.L^{-1}$ (Copatti et al., 2015). A $CL_{50-96 h}$ para catfish amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) (0,29 g) foi estimada em 0,49 $mg.L^{-1}$ de $N-NH_3$ (Zhang et al., 2012). A piava, dos peixes mencionados, foi o menos tolerante à amônia, o que sugere a diferenciação do metabolismo dos animais frente à intoxicação. A toxicidade de amônia e nitrito em peixes depende da espécie, tamanho, fase de desenvolvimento e sexo (Zhang et al., 2012).

O nitrito na água pode ser ativamente absorvido pelo epitélio branquial e pode acumular-se em altas concentrações nos fluidos corporais (Kroupova et al., 2005). Também pode causar depleção dos níveis intra e extracelulares de cloreto (Cl^-), causando desequilíbrio de eletrólitos, depleção de potássio (K^+) intracelular e elevação de K^+ extracelular afetando os potenciais de membrana, neurotransmissão, contração muscular e função cardíaca; e danos às mitocôndrias nas células do fígado, comprometendo o transporte de oxigênio ao tecido (Camargo e Alonso, 2006).

Em peixes, a intoxicação por nitrito (NO_2^-) ocorre por transporte ativo através das células de cloreto (Huertas et al., 2002). No ambiente intracelular, o nitrito pode causar alterações metabólicas (Kroupova et al., 2005; Hegazi et al., 2010), assim como lesões teciduais (Cardoso et al., 1996; Santos-Silva et al., 2018). O nitrito pode provocar a oxidação do ferro presente na molécula de hemoglobina, transformando-a em metahemoglobina, incapaz de transportar oxigênio aos tecidos, podendo exercer um quadro de hipóxia (Lewis e Morris, 1986; Kosaka e Tyuma, 1987; Martinez e Souza, 2002; Jensen, 2003). A toxicidade do nitrito em peixes varia consideravelmente e depende de fatores como o tamanho, fase de desenvolvimento, espécie, além dos parâmetros de qualidade da água (pH, temperatura, oxigênio) (Svobodová et al., 2005), e acredita-se que em anfíbios seja da mesma forma.

Com relação às pesquisas toxicológicas com $N-NO_2^-$, a CL_{50-96h} para jundiá (*R. quelen*) foi estimada em 195,3 $mg.L^{-1}$ (Miron et al., 2008), para bacalhau (*Gadus macrocephalus*) foi de 304,71 $mg.L^{-1}$ (Wang et al., 2015) e para o pacamã (*L. alexandri*) foi de 5,86 $mg.L^{-1}$ (Santos-Silva et al., 2018). Yanbo et al. (2006), ao trabalharem com

tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (4,9 g), mantidas em salinidades de 0,035‰ obtiveram valores de CL₅₀-96h de 28,18 mg.L⁻¹. Já para bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) (0,29 g), a CL₅₀-96h foi estimada em 97,23 mg.L⁻¹ (Zhang et al. 2012). Esses autores corroboram as informações de susceptibilidade individual de cada espécie para o NO₂⁻.

Destacando as pesquisas com anfíbios, a salamandra *Ambystoma texanum* exposta ao N-NO₂⁻ em baixas concentrações de Cl⁻ tiveram CL₅₀-96h de 0,33 mg.L⁻¹, e uma taxa de mortalidade de 100% quando as larvas foram expostas a 0,76 mg.L⁻¹ (Huey e Beitinger, 1980b). A toxicidade do nitrito depende do pH e da concentração de cálcio e de cloretos na água (Queiroz e Boeira, 2007), devido à competição destes pelo mesmo transportador nas células de cloreto das brânquias (Williams e Eddy, 1986). Os resultados observados e *A. texanum* se assemelham aos encontrados em peixes de água doce, já que o grupo é hiperosmótico em relação ao meio, apresentando elevada taxa de captação de íons. O NO₂⁻ compete pelo mecanismo de captação branquial de Cl⁻, presumivelmente o trocador Cl⁻/HCO₃⁻, deslocando Cl⁻ para o captador de NO₂⁻ (Jensen, 2003). Deste modo, o N-NO₂⁻ é absorvido, podendo causar intoxicação.

Shinn et al. (2013) estudando larvas de anfíbios das espécies rã-verde (*Pelophylax perezii*), sapo-corredor (*Bufo calamita*) e rã-de-riacho (*Hylodes meridionalis*) expostos a N-NO₂⁻, demonstraram que sua toxicidade foi fortemente atenuada pela presença de NaCl no meio aquático. Além disso, os autores mostraram que surgiram anormalidades em embriões de *P. perezii* ainda dentro do ovo gelatinoso quando expostos a NO₂⁻ sem a presença de NaCl. Isso indica que NO₂⁻ pode ter efeito deletério mesmo antes da eclosão das larvas, e que o NaCl poderia ter efeito protetor no início de seu desenvolvimento.

A salinização é uma medida adotada na aquicultura de modo que haja competição, entre o NO₂⁻ e o Cl⁻, pelos sítios de ligação e absorção (Svobodová et al., 2005). Aumentar a salinidade da água, é uma forma de diminuir a toxicidade do nitrito por inibição competitiva (Shinn et al., 2013). Medidas como essa podem ser favoráveis no gerenciamento de raniculturas com valores altos de nitrito e na ausência de volume de água necessário para trocas de água. No entanto, pesquisas são necessárias para determinar os limites de segurança do sal para as diferentes espécies de anfíbios.

O uso de indicadores bioquímicos, fisiológicos ou histológicos, tem sido adotado como biomarcadores de substâncias químicas (Bernet et al., 1999; Svobodová et al.,

2005). Os biomarcadores podem responder rapidamente aos estressores, agindo como alerta precoce de efeitos que podem ser manifestados em níveis mais elevados de organização biológica (Adams, 2001). No presente estudo, a histologia foi empregada como ferramenta de detecção de respostas dos girinos frente à exposição à amônia e ao nitrito, que estão entre os principais contaminantes no contexto da aquacultura (Díaz et al., 2011; Rosa et al., 2020).

Empregando o índice de órgão aplicado à histologia, Santos-Silva et al. (2018) trabalhando com pacamãs (*L. alexandri*) expostos a N-NH₃ e N-NO₂⁻, obtiveram um I_{org} para as brânquias de 20, para concentração de 10,76 mg.L⁻¹ de N-NH₃, e I_{org} de 18, para 233,49 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻. Resultados similares foram encontrados no presente estudo para exposições de 50 mg.L⁻¹ de N-NH₃ e 10 mg.L⁻¹ N-NO₂⁻, quais sejam I_{org} de 22,4 e I_{org} de 19,67, respectivamente,

O uso de indicadores quantitativos histopatológicos em estudos toxicológicos com peixes e anfíbios são escassos na literatura científica, encontram-se, frequentemente, descrições qualitativas das lesões encontradas, o que gera uma interpretação incompleta do grau de acometimento dos organismos submetidos à exposição aos xenobióticos.

Com o aumento da amônia, o pH do sangue se eleva, reduzindo as atividades enzimáticas, resultando em desestabilidade de organelas e danos teciduais (Das et al., 2004a). Altas concentrações de amônia ou nitrito estimulam intensamente a pele e as brânquias, resultando em perda da função respiratória (Zhang et al., 2012), sendo que as brânquias são um dos primeiros órgãos a sofrer os impactos da exposição a poluentes devido ao contato direto com meio circundante (Miron et al., 2008).

A brânquia é um órgão multifuncional essencial para organismos aquáticos e está envolvida nas trocas gasosas, osmorregulação, ionorregulação e excreção (Perry, 1997; Au, 2004; Santos et al., 2021). Apresentam alta taxa de perfusão (Heath, 1987) o que facilita o acesso do xenobiótico ao meio interno do organismo, propiciando alterações fisiológicas. Além disso, sua suscetibilidade ao aparecimento de lesões após exposição à produtos químicos na água, a torna um importante biomarcador histopatológico (Bernet et al., 1999; Au, 2004).

O aparelho branquial de *A. catesbeiana* é sustentado por quatro pares de arcos branquiais. Cada um desses arcos apresenta duas fileiras de filamentos altamente ramificados, dando origem a um número variável de projeções em forma de “dedos”

(Burggren e Mwalukoma, 1983). Cada arco branquial insere-se ventralmente nos tufos branquiais e dorsalmente nos filtros branquiais (Viriato et al., 2021), que exercem função de um filtro especializado na retenção de partículas, sendo importante portanto, na alimentação (Viertel, 1982). A brânquia possui tufos primários e secundários com numerosas ramificações digitiformes e são altamente vascularizadas (Burggren e Mwalukoma, 1983; Malvin 1989; Minnich et al. 2002), sendo responsáveis pelas trocas gasosas, o que corresponde à função das lamelas branquiais nos peixes (Santos et al., 2021).

Após contato com o xenobiótico, a gravidade da lesão dependerá da intensidade, duração e qual o órgão acometido, podendo retornar a homeostasia, se cessado a exposição (Brasileiro-Filho, 2009). Entre as respostas desencadeadas no organismo encontram-se os processos degenerativos e necróticos, transtornos de crescimento celular como hiperplasia e hipertrofia, além de distúrbios circulatórios (Hibiya, 1982).

Algumas lesões observadas no presente trabalho coincidem com as descritas em estudos avaliando o efeito da amônia não ionizada em juvenis de pacamã (*L. alexandri*) (Cardoso et al., 1996), juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Benli et al., 2008) e em juvenis de jundiá (*R. quelen*) (Miron et al., 2008), associando as lesões encontradas, como hipertrofia das células, desorganização e ruptura do epitélio lamelar, ao comprometimento funcional das brânquias nas trocas gasosas, impedindo a função respiratória. Santos-Silva et al. (2018) trabalhando também com pacamã observaram que as lesões mais graves ocorreram na concentração de $3,58 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NH}_3$ com alterações estruturais de moderadas a graves sendo registradas com descolamento do epitélio e necrose comprometendo a maior parte do arco branquial. Essa concentração foi superior às utilizadas no presente estudo, indicando que os girinos podem ser mais susceptíveis ao N-NH_3 ao apresentar lesões similares com concentrações bem menores. Segundo Lemarié et al. (2004), o efeito tóxico da amônia é imediato, linear e dose-dependente. As alterações observadas no presente estudo, também foram relatadas após a exposição de peixes a pesticidas, fenóis e metais pesados (Nowak et al., 1992), o que confirma o grau de susceptibilidade que as brânquias apresentam frente à exposição aos xenobióticos.

Com relação às alterações causadas por NO_2^- , as brânquias, fígado e rins de peixes são altamente sensíveis ao nitrito (Das et al., 2004b), podendo apresentar danos

citológicos e histológicos (Frances et al., 1998; Park et al., 2007). Como exemplo, Santos-Silva et al. (2018) estudando a exposição ao pacamã (*L. alexandri*) observaram que as lesões mais graves ocorreram na concentração de 55,24 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ com alterações como descolamento do epitélio, aneurismas e necrose comprometendo a maior parte do arco branquial. Concentração bem maior a utilizada no presente estudo, indicando a suscetibilidade da espécie em ambos os estágios de vida.

O acúmulo de NO₂⁻ no sistema de produção não só causa toxicidade aguda e mortalidade, mas pode afetar cronicamente mesmo em concentrações mais baixas se expostos por períodos prolongados (Wuertz et al., 2013). Alguns estudos têm demonstrado os efeitos tóxicos do NO₂⁻ em estágios larvais de anfíbios (Huey e Beitinger, 1980a, 1980b; Marco e Blaustein, 1999; Marco et al., 1999), existindo diferença de sensibilidade entre as espécies e até mesmo entre diferentes estudos conduzidos na mesma espécie (Marco e Ortiz-Santaliestra, 2009). Na presença de NO₂⁻, a atividade locomotora reduzida e anormalidades morfológicas podem resultar em maior risco de predação e dificultar o sucesso na metamorfose (Ortiz-Santaliestra et al., 2010).

Pesquisas demonstram que a amônia não ionizada (NH₃) é a forma de nitrogênio mais tóxica para os organismos aquáticos, seguida pelo nitrito e nitrato, respectivamente (Camargo e Ward, 1992). No entanto, a dinâmica e os mecanismos de atuação desses poluentes para os anfíbios não estão bem esclarecidos (Marco e Ortiz-Santaliestra, 2009). Hecnar (1995) enfatiza que as moléculas de NH₄⁺, NH₃, NO₂⁻ e NO₃⁻ do meio, penetram o corpo dos anfíbios por difusão através da pele, brânquias, pulmões e/ou por ingestão. Embora o nitrito seja mais tóxico que o nitrato, a ação tóxica desses íons são similares, já que há a redução do nitrato a nitrito na cavidade digestiva devido às condições corporais internas (Camargo e Alonso, 2006). Acredita-se ainda que ambos os compostos possam atuar como disruptores endócrinos, influenciando o funcionamento da tireóide e o equilíbrio hormonal (Guillette e Edwards, 2005).

O processo de acometimento das lesões branquiais pode ser dividido em dois grupos, o primeiro das lesões causadas pelo efeito deletério direto da substância, onde predomina a necrose e ruptura de epitélio, cuja morte celular ocorre por autólise ou ação lítica do agente e, o segundo, pelas alterações desenvolvidas como defesa em resposta à substância (Mallatt, 1985). Neste caso, as alterações atuam como barreira na defesa do

contato e absorção do poluente, mas que podem levar a asfixia do animal por dificultar as trocas gasosas.

Como as brânquias respondem rapidamente às mudanças ambientais (Kostić et al., 2017), o aumento dos índices de órgão está relacionado ao efeito intensificado dos compostos amônia e nitrito na água. As brânquias de peixes expostos a agentes estressores apresentam inicialmente desprendimento do epitélio respiratório (Winkaler et al., 2001), reduzindo a funcionalidade do órgão atingido (Bernet et al., 1999), em uma possível tentativa de diminuir a contaminação pela substância tóxica. Essa mudança rápida e reversível ocorre como resposta às condições de estresse/presença de contaminação, resultando em um aumento da distância de difusão entre a água e o sangue (Kostić et al., 2017).

Já a hiperplasia é o aumento da proliferação celular, em virtude de uma elevação na atividade mitótica podendo levar a fusão lamelar (Thomson, 1978), e podendo também ser induzida por irritação química ou aumento funcional do órgão (Mumford et al., 2007). É uma das primeiras alterações histopatológicas nas brânquias de peixes expostos à amônia (Benlí e Köksal, 2005). Esse tipo de alteração aumenta a distância entre a água e o sangue, em virtude da redução ou cessação da passagem da água entre as lamelas secundárias hiperplásicas (Erkmen e Kolankaya, 2000; Lupi et al., 2007), criando uma barreira. Ela vai reduzir o espaço interlamelar, podendo causar uma fusão lamelar, diminuindo a superfície para absorção de xenobióticos (Bernet et al., 1999; Koca et al., 2005; Robbins e Cotran, 2005; Camargo e Martinez, 2007). A hiperplasia, juntamente com o desprendimento epitelial e aumento da secreção de muco, reduzem as trocas gasosas, podendo levar a ruptura de vasos sanguíneos, hemorragia (Nowak et al., 1992; Thophon et al., 2003), e hipóxia (Mallatt, 1985; Camargo e Martinez, 2007), se a exposição ao agente tóxico não for interrompida.

A fusão lamelar encontrada em todos os grupos expostos neste experimento para nitrito e amônia evidencia uma tentativa do organismo de evitar a maior absorção desses compostos pelas brânquias. A fusão lamelar pode ser vista como alteração protetora na medida em que diminui a quantidade de área de superfície branquial vulnerável (Malat, 1985). Alterações na morfologia das brânquias em resposta a um ambiente particular podem ser fundamentais para conservar as funções fisiológicas (Erkmen e Kolankaya, 2000). A hipertrofia, por sua vez, é o aumento quantitativo dos constituintes e das

funções celulares, resultando no aumento volumétrico das células (Brasileiro-Filho, 2009), sendo um tipo de alteração progressiva, que leva a um aumento da atividade das células ou tecidos (Bernet et al., 1999).

As lesões acima relatadas implicam na atividade dos mecanismos de defesa dos animais, pois reduzem a área de superfície vulnerável da brânquia ou a barreira de difusão química (Erkmen e Kolankaya, 2000). Esses tipos de lesões histopatológicas indicam que os girinos respondem aos efeitos dos agentes tóxicos presentes na água. As alterações encontradas no presente estudo são similares com as descritas em outras recentes pesquisas envolvendo respostas biológicas de girinos frente a intoxicações, sendo que as lesões mais frequentes foram: hiperplasias, desprendimento epitelial e fusão lamelar, em rãs-touro expostas de forma crônica (49 dias de exposição) ao herbicida 2,4-D (DMA[®] 806) (Viriato et al., 2021); e fusão lamelar, hiperplasia, hipertrofia, telangiectasia e desprendimento epitelial em rãs-touro expostas de forma crônica (192 h de exposição) ao formaldeído (Santos et al., 2021). Essas lesões implicam comprometimento de funções respiratórias e osmoregulatórias após exposição, demonstrando que diferentes compostos químicos podem causar respostas branquiais similares.

Geralmente, as alterações histopatológicas de brânquia são responsivas, mas não específicas à exposição a poluentes (Au, 2004), sendo que depois de cessada a ação do agente agressor, a célula pode retornar ao seu estado de homeostase dependendo da qualidade, intensidade e duração da agressão, bem como do estado funcional ou tipo celular comprometido (Brasileiro-Filho, 2009).

As alterações histopatológicas no fígado também podem ser observadas nos girinos de rãs-touro expostos à amônia e ao nitrito. O fígado de anfíbios desempenha funções importantes relacionadas ao metabolismo e excreção de substâncias (Marcantonio et al. (2022), e lesões hepáticas podem ter consequências negativas na desintoxicação e homeostase do animal (Monteiro et al., 2018). O fígado é um órgão de intensa atividade metabólica, que desempenha papel fundamental no metabolismo e biotransformação, e excreção de compostos xenobióticos, sendo, portanto, essencial na manutenção da homeostase metabólica do animal (Hinton e Laurén, 1990; Bernet et al., 1999; Franco-Belussi et al., 2021) e está envolvido em algumas das mudanças que ocorrem no processo de metamorfose em anfíbios (Inoue et al., 2004). É composto de

hepatócitos entre os quais há células epiteliais dos ductos biliares, células de Kupffer (macrófagos), células sanguíneas e endoteliais (Takashima e Hibiya, 1995), e sinusóides (Rajeshkumar et al., 2013).

Por ser o principal local de desintoxicação do organismo (Carvalho et al., 2017), o fígado pode desenvolver alterações morfológicas nos hepatócitos caso o animal venha a sofrer exposição a xenobióticos (Hinton e Laurén, 1990; Takashima e Hibiya, 1995; Thophon et al., 2003), sendo por isso considerado um ótimo biomarcador, onde essas alterações podem ser relacionadas à poluição aquática (Rajeshkumar et al., 2013). Em animais ectotérmicos, o processo de biotransformação e detoxificação de xenobióticos envolvem hepatócitos e melanomacrófagos (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018), que é uma célula fagocítica capaz de produzir e armazenar melanina (Agius e Roberts, 2003; Ribeiro et al., 2011), sendo importante pela sua capacidade de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes tóxicos (Zuasti et al., 1989; Franco-Belussi et al., 2016). Dessa forma, eles estão envolvidos em processos de detoxificação, devido a uma combinação de biotransformação enzimática e ação antioxidante da melanina (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018). Os melanomacrófagos podem ser encontrados em outros órgãos hematopoiéticos de anfíbios, como fígado, baço e rins, assim como em outros vertebrados, como peixes e répteis (Fishelson, 2006). Sua quantidade, tamanho e distribuição variam nas diferentes espécies, fase de vida do animal e da presença de fatores de estresse, sendo frequentemente utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental (Passantino et al., 2014; Santos et al., 2014).

O aumento da incidência de melanomacrófagos também foi descrito em outros estudos com anfíbios expostos a poluentes, como ambientes naturais poluídos (Fenoglio et al., 2005), cromo (Boncompagni et al., 2004) e herbicidas (Çakıcı, 2015; Bach et al., 2018). O aumento no número de melanomacrófagos pode ser atribuído aos possíveis papéis dessas células nos processos de biotransformação e na proteção contra espécies reativas de oxigênio (Agius e Roberts, 2003; Fenoglio et al., 2005; Ribeiro et al., 2011). Não houve quantificação dessas estruturas no presente estudo, no entanto, foram acompanhadas por lesões histopatológicas crescentes, o que pode indicar defesa antioxidante estimulada no fígado.

Ambos os compostos nitrogenados aumentaram a vacuolização dos hepatócitos, bem como o tamanho dos sinusóides, além de causarem hipertrofia das células. A

vacuolização no tecido hepático pode indicar dano citotóxico (Vethaak e Wester 1996) e o aumento dos sinusóides indica dano na microvascularização do fígado (Franco-Belussi et al., 2021). Uma outra alteração observada foi a congestão sinusoidal, que bloqueia o sangue da artéria hepática e da veia porta interbiliar, impedindo o fluxo normal de sangue em sentido a veia central (Kostić et al., 2017). Essa incapacidade do sangue de chegar à veia central força um aumento na pressão nos vasos hepáticos, o que pode causar estresse ao órgão (Olojo et al., 2005). A hipertrofia celular indica o aumento da atividade da célula na presença ou ausência de alguma substância (Hinton et al., 1992; Takashima e Hibiya, 1995), podendo resultar em necrose (Takashima e Hibiya, 1995; Fanta et al., 2003).

Vários xenobióticos podem afetar os hepatócitos por estes desempenharem importante função na desintoxicação (Çakici, 2015). O fígado também é um órgão alvo de contaminantes, por possuir grande suprimento sanguíneo e intensa atividade metabólica (Hinton et al., 2001), sendo a amônia um possível contaminante, que pode ser transportada pela veia porta hepática para o órgão (Kucuk, 1999). A exposição à amônia acima de valores limites para espécie causa vacuolização do glicogênio hepático devido à interrupção da produção de energia (Thurston et al., 1978). Lesões como tumefação turva e degeneração hidrópica foram encontradas em juvenis de *O. niloticus* (65 g), em teste de toxicidade crônica com duração de seis semanas, empregando concentração de 0,14 mg.L⁻¹ N-NH₃ (Benli et al., 2008). Já com relação ao nitrito, Lin et al. (2018) estudando o efeito da exposição da carpa cabeça grande (*Aristichthys nobilis*) a concentração de 48,6 mg.L⁻¹ de NO₂⁻ detectaram que após 48 h de exposição, as células hepáticas apresentaram hipertrofia nuclear e dilatação dos sinusóides, e após 96 h de exposição, a hipertrofia nuclear e a dilatação dos sinusóides tornaram-se mais avançadas. Alterações similares ao presente estudo, com concentrações testadas bem menores.

Estudos com anfíbios mostram resultados similares aos encontrados no presente trabalho. Çakici (2015) estudando sapos-verde (*Bufo variabilis*) expostos ao inseticida carbaril encontraram congestão, alargamento dos sinusóides e vacuolização dos hepatócitos. Já Bernabò et al. (2017) estudando perereca italiana (*Hyla intermedia*) expostas ao fungicida pirimetanil observaram congestão sinusoidal e dilatação, infiltração e células necróticas e Franco-Belussi et al. (2021) estudando a exposição de

girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) ao tensoativo aniônico alquilbenzeno linear sulfonato (LAS) notaram que o composto induzia alterações histopatológicas como alargamento de sinusóides e vacuolização de hepatócitos. Já Grott et al. (2021) estudando histologia do fígado de girinos de rãs-touro expostos ao herbicida Tebuthiuron, demonstraram alterações no tecido hepático como a presença de infiltrado inflamatório, picnose nuclear, congestão e vacuolização de hepatócitos.

As alterações encontradas no presente estudo também são consistentes com as relatadas em fígado de anfíbios expostos a metais. Medina et al. (2016) demonstraram que sapo-da-areia (*Rhinella arenarum*) exposto ao cádmio apresentaram alterações no fígado, como aumento de células inflamatórias, dilatação sinusoidal, hiperplasia das células de Kupffer, alterações semelhantes às observadas em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) expostos a água de um rio com objetivo de biomonitoramento ambiental (Boiarski et al., 2020). Monteiro et al. (2018) expondo girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) ao cromo hexavalente, demonstraram alterações histopatológicas no parênquima hepático, áreas de sinusóides congestionados e infiltrado inflamatório, hepatócitos com núcleos picnóticos, hipertrofia, perda da integridade celular e áreas de necrose tecidual.

No presente estudo, o fígado apresentou congestão multifocal dos sinusóides, caracterizada pela presença de células sanguíneas nos sinusóides (Hibiya, 1982), hepatócitos em desarranjo cordonal, e deslocamento de núcleo dos hepatócitos. Diferenças no formato e tamanho dos hepatócitos, assim como no núcleo, estão associadas a patologias e à atividade metabólica do fígado (Rašković et al., 2011). Segundo Gayão et al. (2013), com o aumento de volume dos hepatócitos ocorre a descentralização do núcleo e a vacuolização no citoplasma, alterações observadas no presente estudo, o que é indicativo de atividade metabólica alterada.

Essa vacuolização sugere a existência de regiões com concentrações de lipídeos e glicogênio, ou a combinação de agentes tóxicos com lipídeos citoplasmáticos (Santos et al., 2004). O acúmulo de lipídeos no hepatócito, denominado esteatose hepática (Hibiya, 1982), pode ser consequência de distúrbios metabólicos ou uma alteração parcial na sua morfologia (Kendall, 1977), causados por exposição a produtos tóxicos, e normalmente antecedendo a necrose (Robbins e Cotran, 2005). A presença atípica de

lipídeos e glicogênio no citoplasma prejudica as atividades metabólicas (Santos et al., 2004; Gayão et al., 2013).

As análises realizadas no tecido hepático demonstraram que tanto NH_3 , quanto NO_2^- afetam a morfologia e a concentração de metabólitos neste órgão, interferindo nas suas funções vitais, e demonstrando sua ação hepatotóxica. Durante o processo de desintoxicação, as células que estão sendo atacadas são danificadas, causando lesões e desorganização celular e tecidual (Marcantonio et al., 2022). O comprometimento do fígado pode interferir na desintoxicação dos compostos nitrogenados (Santos-Silva et al., 2018), o que pode justificar a mortalidade nas concentrações mais elevadas de amônia e de nitrito. As alterações morfológicas do fígado são mecanismos defensivos e/ou de alterações adaptativas frente à contaminação (Au, 2004), o que qualifica o uso do órgão como bioindicador para exposição aos compostos nitrogenados, amônia e nitrito, no ambiente de cultivo. No entanto, tais alterações podem prejudicar até mesmo o processo de metamorfose dos animais, devido à perda de parte de sua função metabólica normal, que utiliza nutrientes para produzir enzimas, proteínas e outros elementos necessários para realizar o processo (Marcantonio et al., 2022).

Já o rim das rãs é dividido em uma zona ventral, composta por circunvoluções distais; uma zona média, composta por glomérulos e porções de conexão dos túbulos, e uma zona dorsal, composta por circunvoluções proximais e ductos coletores (Viriato et al., 2021). Em girinos de rã-touro, os rins se estendem desde a região da cloaca até quase o coração (Marcantonio et al., 2022), contendo numerosos corpúsculos renais, e sua cápsula de Bowman consiste em uma simples camada de células escamosas (Manso et al., 2009), sendo o espaço intertubular ocupado pelo tecido hematopoiético (Tsuneki et al., 1984).

Nos anfíbios, o rim e o fígado desempenham várias funções fisiológicas, como metabolismo energético e proteico, síntese de ureia, secreção de sais biliares, biotransformação e desintoxicação em resposta a agentes tóxicos (Marcantonio et al., 2022). Essa desintoxicação pode se manifestar como sinais de um distúrbio orgânico, como exposições a xenobióticos, por meio de alterações em sua estrutura celular, bioquímica e morfológica (Crawshaw e Weinkle, 2000). Como os rins dos anfíbios desempenham funções relacionadas a excreção de substâncias (Carvalho et al., 2017; Marcantonio et al., 2022) e metabolismo, lesões nesses órgãos causadas por

xenobióticos podem ter consequências negativas na desintoxicação e homeostase do animal (Medina et al., 2016; Viriato et al., 2021), assim como relatado para o fígado (Monteiro et al., 2018). Por receber grande fluxo sanguíneo, o rim pode ser considerado, tal como as brânquias, órgão alvo de agentes estressores, sendo também uma das principais rotas de excreção de metabólitos aos quais o animal tenha sido eventualmente exposto à algum xenobiótico (Hinton et al., 1992).

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados utilizando a mesma espécie de anfíbio, *A. catesbeiana*, por Monteiro et al. (2018) ao exporem girinos ao cromo e por Marcantonio et al. (2022) ao exporem girinos a fungicidas picoxistrobina e ciproconazol, observando lesões como áreas de necrose tecidual nos rins e hipertrofia dos túbulos renais; por Medina et al. (2016) expondo girinos ao cádmio, observando alterações como glomérulos hipertrofiados, degeneração e necrose tubular; e Carneiro et al. (2023) expondo girinos ao herbicida hidroxiatrazina observando lesões como encolhimento glomerular, hemorragia, aumento da distância de Bowman, infiltração e vacúolos no citoplasma. Esses dados corroboram que os compostos nitrogenados podem ser nefrotóxicos para *A. catesbeiana* assim como as substâncias citadas.

Em síntese, ambos os compostos nitrogenados causaram danos histopatológicos nos tecidos branquiais, hepáticos e renais em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 35 de Gosner (1960), e dos tecidos branquiais e hepáticos de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960), em um curto período de exposição, interferindo diretamente em órgãos fundamentais para a manutenção de sua homeostase. Portanto, pode-se concluir que a exposição aos compostos amônia e nitrito pode representar um risco importante para esta espécie. Devido a isso, recomendam-se medidas de precaução para exposição dos organismos a estes agentes químicos.

5. CONCLUSÃO

Os girinos de rã-touro *A. catesbeiana* mostraram-se susceptíveis à exposição aguda à amônia e ao nitrito. Exposições agudas a concentrações de NH_3 e NO_2^- , iguais ou superiores a $1,33 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, resultaram em mortalidades e alterações histopatológicas nas brânquias, fígados e rins para girinos no estágio 35 de

Gosner (1960). Já para girinos no estágio 25 de Gosner (1960), as concentrações de NH_3 e NO_2^- , iguais ou superiores a $0,98 \text{ mg.L}^{-1}$ e 4 mg.L^{-1} , respectivamente, também resultaram em mortalidades e alterações histopatológicas nas brânquias e fígados analisados. O estudo histopatológico mostrou os principais efeitos causados nas brânquias, fígado e rins, corroborando o que é colocado pela literatura no que diz respeito aos cuidados que devem ser tomados com poluentes nitrogenados no ambiente aquático.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.M. Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems. *Biomarkers*, v.6, n.1, p.33-44, 2001. <https://doi.org/10.1080/135475001452779>.
- AGIUS, C., ROBERTS, R. J.. Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Pathology. *J. Fish Biol.*, v.26, p.499-509, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- APHA - Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th. Washington, DC: APHA, 1992.
- ARANA, L.V. Princípios químicos da qualidade de água em aquicultura. Editora UFSC. 1997. 161p.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Mar. Pollut. Bull.*, v.48, p.817-834, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.032>
- BACH, N.C.; MARINO, D.J.; NATALE, G.S.; SOMOZA, G.M. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, v.202, p.289-297, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.110>
- BENLÍ, A.Ç.K.; KÖKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v.29, n.2, p.339-344, 2005.
- BERNABÒ, I., GUARDIA, A., MACIRELLA, R., TRIPEPI, S., BRUNELLI, E. Chronic exposures to fungicide pyrimethanil: multi-organ effects on Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Sci. Rep.*, v.7, 6869, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07367-6>
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25-34, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- BOIARSKI, D.R.; TOIGO, C.M.; SOBJAK, T.M.; SANTOS, A.F.P.; ROMÃO, S.; GUIMARÃES, A.T.B. Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in *Aquarana catesbeiana* tadpoles exposed to water from an urban stream. *Ecotoxicology*, v.29, p.314-326, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02176-6>
- BONCOMPAGNI, E.; FENOGLIO, C.; VACCARONE, R.; CHIARI, P.; MILANESI, G.; FASOLA, M.; BARNI, S. Toxicity of chromium and heptachlor epoxide on liver of *Rana kl. esculenta*: A morphological and histochemical study. *Ital. J. Zool.*, v.71, p.163-167, 2004. <https://doi.org/10.1080/11250000409356628>
- BRASILEIRO-FILHO, G. BOGLIOLO: Patologia Geral. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BURGGREN, W.; MWALUKOMA, A. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). I. Morphological responses of lungs, skin and gills. *J Exp Biol.*, v.105, p.191-203, 1983. <https://doi.org/10.1242/jeb.105.1.191>.
- ÇAKICI, Ö. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura:Bufonidae). *Exp. Toxicol. Pathol.*, v.67, p.237-243, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.12.003>
- CAMARGO, J.A.; ALONSO, A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.*, v.32, p.831-849. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- CAMARGO, J.A.; WARD, J.V. Short-term toxicity of sodium nitrate (NaNO₃) to non-target freshwater invertebrates. *Chemosphere*, v.24, p.23-28, 1992. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(92\)90563-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(92)90563-7)
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, v.5, n.3, p.327-336, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252007000300013>

- CARDOSO, E.L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R.M.A.; POLI, C.R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. J. Fish Biol., v.49, p.778-787, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb00078.x>
- CARNEIRO, F.E.; GROTT, S.C.; ISRAEL, N.G.; BITSCHINSKI, D.; ABEL, G.; ALVES, T.C.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; SILVA, E.B.; ALMEIDA, E.B. Influence of temperature on the biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) to 2-hydroxyatrazine exposure. Aquat. Toxicol., v.257, p.106468, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106468>
- CARVALHO, C.S.; UTSUNOMIYA, H.S.M.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; COSTA, M.J.; FERNANDES, M.N. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, following exposure to different metals. Environ. Pollut., v.221, p.445-452, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>
- COPATTI, C.E.; ROSSO, F.L.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. Tolerance of piava juveniles to different ammonia concentrations. Semin. Cienc. Agrar., v.36, n.6, p.3991-4002, 2015. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6p3991>
- CRAWSHAW, G.J.; WEINKLE, T.K. Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. J. Exot. Pet Med., v.9, n.3, p.165-173, 2000. <https://doi.org/10.1053/ax.2000.7133>
- DAS, P.C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J.K.; DAS, B.K. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (HamiltonHamilton). Aquacult. Res., v.35, p.134-143, 2004a.
- DAS, P.C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J.K.; DAS, B.K. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham): acute toxicity and sub-lethal effect in selected haematological parameters. Aquaculture, v.235, p.633-644, 2004b.
- DÍAZ, V.; IBANEZ, R.; GOMEZ, P.; URTIAGA, A.M.; ORTIZ, I. Kinetics of electrooxidation of ammonia-N, nitrites and COD from a recirculating aquaculture saline water system using BDD anodes. Water Res., v.45, p.125-134, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.020>
- 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. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.64, p.418-425, 2000. <https://doi.org/10.1007/s001280000017>
- FARQUHARSON, C.; WEPENER, V.; SMIT, N.J. Acute and chronic effects of acidic pH on four subtropical frog species. Water SA, v.42, n.1, p.52-62, 2016. <https://doi.org/10.4314/wsa.v42i1.07>
- FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA, M.; GANDINI, C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G.; BARNI, S. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. Ecotoxicol. Environ. Saf., v.60, p.259-268, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.006>
- FISHELSON, L. 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, headkidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. J. Morphol., v.267, n.1, p.57-69. <https://doi.org/10.1002/jmor.10385>
- FRANCES, J.; ALLAN, G.L.; Nowak, B.F. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture, v.163, p.63-72, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00219-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00219-1)
- FRANCO-BELUSSI, L.; CASTRUCCI, A.M.L.; OLIVEIRA, C. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle^4 , $D-Phe^7$ - α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. Zoology, v.116, n.5, p.316-324, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2013.06.003>
- FRANCO-BELUSSI, L.; SKOLD, H.N.; DE OLIVEIRA, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. J. Exp. Biol., v.219, n.9, p.1378-1383, 2016. <https://doi.org/10.1242/jeb.134973>
- FRANCO-BELUSSI, L.; JONES-COSTA, M.; SALLA, R.F.; SOUZA, B.F.S.; PINTO-VIDAL, F.A.; OLIVEIRA, C.R.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; ABDALLA, F.C.; DUARTE,

- I.C.S.; OLIVEIRA, C. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, v.266, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129014>.
- GAYÃO, A.L.B.A.; BUZOLLO, H.; FÁVERO, G.C.; SILVA-JUNIOR, A.A.; PORTELLA, M.C.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.48, n.8, p.991-997, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800026>
- GROTT, S.C.; BITSCHINSKI, D.; ISRAEL, N.G.; ABEL, G.; SILVA, S.P.; ALVES, T.C.; LIMA, D.; BAINY, A.C.D.; MATTOS, J.J.; SILVA, E.B.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; ALMEIDA, E.A. Influence of temperature on biomarker responses and histology of the liver of American bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*, Shaw, 1802) exposed to the herbicide Tebuthiuron. *Sci. Total Environ.*, v.771, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144971>
- GUILLETTE, L.J.; EDWARDS, T.M. Is Nitrate an Ecologically Relevant Endocrine Disruptor in Vertebrates? *Integr. Comp. Biol.*, v.45, p.19-27. 2005. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.19>
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.12, p.714-719, 1977. <https://doi.org/10.1021/ES60130A004>
- HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; GALDIOLI, E.M.; FURUYA, V.R.B.; BOSCOLO, W.R. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em Tanques-rede. *R. Bras. Zootec.*, v.33, n.1, p.14-20, 2004.
- HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. CRC Press, Inc., Florida, 1987.
- HECNAR, S.J. Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.14, p.2131-2137. 1995. <https://doi.org/10.1002/etc.5620141217>
- HEGAZI, M.M.; ATTAI, Z.I.; HEGAZI, M.A.M.; HASANEIN, S.S. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain. *Aquaculture*, v.299, p.149-156, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.020>
- HIBIYA, T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. New York: Kodansha Tokio, 1982.
- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers 26 biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p.155-196, 1992.
- HINTON, D.E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. p.224-268, 2001.
- HUERTAS, M.; GISBERT, E.; RODRÍGUEZ, A.; CARDONA, P.L. Acute exposure of *Siberian sturgeon* (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC₅₀) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquat. Toxicol.*, v.57, p.257-266, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00207-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00207-7)
- HUEY, D.W.; BEITINGER, T.L. Toxicity of nitrite to larvae of the salamander *Ambystoma texanum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.25, p.909-912, 1980a. <https://doi.org/10.1007/BF01985629>
- HUEY, D.W.; BEITINGER, T.L. Hematological responses of larval *Rana catesbeiana* to sublethal nitrite exposures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.25, p.574-577, 1980b. <https://doi.org/10.1007/BF01985574>

- INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; HIRAMOTO, K.; KASHIWAGI, A.; UTSUMI, K. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. *Redox Rep.*, v.9, n.5, p.237-247, 2004. <https://doi.org/10.1179/135100004225006010>
- KENDALL, M.W. Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.18, p.143-15, 1977. <https://doi.org/10.1007/BF01686060>
- KOCA, Y.B.; KOCA, S.; YILDIZ, S.; GÜRCÜ, B.; OSANÇ, E.; TUNÇBAŞ, O. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution. *Environ. Toxicol.*, v.20, p.560-571, 2005. <https://doi.org/10.1002/tox.20145>
- KOSTIĆ, J.; KOLAREVIĆ, S.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; ABORGIBA, M.; GAČIĆ, Z.; PAUNOVIĆ, M.; VIŠNJIĆ-JEFTIĆ, Ž.; RAŠKOVIĆ, B.; POLEKSIĆ, V.; LENHARDT, M.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. *Sci. Total Environ.*, v. 601–602, p. 1670–1681, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.273>
- KROUPOVA, H.; MACHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med.*, v.11, p.461-471. 2005. <https://doi.org/10.17221/5650-VETMED>
- KUCUK, S. The effect of diel un-ionised ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish and tilapia. Master thesis. Mississippi State University, Mississippi, USA., 1999.
- LEMARIÉ, G.; DOSDAT, A.; COVÈS, D.; DUTTO, G.; GASSET, E.; PERSON-LE RUYET, J. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, v.229, p.479-491, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00392-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00392-2)
- LIN, Y.; MIAO, L.H.; PAN, W.J.; HUANG, X.; DENG, J.M.; ZHANG, W.X.; GE, X.P.; LIU, B.; REN, M.C.; ZHOU, Q.L.; XIE, J.; PAN, L.K.; XI, B.W. Effect of nitrite exposure on the antioxidant enzymes and glutathione system in the liver of bighead carp, *Aristichthys nobilis*. *Fish & Shellfish Immunol.*, v.76, p.126-132. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.015>
- LUNA, L.G. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York, Mc-Graw Hill, 1968.
- LUO, S., WU, B., XIONG, X., WANG, J. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.35, n.6, p.1422-1427. 2016. <https://doi.org/10.1002/etc.3283>
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *J. Fisheries Aquatic Sci.*, v.42, p.630-648, 1985. <https://doi.org/10.1139/f85-083>
- MALVIN, G.M. Gill structure and function: amphibian larvae. In: Wood SC (ed) *Comparative pulmonary physiology: current concepts*. Dekker, New York, pp 121–151, 1989.
- MARCAIDA, G.; FELIPO, V.; HERMENEGILDO, C.; MINANA, M.D.; GRISOLIA, S. Acute ammonia toxicity is mediated by NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.*, 296 (1992), pp. 67-68.
- MARCANTONIO, A.S.; FRANÇA, F.M.; SANTOS, D.S.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; HIPÓLITO, M.; SCHALCH, S.H.C.; VIRIATO, C.; FERREIRA, C.M. Histopathological changes in *Aquarana catesbeiana* tadpoles used as biomarkers of pesticide poisoning. *Bol. Inst. Pesca*, v.48, p.1-8, 2022. <https://doi.org/10.20950/1678-2305/bip.2022.48.e711>
- MARCO, A.; BLAUSTEIN, A.R. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in cascade frogs (*Rana cascadae*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, p.946-949. 1999.
- MARCO, A.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. Pollution: Impact of reactive nitrogen on amphibians. Pp. 3145–3185. In H Heatwole and J. W Wilkinson (Eds.), *Amphibian Biology*, Volume 8, *Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. Surrey Beatty & Sons, Baulkham Hills, New South Wales, Australia, 2009.

- MARCO, A.; QUILCHANO, C; BLAUSTEIN, A.R. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, p.2836-2839, 1999. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181225>
- MANSO, P.P.A.; BRITO-GITIRANA, L.; PELAJO-MACHADO, M. Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Aquarana catesbeiana*). *Cell Tissue Res.*, v.337, p.301-312, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0803-0>
- MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. (Org.). *Tópicos Especiais 68 em Biologia Aquática e Aquicultura*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática - Aquabio, p.81-95, 2006.
- MEDINA, M.F.; GONZÁLEZ, M.E.; KLYVER, S.M.R.; AYBAR ODSTRCIL, I.M. Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cadmium. *Turk. J. Biol.*, v.40, n.1, p. 229-238, 2016. <https://doi.org/10.3906/biy-1505-72>
- MINNICH, B.; BARTEL, H.; LAMETSCHWANDTNER, A. How a highly complex three-dimensional network of blood vessels regresses: the gill blood vascular system of tadpoles of *Xenopus* during metamorphosis. A SEM study on microvascular corrosion casts. *Microvasc. Res.*, v.64, p.425-437, 2002.
- MIRON, D.S.; MORAES, B.S; BECKER, A.G.; CRESTANI, M. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*, v.277, p.192-196, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.023>
- MONTEIRO, J.A.N.; CUNHA, L.A.; COSTA, M.H.P.; REIS, H.S.; AGUIAR, A.C.S.; OLIVEIRA-BAHIA, V.R.L.; BURBANO, R.M.R.; ROCHA, C.A.M. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium in tadpoles of *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.163, p.400-407, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.083>
- MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MACCONNELL, B.; BLAZER, V. (2007) *Fish Histology and Histopathology*. 4th Edition, US Fish & Wildlife Service, West Virginia.
- MUÑOZ, L.M.H. E BAUTISTA, M.H.B. Tolerancia al pH en embriones y renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, v.35, n.134, p.105-110, 2011.
- NOWAK, B.F.; DEAVIN, F.G.; SARJITO-MUNDAY, B.L. Scanning electron microscopy in aquatic toxicology. *J. Comput. Assist. Microsc.*, v.4, p.241-246, 1992.
- OLOJO, E.A.A.; OLURIN, K.B.; MBAKA, G.; OLUWEMIMO, A.D. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. *Afr. J. Biotechnol.*, v.4, n.1, p.117-122, 2005.
- ORTIZ-SANTALIESTRA, M.E.; FERNÁNDEZ-BENÉITEZ, M.J.; MARCO, A.; LIZANA, M. Influence of ammonium nitrate on larval anti-predator responses of two amphibian species. *Aquat. Toxicol.*, v.99, p.198-204, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.020>
- PARK, I.; LEE, J.; HUR, J.; SONG, Y.; NA, H.C.; NOH, C.H. Acute toxicity and sublethal effects of nitrite on selected hematological parameters and tissues in dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*. *J. World Aquac. Soc.*, v.38, n.2, p.188-199, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00088.x>
- PASSANTINO, L.; SANTAMARIA, N.; ZUPA, R.; POUSIS, C.; GAROFALO, R.; CIANCIOTTA, A.; JIRILLO, E.; ACONE, F.; CORRIERO, A. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *J. Fish Dis.*, v.37, p.241-250, 2014. <https://doi.org/10.1111/jfd.12102>
- PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. *Uma revisão*. *B. Inst. Pesca*, v.31, n.1, p.81-88, 2005.

- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishes. *Annual Rev. Physiol.*, v.59, p.325-347, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.325>
- PIERCE, B.A. Acid tolerance in amphibians. *BioScience*, v.35, n.4, p.239-243, 1985. <https://doi.org/10.2307/1310132>
- QUEIROZ, J.F.; BOEIRA, R. C. Boas práticas de manejo (BPMs) para reduzir o acúmulo de amônia nos viveiros de aquicultura. Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 2007.
- RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.*, v.45, p.17-23, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
- RAJESHKUMAR, S.; SUKUMAR, S.; MUNUSWAMY, N. Biomarkers of selected heavy metal toxicity and histology of *Chanos chanos* from Kaattuppalli Island, Chennai, southeast coast of India. *Environ. Earth Sci.*, v.72, n.1, p.207-219, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2975-x>
- RAŠKOVIĆ, B.S.; STANKOVIĆ, M.B.; MARKOVIĆ, Z.Z.; POLEKSIĆ, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J. Agricult. Sci.*, v.56, n.1, p.87-100, 2011. <https://doi.org/10.2298/JAS1101087R>
- RIBEIRO, H.J.; PROCÓPIO, M.S.; GOMES, J.M.M.; VIEIRA, F.O.; RUSSO, R.C.; BALZUWEIT, K.; CHIARINI-GARCIA, H.; CASTRO, A.C.S.; RIZZO, E.; CORRÊA JR, J.D. Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell Tissue Res.*, v.346, n.3, p.417-425, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1286-3>
- ROBBINS, S.; COTRAN, R.S. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7.ed. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Eds). Elsevier/Medicina Nacionais, 2005.
- ROSA, J.; LEMOS, M.F.L.; CRESPO, D.; NUNES, M.; FREITAS, A.; RAMOS, F.; LESTON, S. Integrated multitrophic aquaculture systems - potencial risks for food safety. *Trends Food Sci. Technol.*, v.96, p.79-90, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.008>
- ROUMIEH, R.; BARAKAT, A.; ABDELMEGUID, N.E.; GHANAWI, J.; SAOUD, I.P. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). *Aquac. Res.*, v.44, p.1777-1790, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03188.x>
- SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; BORGES, R.E.; OLIVEIRA, C. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat. Rec.*, v.297, n.5, p.864-875, 2014. <https://doi.org/10.1002/ar.22884>
- SANTOS-SILVA, M.J.; COSTA, F.F.B.; LEME, F.P.; TAKATA, R.; COSTA, D.C.; MATTIOLI, C.C.; LUZ, R.K.; MIRANDA-FILHO, K.C. Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *Sci. Total Environ.*, v.616-617, p.1566-1575, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.157>
- SANTOS, D.S.; FRANÇA, F.M; MARCANTONIO, A.S.; VIRIATO, C.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; BADARÓ-PEDROSO, C.; FERREIRA, C.M. Histopathological changes in the gills of zebrafish (*Danio rerio*) and bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) caused by the use of formaldehyde. *Braz. J. Anim. Environ. Res.*, v.4, n.3, p.3832-3847, 2021. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n3-090>
- SHINN, C.; MARCO, A.; SERRANO, L. Influence of low levels of water salinity on toxicity of nitrite to anuran larvae. *Chemosphere*, v.92, p.1154-1160, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.079>
- SCHIMDT, W.; G WOLF, K GRUNGREIFF, K LINKE. Adenosine influences the high-affinity-uptake of transmitter glutamate and aspartate under conditions of hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, v.8, n.2, p.73-80, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00996890>
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.*, v.5, n.6, p.245-266, 1971. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)

- SVOBODOVÁ, Z.; MÁCHOVÁ, J.; DRASTICHOVÁ, J.; GROCH, L.; LUSKOVÁ, V.; POLESZCZUK, G.; VELÍSEK, J.; KROUPOVÁ, H. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. *Aquacult. Res.*, v.36, p.1177-1184, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01334.x>
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 2.ed. Califórnia: Kodansha Limited, 1995. 195p
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, v.121, p.307-320, 2003.
- THURSTON, R.V.; RUSSO, R.C.; SMITH, C.E. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Trans. Am. Fish Soc.*, v.107, n.3, p. 361-368, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00270-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00270-1)
- TSUNEKI, K.; KOBAYASHI, H.; GALLARDO, R.; PANG, P.K.T. Estudo microscópico eletrônico da inervação dos túbulos renais e epitélio da bexiga urinária em *Rana catesbeiana* e *Necturus maculosus*. *J. Morphol.*, v.181, n.2, p.143-153, 1984. <http://doi.org/10.1002/jmor.1051810203>
- VETHAAK, A.D.; WESTER, P.W. Diseases of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver Histopathology. *Dis. Aquat. Org.*, v.26, p.99-116, 1996. <http://doi.org/10.3354/dao026099>
- VIERTTEL, B. The oral cavities of central european anuran larvae (amphibia). *Morphology, ontogenesis and generic diagnosis. Amphib-Reptil.*, v.4, p. 327-360, 1982.
- VIRIATO, C.; FRANÇA, F.M.; SANTOS, D.S.; MARCANTONIO, A.S.; BADARÓ-PEDROSO, C.; FERREIRA, C.M. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Aquarana catesbeiana*). *Chemosphere*, v.266, 2021. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>.
- WILLIAMS, E.M.; EDDY, F.B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol.*, v.156, p.867-872, 1986. <https://doi.org/10.1007/BF00694263>
- WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Histological and physiological biomarkers to assess fish health in Londrina streams, state of Paraná. *Acta Sci.*, v.23, n.2, p.507-514, 2001.
- WUERTZ, S.; SCHULZE, S.G.E.; EBERHARDT, U.; SCHULZ, C.; SCHROEDER, J.P. Acute and chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its compensation by chloride. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v.157, n.4, p.352-360, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.01.002>
- ZHANG, B.L.; XIONG, D.M.; LI, B.; ZHAO, Z.G.; FRANG, W.; YANG, K.; FRAN, Q-X. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *J. Appl. Ichthyol.*, v.28, p.82-86, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01720.x>

ARTIGO 2- Efeito tóxico da amônia e do nitrito em juvenis de *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Atyidae)

RESUMO

Os sistemas de produção estão se intensificando, levantando preocupações sobre a qualidade da água utilizada na produção. O *Neocaridina davidi* está entre as espécies de camarão de água doce com características favoráveis para produção comercial e ornamentação. Em vários países, o referido crustáceo vem sendo utilizado na aquarioria. Compostos nitrogenados, como amônia e nitrito, afetam a saúde dos organismos aquáticos, pois atingem rapidamente concentrações tóxicas no sistema, podendo causar danos à estrutura branquial, comprometendo o processo de respiração, excreção e osmorregulação, e podendo ocasionar a morte dos animais. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos agudos gerados pela amônia e nitrito expondo juvenis de *N. davidi*. Juvenis foram utilizados em um delineamento inteiramente casualizado com cinco concentrações de amônia total (0, 10, 18, 26, 34 e 42 mg.L⁻¹), com as respectivas concentrações de amônia não ionizada (0,02; 0,33; 0,58; 0,82; 1,11 e 1,29 mg.L⁻¹) e cinco concentrações de nitrito (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 1,25 mg.L⁻¹) com duas repetições para cada tratamento. A concentração letal mediana CL₅₀-96 h foi estimada em 19,98, 0,48 e 0,69 mg.L⁻¹ para N-AT, NH₃ e NO₂⁻, respectivamente. Os níveis de segurança indicados para a espécie foram calculados em 1,9, 0,048 e 0,069 mg.L⁻¹ para N-AT, NH₃ e NO₂⁻, respectivamente. A análise histológica das brânquias confirmou que quanto maior as concentrações totais de amônia e nitrito, maiores os danos causados à estrutura branquial. As concentrações de nitrito testadas causaram danos semelhantes às maiores concentrações de amônia total, reforçando os cuidados que a espécie exige em termos de qualidade da água em função da elevada toxicidade dos compostos nitrogenados estudados.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; concentração letal mediana; CL₅₀; compostos nitrogenados; “red cherry”.

ABSTRACT

Production systems are intensifying, raising concerns about the quality of water used in production. *Neocaridina davidi* is among freshwater shrimp species with favorable characteristics for commercial production and ornamentation. In several countries, the aforementioned crustacean has been used in aquariums. Nitrogenous compounds, such as ammonia and nitrite, affect the health of aquatic organisms, as they quickly reach toxic concentrations in the system, and can cause damage to the gill structure, compromising the process of breathing, excretion and osmoregulation, and possibly causing the death of the animals. The aim of this study was to evaluate the acute toxic effects generated by ammonia and nitrite exposing juveniles of *N. davidi*. Juveniles were used in a completely randomized design with five concentrations of total ammonia (0, 10, 18, 26, 34 and 42 mg.L⁻¹), with the respective concentrations of non-ionized ammonia (0.02; 0.33; 0.58; 0.82; 1.11 and 1.29 mg.L⁻¹) and five concentrations of nitrite (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1 and 1.25 mg.L⁻¹) with two replications for each treatment. Median lethal concentration CL_{50-96 h} was estimated to be 19.98, 0.48 and 0.69 mg.L⁻¹ for N-AT, NH₃ and NO₂⁻, respectively. The safety levels indicated for the species were calculated at 1.9, 0.048 and 0.069 mg.L⁻¹ for N-AT, NH₃ and NO₂⁻, respectively. Histological analysis of the gills confirmed that the higher the total concentrations of ammonia and nitrite, the greater the damage caused to the gill structure. The nitrite concentrations tested caused damage similar to the highest concentrations of total ammonia, reinforcing the care that the species requires in terms of water quality due to the high toxicity of the studied nitrogenous compounds.

Keywords: Ecotoxicology; median lethal concentration; LC50; nitrogenous compounds; “red cherry”.

1. INTRODUÇÃO

Os parâmetros de qualidade de água são itens essenciais para o sucesso de uma produção aquícola, sendo necessário uma boa gestão para alcançar bons níveis de produtividade. Dos parâmetros físico-químicos de qualidade da água, os compostos nitrogenados destacam-se pelo potencial tóxico sobre o bem estar dos organismos aquáticos, por isso a necessidade de conhecer limites dessas substâncias para nortear o sucesso da atividade.

Entre os compostos nitrogenados, a amônia e o nitrito são os que mais afetam a saúde dos organismos aquáticos, pois mesmo em concentrações baixas são considerados extremamente tóxicos (Romano e Zeng, 2013). Além disso, os sistemas de cultivo atualmente são norteados por uma gestão de cultivo intensivo, de maiores densidades de estocagem, maior fornecimento de ração e menor renovação de água (Ballester et al., 2017), o que pode propiciar, se o sistema for gerido de forma inadequada, o acúmulo de compostos nitrogenados, afetando de forma subletal e até mesmo letal os animais cultivados. Como exemplo da tolerância dos crustáceos aos compostos nitrogenados, Wang et al. (2004) estudando o *Macrobrachium nipponense* estimaram CL_{50-96h} de $13,3 \text{ mg.L}^{-1}$ para nitrito. Brazão et al. (2021) estudando o *Macrobrachium amazonicum* estimaram a concentração letal mediana $CL_{50-96 h}$ de 29,85 e $2,49 \text{ mg.L}^{-1}$, para amônia total e nitrito, respectivamente. Dutra et al. (2022), para a mesma espécie, estimaram $CL_{50 96h}$ de $27,98 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,87 \text{ mg.L}^{-1}$, para amônia total e nitrito, respectivamente. Estes estudos demonstram a baixa tolerância dos crustáceos aos compostos nitrogenados.

As brânquias de animais aquáticos estão em contato direto com o ambiente, sendo um órgão sujeito à ação deletéria dos compostos nitrogenados (Romano e Zeng, 2007; Henry et al., 2012). Esses compostos podem causar danos ao órgão, como observado em alguns crustáceos (Dutra et al., 2017; Ramírez-Rochín et al., 2017). Embora existam alguns estudos avaliando o efeito danoso causado pelos compostos nitrogenados em crustáceos, nenhum avaliou a tolerância e os efeitos causados desses compostos em camarões “red cherry” da espécie *Neocaridina davidi*. Esse camarão é uma espécie de água doce que habita riachos e lagos na Ásia (Cai, 1996), e tem sido

comumente comercializada como espécie ornamental em vários países. A espécie pode ser facilmente mantida em aquários, tolerando uma ampla variação de temperatura da água, e altas densidades de estocagem (Vazquez et al., 2017; Baliña et al., 2018), além da atratividade pela pigmentação avermelhada desses animais, e facilidade em completar o ciclo reprodutivo em cativeiro. Os fatores descritos tornam a espécie atrativa para a aquicultura.

Sistemas de recirculação de água podem ser utilizados para o cultivo desses camarões, no entanto, lacunas na produção da espécie precisam ser preenchidas, entre as quais estão os parâmetros de qualidade da água, como a tolerância a compostos nitrogenados. O conhecimento de tal tolerância é extremamente importante nesses tipos de sistemas caso ocorra um mau funcionamento/dimensionamento dos filtros do sistema, propiciando, portanto, o acúmulo dessas substâncias na água de cultivo.

Estudos toxicológicos aliados à histologia são ferramentas importantes utilizadas na aquicultura para aquisição de conhecimento sobre os limites toleráveis a compostos químicos e os danos causados aos organismos submetidos a eles. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a concentração letal mediana (CL_{50}) da amônia e do nitrito em juvenis de *N. davidi*, assim como seus respectivos níveis de segurança, descrever as principais alterações histológicas causadas nas brânquias, e avaliar possíveis efeitos deletérios aos animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Instalações e Condições Experimentais

O experimento foi desenvolvido no setor de maricultura do laboratório de Aquicultura – LAQUA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFMG. A metodologia utilizada na avaliação da concentração letal mediana (CL_{50} –96 h) foi baseada no manual da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 2002).

Os animais utilizados no experimento foram obtidos do setor de Ornamentais do LAQUA/UFMG. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (8:00 e 16:00h)

com ração comercial para invertebrados da marca Alcon® (36% proteína bruta, 3,5% extrato etéreo, 7,5% fibra bruta, 10% matéria mineral). Antes da realização do experimento, os camarões foram mantidos em aquários de 20 L em uma densidade aproximada de 7 camarões/L. Os aquários foram abastecidos com água de poço artesiano, mantidos à temperatura de $25 \pm 1,45$ °C, e fotoperíodo de 12 h de luz. Os camarões foram pesados em balança analítica (Bel Engineering) e foi mensurado o comprimento total (distância entre a margem distal do rostro até a extremidade distal do télson) usando paquímetro.

A definição das concentrações de amônia e nitrito a serem testadas se deu por meio de teste toxicológico agudo preliminar. Para o teste preliminar (96 h), três juvenis de *N. davidi* ($21,67 \pm 1,53$ mg, $1,8 \pm 0,10$ cm) foram utilizados para o teste com amônia e três juvenis de *N. davidi* ($21,33 \pm 1,15$ mg, $1,7 \pm 0,17$ cm) foram usados para o teste com nitrito. Os animais foram mantidos em béqueres de vidro (1 L), sendo testadas, para cada composto nitrogenado, cinco concentrações e um controle, sem réplica. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano, e os recipientes foram acondicionados em câmara de germinação tipo DBO (SL-224) com controle de temperatura, sob aeração contínua e fotoperíodo de 12 L (Fig. 1).

Para os testes de toxicidade definitivos realizados com amônia e nitrito, os juvenis de *N. davidi* ($22,27 \pm 1,38$ mg, $1,75 \pm 0,29$ cm) e ($21,53 \pm 1,76$ mg, $1,64 \pm 0,19$ cm), respectivamente, foram mantidos em jejum 24 h antes dos testes, e permaneceram em jejum durante as exposições agudas com o objetivo de se manter a integridade dos ambientes experimentais (Fig. 2). Os animais foram alocados em grupos de dez indivíduos com duas repetições por tratamento. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco concentrações de amônia total (N-AT) (10, 18, 26, 34 e 42 mg.L⁻¹) e um controle (0 mg.L⁻¹), respectivo a 0,33, 0,58, 0,82, 1,11 e 1,29 mg.L⁻¹ de NH₃ e um controle (0,02 mg.L⁻¹); e cinco concentrações de nitrito (N-NO₂⁻) (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25 mg.L⁻¹) e um controle (0 mg.L⁻¹). As concentrações de amônia e nitrito foram preparadas a partir de soluções estoque de amônia (10 g.L⁻¹ de N-NH₄⁺) e nitrito (20 g.L⁻¹ de N-NO₂⁻), utilizando cloreto de amônio P.A. (Synth®) e o nitrito de sódio P.A. (Synth®), respectivamente. Renovações totais dos meios experimentais foram feitas diariamente configurando um modelo de exposição semi-estático.

Para avaliação da mortalidade, os animais foram observados a cada hora durante as primeiras 12 h de experimentação e de 4 em 4 horas nas 84 horas seguintes. O critério para avaliação da mortalidade foi a ausência de qualquer tipo de movimento ou reação a estímulo mecânico, tocando o camarão com um bastão de vidro. Todos os animais utilizados para as análises histológicas estavam em estado de morbilidade.



Figura 1. Teste de toxicologia aguda realizado em câmara de germinação DBO (SL-224)



Figura 2. Camarão *N. davidi*

2.2. Análise físico-química da água

Duas vezes ao dia (8:00 e às 16:00h) foram registrados, de todas as unidades experimentais, os dados de pH e temperatura com pHmetro portátil (Hanna®, modelo HI 98130), o oxigênio dissolvido (OD) com sonda portátil (YSI 550A). A cada 24 h foi realizado análise de alcalinidade e dureza pelo método titulométrico, e os compostos nitrogenados por espectrofotometria (Biochrom Libra S22) (APHA, 1992).

2.3. Estudo Histológico

Para o tratamento do material biológico, foi utilizada a metodologia descrita por Bell e Lightner (1998). Os animais foram fixados em líquido de Davidson por 24 h e transferidos para álcool 70%. Posteriormente, para a confecção das lâminas histológicas foi realizado o processamento seguindo os processos de desidratação em série crescente de álcoois, diafanização em xileno, impregnação e inclusão do animal inteiro em parafina.

As peças foram seccionadas em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M15) com cortes de 3 µm de espessura para montagem das lâminas e coradas em hematoxilina-eosina (HE). As preparações foram montadas com Entellan New, observadas e fotografadas em microscópio óptico (Nikon® eclipse SI) equipado com uma câmera (Prime cam intervision®) e visualizado no software PRIME CAM. As alterações histopatológicas foram avaliadas de acordo com o método descrito por Bernet et al. (1999), adaptado para invertebrados conforme Costa et al. (2013). A metodologia foi baseada em valores de pontuação de acordo com o grau de distribuição e intensidade da lesão do órgão causada pelos agentes estressores, onde: "0" = ausência de lesão; "1-2" = ocorrência leve; "3-4" = ocorrência moderada e "5-6" = ocorrência acentuada de lesão. As alterações também foram classificadas de acordo com o tipo de reação padrão (1–4), com um fator de importância (w) de acordo com o grau de reversibilidade, onde: 1 = alterações facilmente reversíveis; 2 = alterações moderadas, reversíveis com o término da exposição, e 3 = alterações irreversíveis. A partir das classificações foi calculado o Índice do Órgão (I_{org}) (Fig. 3).

$$I_{org.} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

Figura 3. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração). Fonte: Bernet et al. (1999).

2.4. Análise estatística e tratamento dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. As concentrações letais medianas (CL_{50}) e os intervalos de confiança (95%) foram

estimados para amônia total e não ionizada (N-AT e N-NH₃) e nitrito (N-NO₂⁻) de acordo com os dados de mortalidade durante as 96 h de exposição aguda, com o programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977) e o nível de segurança (NS) conforme descrito por Sprague (1971).

Todas as análises foram submetidas à avaliação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Bartlett). Cumpridos os pré-requisitos, os dados foram submetidos à análise usando contraste polinomial. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico R Studio Versão 1.2.5033.

3. RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as variáveis físico-químicas da água dos juvenis de *N. davidi* do experimento com amônia (Tab. 1).

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição de camarões (*N. davidi*) a diferentes concentrações de amônia total (N-AT) e seu respectivo valor de amônia não ionizada (N-NH₃).

Variáveis	N-AT (mg.L ⁻¹) – Concentração Nominal					
	0	10	18	26	34	42
N-AT (Real)	0,85 $\pm$ 0,13	10,50 $\pm$ 0,36	18,76 $\pm$ 0,34	26,63 $\pm$ 0,35	34,63 $\pm$ 0,47	42,69 $\pm$ 0,41
N-NH ₃	0,02 $\pm$ 0,001	0,33 $\pm$ 0,004	0,58 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,01	1,29 $\pm$ 0,004
Temperatura	25,47 $\pm$ 0,32	25,41 $\pm$ 0,35	25,34 $\pm$ 0,29	25,45 $\pm$ 0,32	25,49 $\pm$ 0,34	25,44 $\pm$ 0,32
pH	7,70 $\pm$ 0,03	7,72 $\pm$ 0,03	7,72 $\pm$ 0,03	7,71 $\pm$ 0,02	7,73 $\pm$ 0,03	7,71 $\pm$ 0,02
OD	5,99 $\pm$ 0,16	5,77 $\pm$ 0,17	5,89 $\pm$ 0,22	5,81 $\pm$ 0,19	5,87 $\pm$ 0,18	5,84 $\pm$ 0,19
ODsat	79,83 $\pm$ 1,33	78,55 $\pm$ 2,46	78,48 $\pm$ 2,54	78,60 $\pm$ 1,30	78,90 $\pm$ 1,47	78,42 $\pm$ 1,69
Alcalinidade	83,5 $\pm$ 2,41	83,33 $\pm$ 2,5	83,5 $\pm$ 2,41	83 $\pm$ 2,58	83,5 $\pm$ 2,41	83,0 $\pm$ 2,58
Dureza	67,0 $\pm$ 1,69	67,78 $\pm$ 1,56	65,8 $\pm$ 1,75	66,6 $\pm$ 1,34	66,8 $\pm$ 1,39	67,2 $\pm$ 1,93

N-AT e N-NH₃ (mg.L⁻¹), Temperatura (°C), OD (mg.L⁻¹) ODSat (%), Alcalinidade e dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃).

Na tabela 2 estão apresentadas as variáveis físico-químicas da água dos juvenis de *N. davidi* do experimento com nitrito (Tab. 2).

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição de camarões (*N. davidi*) a diferentes concentrações de nitrito (N-NO_2^-).

Variáveis	N-NO_2^- (mg.L^{-1}) - Nominal					
	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25
N-NO_2^- (Real)	$0,12 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,08$
Temperatura	$25,2 \pm 0,52$	$25,2 \pm 0,42$	$25,4 \pm 0,38$	$25,2 \pm 0,52$	$25,3 \pm 0,55$	$25,3 \pm 0,36$
pH	$7,72 \pm 0,04$	$7,71 \pm 0,02$	$7,70 \pm 0,03$	$7,70 \pm 0,02$	$7,70 \pm 0,02$	$7,71 \pm 0,03$
OD	$5,97 \pm 0,14$	$5,71 \pm 0,24$	$5,82 \pm 0,17$	$5,88 \pm 0,21$	$5,85 \pm 0,16$	$5,79 \pm 0,16$
ODsat	$79,8 \pm 1,33$	$74,2 \pm 1,69$	$78,6 \pm 1,43$	$75 \pm 1,70$	$78,7 \pm 1,69$	$78,53 \pm 1,36$
Alcalinidade	$83,5 \pm 2,41$	$84,0 \pm 2,11a$	$83,5 \pm 2,42a$	$82,5 \pm 2,64$	$83,3 \pm 2,50$	$82,5 \pm 2,67$
Dureza	$67,8 \pm 1,99$	$68,6 \pm 2,12a$	$69,0 \pm 1,05a$	$69,0 \pm 1,41$	$68,4 \pm 1,33$	$67,75 \pm 2,25$

N-NO_2^- (mg.L^{-1}), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), OD (mg.L^{-1}) ODsat (%), Alcalinidade e dureza (mg.L^{-1} CaCO_3).

3.1. Sobrevivência e CL_{50}

Não foi observada mortalidade no grupo controle de ambos os compostos nitrogenados testados, e nos demais tratamentos com amônia não ionizada e nitrito houve mortalidades (Fig. 4 e 5). A sobrevivência reduziu para ambos os compostos nitrogenados ao longo das 96 h do experimento de toxicidade aguda.

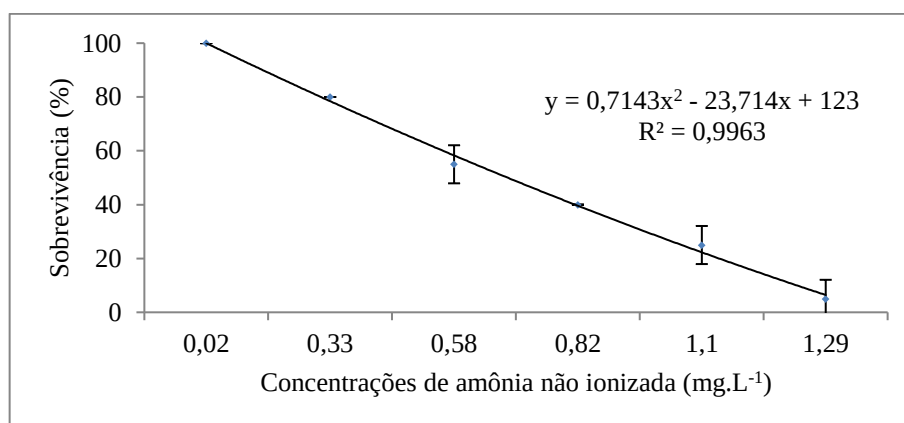


Figura 4. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de juvenis de *N. davidi* expostos a níveis crescentes de amônia não ionizada (N-NH_3).

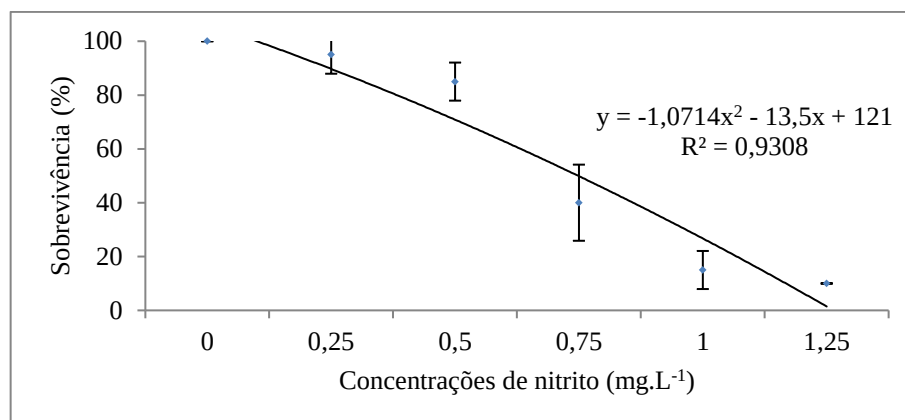


Figura 5. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de juvenis de *N. davidi* expostos a níveis crescentes de nitrito.

Foi possível observar o efeito da amônia na sobrevivência dos animais em 72 h de exposição. A CL₅₀-72 h de N-AT foi estimada em 22,36 mg.L⁻¹; e para N-NH₃ em 0,53 mg.L⁻¹ (Tab. 3). A CL₅₀-96 h de N-AT foi estimada em 19,98 mg.L⁻¹; e para N-NH₃ em 0,48 mg.L⁻¹, com nível de segurança estimado para N-AT e N-NH₃ de 1,99 mg.L⁻¹ e 0,048 mg.L⁻¹, respectivamente.

Foi possível observar o efeito do nitrito na sobrevivência dos animais já nas primeiras 48 h de exposição em todas as concentrações. A CL₅₀-48 h e 72 h de N-NO₂⁻ foram estimadas em 0,75 mg.L⁻¹. A CL₅₀-96 h de N-NO₂⁻ foi estimada em 0,69 mg.L⁻¹ com um nível de segurança de 0,069 mg.L⁻¹ (Tab. 3).

Tabela 3. Valores das concentrações letais medianas (CL₅₀) (mg.L⁻¹) e intervalos de confiança (IC) para amônia (N-AT e N-NH₃) e nitrito (N-NO₂⁻) estimados durante a exposição dos juvenis de *N. davidi* em 96 h de exposição aguda e os respectivos níveis de segurança (NS) (mg.L⁻¹).

CL ₅₀	Tempo (h)				NS
	24	48	72	96	
N-AT	-	-	22,36 (17,40-28,73)	19,98 (15,77-25,31)	1,9
N-NH ₃	-	-	0,53 (0,42-0,68)	0,48 (0,38-0,60)	0,048
N- NO ₂ ⁻	-	0,75 (0,66-0,86)	0,75 (0,66-0,86)	0,69 (0,60-0,80)	0,069

3.2. Biomarcadores morfológicos

No presente estudo, o estudo histológico foi utilizado como ferramenta de detecção de respostas dos juvenis de *N. davidi* frente à exposição letal à amônia e ao

nitrito. O I_{org} branquial aumentou quando os animais foram expostos às primeiras concentrações de ambos os compostos, indicando que a exposição induz a ocorrência de alterações branquiais (Fig. 6 e 7). O índice de órgão representa o grau de lesão dos órgãos, sendo que um valor elevado do índice representa um elevado grau de lesão do órgão acometido.

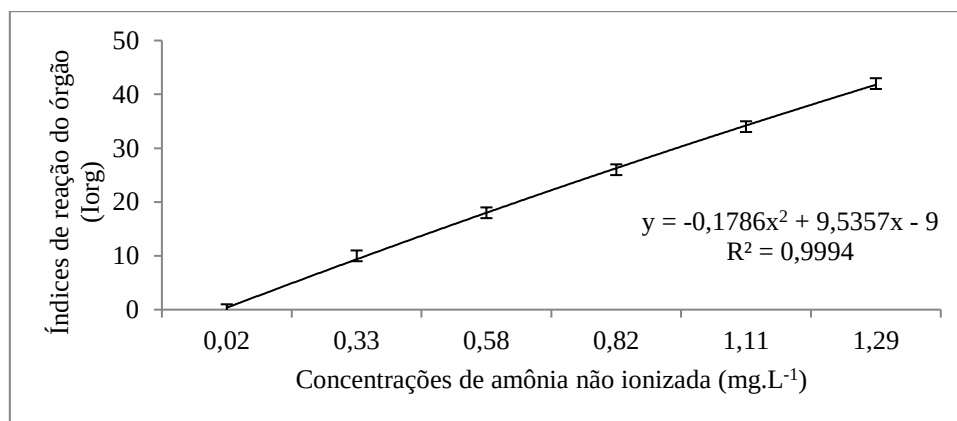


Figura 6. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos Índices de reação do órgão (I_{org}) durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de *N. davidi* a diferentes concentrações de amônia não ionizada (N-H₃).

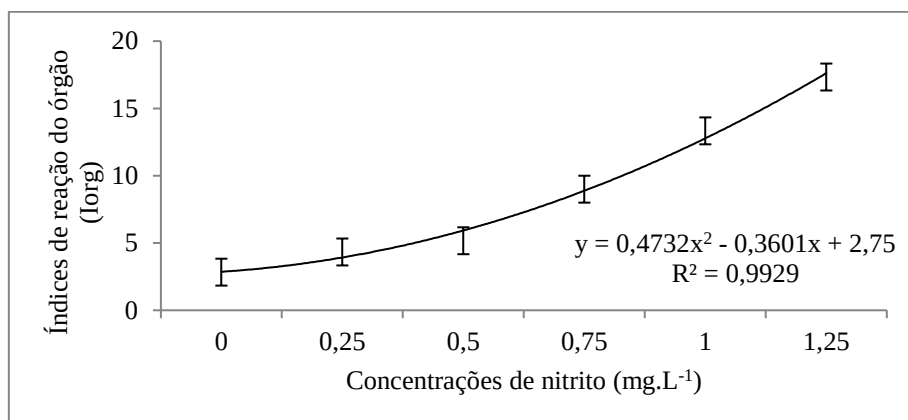


Figura 7. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos Índices de reação do órgão (I_{org}) durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de *N. davidi* a diferentes concentrações de nitrito (N-NO₂⁻).

A análise histológica das brânquias de *N. davidi* submetidas a diferentes concentrações de amônia total (Fig. 8) e nitrito (Fig. 9) mostraram que, comparando o tratamento controle (Fig. 8A e 9A) com os outros tratamentos ao longo de 96 h de exposição, a estrutura branquial sofreu danos visíveis (Fig. 8B-F e 9B-F). Os tratamentos controle de ambos os compostos tiveram poucas alterações, representadas principalmente por danos regressivos, espessamento do epitélio lamelar e infiltrações

hemocíticas (Fig. 8A e 9A). No presente estudo, efeitos degenerativos provocados à estrutura das brânquias foram observados com o aumento das concentrações de amônia total e nitrito, com alterações como tumefação celular, fusão lamelar, espessamento do epitélio lamelar, hiperplasias, levantamento do lamelar epitélio, infiltrado hemocítico e necrose (com baixa ocorrência) (Fig. 8B-F e 9B-F).

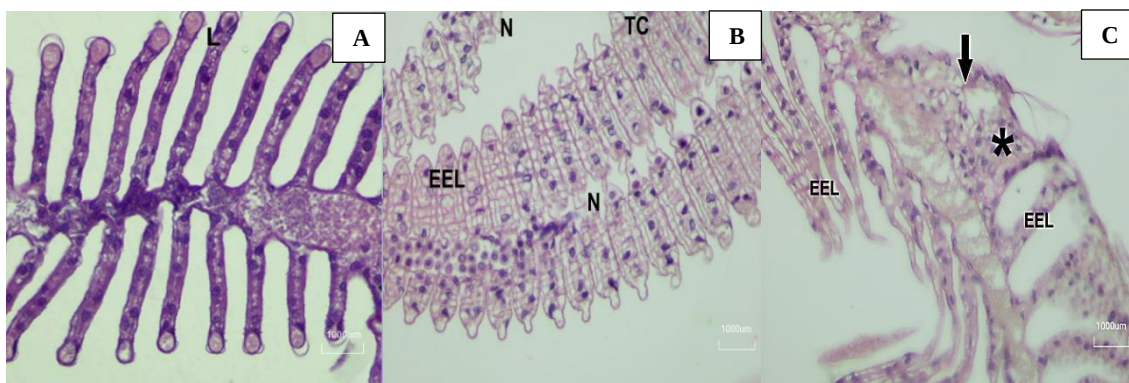


Figura 8. Fotomicrografias de juvenis de *N. davidi* expostos a concentrações agudas de N-AT por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, lamelas secundárias (L) em aumento de 400x; B – Brânquias dos animais expostos a 10 mg.L⁻¹ de N-AT, fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), necrose (N), edema dos canais marginais (estrela preta) e hiperplasia (seta preta) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 42 mg.L⁻¹ de N-AT, hiperplasia (seta preta), fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), descolamento epitelial (asterisco branco) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.

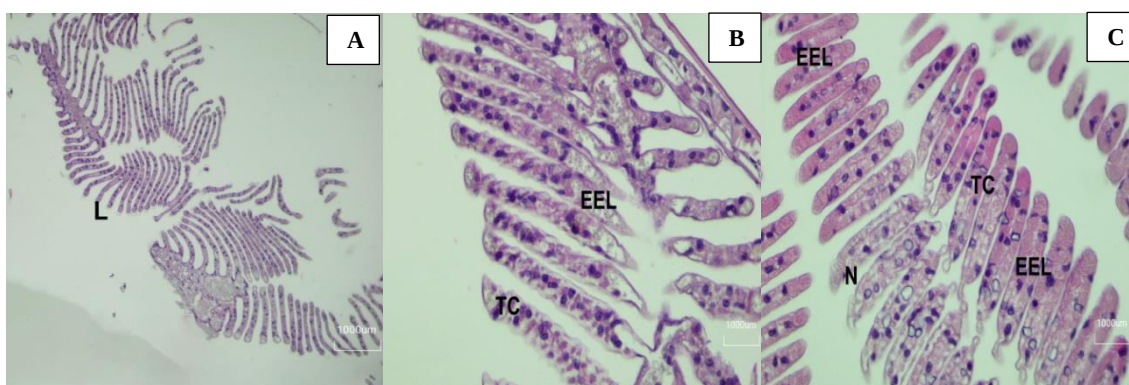


Figura 9. Fotomicrografias de juvenis de *N. davidi* expostos a concentrações agudas de N-NO₂⁻ por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, lamelas secundárias (L) em aumento de 400x; B – Brânquias dos animais expostos a 0,25 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ com espessamento do epitélio lamelar (EEL), tumefação celular (TC) e presença de edemas em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 1,25 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻, hiperplasia (seta preta), fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), descolamento epitelial (asterisco branco) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.

4. DISCUSSÃO

Durante o experimento, as variáveis limnológicas da água mantiveram-se constantes e em conformidade para a produção de crustáceos, onde a temperatura manteve-se conforme faixa de tolerância descrita por Tropea et al. (2015) e Tomás et al. (2020), pH (Sampaio et al., 2007), alcalinidade (González-Vera E Brown, 2017), e a concentração de oxigênio dissolvido e dureza total ($\text{mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) (New, 2002), compatíveis com o utilizado para a espécie.

Na água, a amônia ocorre na forma iônica (amônio - NH_4^+) e na sua forma não ionizada (NH_3), que coexistem em equilíbrio, sendo a reação influenciada pelo pH, temperatura e salinidade, etc (Gomes Jr et al., 2016). A amônia é mais tóxica em pH e temperatura mais elevados (Wildgoose, 2001), e em salinidade mais baixa, porque nestas condições, há uma maior proporção de amônia não ionizada na água, forma extremamente tóxica à maioria dos organismos aquáticos (Ostrensky e Wasielesky 1995; Cavalli et al., 2000). No meio aquático, especialmente quando o pH é ácido ou neutro, a amônia formada é instável, sendo convertida por hidratação a íon amônio (NH_4^+), já em meio alcalino, a possibilidade de ocorrência desse processo é muito reduzida, podendo causar aumento da concentração da forma não ionizada (NH_3) (Esteves, 1998).

Para *Macrobrachium rosenbergii*, um camarão de água doce, a recomendação para exposição à amônia não ionizada (NH_3) são concentrações menores que $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo que a concentração de 2 mg.L^{-1} em pH 8,5, é conhecida como letal ou estressante para os juvenis da espécie, além de reduzir a tolerância desses animais com aumento do pH (New, 2002). Já para o nitrito, o valor limite sugerido por Timmons et al. (2002) na aquicultura é 1 mg.L^{-1} . New (2002) recomenda para camarões de água doce concentrações menores que 2 mg.L^{-1} de exposição. No presente trabalho, os animais tiveram mortalidade em concentrações inferiores a $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo que a menor concentração testada, de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ já apresentou mortalidade, colocando a espécie como a mais susceptível dentre os camarões de água doce.

No contexto produtivo, a amônia tende a se acumular com o tempo, principalmente devido à excreção de animais e à decomposição de compostos orgânicos

(Gomes Jr et al., 2016). No entanto, a amônia pode ser convertida em nitrito por bactérias oxidantes de amônia e em nitrato por bactérias oxidantes de nitrito (Timmons e Ebeling, 2007), o que é priorizado em sistemas de recirculação de água, e também no sistema de bioflocos. O nitrito também pode se acumular na água quando a nitrificação é obstruída devido à falha na oxidação para nitrato, rápido fluxo de água através dos filtros dos sistemas de cultivo e más condições dos próprios filtros, como baixos níveis de oxigênio, ausência de bactérias oxidantes de nitrito, etc (Epifanio e Srna, 1975).

Em sistemas fechados de recirculação de água, o biofiltro deve ser dimensionado adequadamente, de forma a atingir os limites seguros dos parâmetros de qualidade da água, evitando o estresse, doenças e mortalidade dos animais (Wheaton et al., 1994), atendendo-se aos valores de NH_3 , NO_2 , oxigênio dissolvido, temperatura e pH, para um funcionamento otimizado dos microrganismos presentes no filtro (Cervantes, 2009).

Segundo Watson et al. (1989), a primeira etapa do processo de nitrificação é mediada por bactérias oxidantes da amônia, principalmente do gênero *Nitrosomonas* sp., e a segunda etapa, designada por nitratação, é mediada por bactérias oxidantes do nitrito, principalmente do gênero *Nitrobacter* sp. A conversão dos compostos é feita por esses microrganismos na presença de oxigênio, convertendo primeiramente NH_4^+ a NO_2^- , e posteriormente NO_2^- a NO_3^- (Chen et al., 2006, Pereira e Mercante, 2005). Por isso, em sistemas utilizando biofiltros, o dimensionamento deste, juntamente com o tempo de detenção hidráulico e a concentração de amônia como substrato, devem nortear para otimizar o sistema de recirculação.

O monitoramento da concentração de compostos nitrogenados é primordial para a manutenção de padrões adequados de qualidade da água na criação de qualquer espécie aquática (Gomes JR. et al., 2016). A sensibilidade de um organismo a um determinado tóxico pode variar de acordo com seu tamanho, idade e estágio de desenvolvimento (Wajsbrodt et al., 1993). Embora a tolerância a amônia e ao nitrito varie entre as espécies, esses compostos são sabidamente conhecidos por serem tóxicos para *Artemia* sp. (Chen et al., 1989), camarões peneídeos (Lin et al., 1993; Ostrensky e Wasielesky, 1995), camarões palemonídeos (Armstrong et al., 1976, 1978; Figueroa-Lucero et al., 2012) e peixes (Wajsbrodt et al., 1993; Santos-Silva et al., 2017; Wang et al., 2015).

Vários estudos apontam para a toxicidade potencial da amônia e do nitrito para animais aquáticos (Wang et al., 2004; Dutra et al., 2016a, 2016b). Especialmente para

produção de camarões, esses compostos podem levar a uma expressiva perda de produtividade, com taxas reduzidas de crescimento, sobrevivência (Armstrong et al., 1978) e reprodução (Cavalli et al., 1999; Cavalli et al., 2000; Gross et al., 2004).

Em crustáceos, a amônia pode afetar equilíbrio ácido-base, metabolismo do nitrogênio, respiração (Chen e Lai, 1992), osmolaridade da hemolinfa, crescimento (Chen e Cheng, 1993), além de aumentar a frequência de ecdises (Chen e Kuo, 1992; Mugnier et al., 2008) e, em casos extremos, pode causar a mortalidade (Zin e Chu, 1991). Outro indicativo de condições desfavoráveis foi observado no presente estudo, com a presença de exúvias da maioria dos animais expostos à amônia e nitrito nas crescentes concentrações testadas. A ecdise é um processo essencial para o crescimento dos crustáceos (Sathapondecha et al., 2014), mas que também ocorre quando os animais são expostos a xenobióticos (Negro et al., 2011). O processo de muda é considerado um momento crítico para os crustáceos, pois com a perda do exoesqueleto, os animais ficam desprotegidos, facilitando ataques de outros animais, e também são mais vulneráveis a contaminantes externos (Negro et al., 2011), pois há o aumento da permeabilidade do tegumento (Mugnier et al., 2008). Em contrapartida, Hunter e Uglow (1993) sugerem uma redução na permeabilidade do tegumento à medida que o exoesqueleto endurece.

Mugnier e Justou (2004) estudando a espécie *Litopenaeus stylirostris* em diferentes fases de ecdise e expostos a concentrações de amônia, encontraram que os estágios de pré-muda D₁ e D₂ (estágio tardio da pré-muda antes da ecdise), parecem ser mais sensíveis ao composto do que os estágios de pré-muda D₀, e do que o estágio C de intermuda. Nesse contexto, o processo de ecdise, em todas as concentrações de ambos os compostos no presente estudo, pode ter sido um fator agravante na intoxicação dos animais. O maior número de mudas indicam estado de estresse dos crustáceos e é facilmente observado pela presença de exúvias (após a muda) nos ambientes de cultivo, como mostra Armstrong et al. (1976) ao exporem *M. rosenbergii* ao nitrito, e Montagna e Collins (2005) ao exporem *Palaemonetes argentinus* ao glifosato, com a redução do período intermudas.

A muda é controlada por uma interação complexa de hormônios e, em particular, a regulação negativa do hormônio inibidor da muda (MIH) do complexo da glândula sinusal do órgão X (XO-SG), que suprime a síntese e a secreção dos hormônios da muda do órgão Y (Mattson e Spaziani, 1985). É um processo complexo que é afetado

por uma série de fatores externos, como temperatura, fotoperíodo, nutrição e ablação do pedúnculo ocular (Chithra e Devaraj, 2012), sendo que ambos os compostos podem ter sido atuantes sobre o processo.

Como exemplo, Gomes Jr et al. (2016) expondo larvas de *Macrobrachium carcinus* a amônia e nitrito, perceberam que a tolerância aumentou com o desenvolvimento das larvas. Com base na CL_{50} em 96 h, os autores estimaram níveis seguros em $0,83 \text{ mg.L}^{-1}$ para N-AT ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-NH₃) e $0,328 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-NO₂⁻. Os autores recomendam que esses compostos sejam mantidos abaixo desses níveis durante a criação larval de *M. carcinus*.

Altas concentrações de nitrito retardam o desenvolvimento larval e reduzem ganho de peso e sobrevivência tanto no início, quanto no final do ciclo larval de *M. rosenbergii* (Mallasen e Valenti, 2006). Assim, como no estudo desenvolvido por Dutra et al. (2016b), juvenis de *M. amazonicum* foram também mais vulneráveis a altas concentrações de nitrito, exibindo uma taxa de mortalidade de 95% para uma concentração de 4 mg.L^{-1} de nitrito após 96 h de exposição, e níveis de segurança para amônia total e nitrito foram estimados em 2,98 e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente (Brazão et al., 2021), valores consideravelmente superiores aos encontrados no presente estudo, o que corrobora a suscetibilidade da espécie aos compostos.

A realização de testes de toxicidade agudos e a consequente estimativa das concentrações letais medianas (CL_{50}) é uma prática padrão em estudos de toxicologia aquática (USEPA, 2002). Uma vantagem dessa metodologia é que ela permite uma comparação da tolerância à amônia e nitrito de diferentes espécies (Tab. 4) e permite que se tenha conhecimento da tolerância dos organismos frente a um agente estressor. Os referidos estudos são imprescindíveis para conhecermos as espécies que serão utilizadas na aquicultura, pois o controle das variáveis físico-químicas respeitam os níveis tolerados pelas diferentes espécies cultivadas.

Tabela 4. Concentrações letais medianas (CL₅₀) e níveis de segurança (NS) de amônia não ionizada (N-NH₃) e nitrito (N-NO₂⁻) estimado para diferentes estágios de vida de várias espécies de crustáceos.

Espécies	Estágio	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	pH	NS (mg.L ⁻¹)	Referências
Amônia não ionizada (N-NH ₃)					
Macrobrachium rosenbergii	Larva	0,40 (96h)	6,83	0,68	Armstrong et al. (1978)
	Larva	1,0 (96h)	7,6	0,76	
	Larva	1,35 (96h)	8,34	0,84	
Penaeus japonicus	Zoea 1	0,6 (96h)	8,23 - 7,92	0,06	Lin et al. (1993)
	Mysis I	0,9 (96h)	8,23 - 7,92	0,09	
	Pos-larva	1,3 (96h)	8,23 - 7,92	0,13	
	Juvenil	3,1 (96h)	8,23 - 7,92	0,31	
Penaeus paulensis	Zoea	0,73 (96h)	8,24	0,82	Ostrensky e Wasielesky (1995)
	Mysis	0,85 (96h)	7,92	0,79	
	Pós-larvas	0,32 (96h)	8,10	0,81	
	Juvenis	1,10 (96h)	7,78	0,77	
	Adultos	1,06 (96h)	7,71	0,77	
Eriocheir sinensis	Zoea 1	0,20 (72h)	7,99	0,02	Zhao et al. (1997)
	Zoea 2	0,27 (72h)	7,98	0,03	
	Juvenil	0,90 (96h)	7,81	0,09	
Macrobrachium tenellum	Larva	0,41 (72h)	7,79	0,04	Figueroa-Lucero et al. (2012)
Macrobrachium carcinus	Zoea 2	0,50 (96h)	8,0	0,05	(Gomes Jr et al., 2016)
	Zoea 5	0,71(96h)	7,9	0,07	
	Zoea 8	0,92 96h)	8,0	0,09	
Nitrito (N-NO ₂ ⁻)					
M. rosenbergii	Larva	8,6 (96h)	7,98	0,86	Armstrong et al. (1976)
Penaeus monodon	Zoea	13,20 (24h)	8,05 - 8,30	1,32	Chen e Chin (1988)
	Pos-larva	13,55 (96h)	7,85 - 8,30	1,35	
Scylla serrata	Zoea 1	41,58 (96h)	8,32 - 8,64	4,15	Seneriches-Abiera et al. (2007)
	Zoea 3	25,54 (96h)	8,32 - 8,64	2,55	
	Zoea 5	69,93 (96h)	8,32 - 8,64	6,99	
M. carcinus	Zoea 2	3,28 (96h)	8,1	0,32	(Gomes Jr et al., 2016)
	Zoea 5	9,73 (96h)	8,0	0,97	
	Zoea 8	34,00 (96h)	8,0	3,40	

Vários autores corroboram o que é colocado sobre a tolerância dos animais aos compostos nitrogenados, frente a diferentes espécies, fases de vida (Wajsbrot et al., 1993) e pH, devido ao efeito na cinética de acúmulo de amônia na hemolinfa em crustáceos (Mugnier et al., 2008). Um pH mais alto aumenta a absorção de amônia, como mostrado em *P. japonicus* (Chen e Kou, 1992), *P. monodon* (Chen e Kou, 1993) e o lagostim *Pacifastacus leniusculus* (Harris et al., 2001), e diminuição da excreção de amônia em *P. chinensis* (Chen e Lin, 1995).

Percebe-se que a espécie do presente estudo foi menos tolerante a NH_3 , em fase de vida similar (juvenil), do que as espécies *P. japonicus* (Lin et al., 1993), *P. paulensis* (Ostrensky e Wasielesky, 1995) e *E. sinensis* (Zhao et al., 1997). Comportamento similar para o NO_2^- em que, entre os trabalhos citados na tabela 4, percebe-se que as fases de vida eram inferiores às utilizadas no presente estudo, e mesmo assim a tolerância dos juvenis de *N. davidi* foram inferiores aos trabalhos mencionados, mostrando novamente que a espécie é mais sensível aos compostos nitrogenados do que outros crustáceos.

Segundo Freire et al. (2008), a regulação osmótica e iônica nos crustáceos é realizada principalmente pelas brânquias, juntamente com os órgãos excretores. Os autores colocam que, além de seu papel nas trocas gasosas, as brânquias participam do transporte iônico ativo, envolvendo osmorregulação, homeostase do cálcio, excreção da amônia e regulação do pH extracelular, o que faz do órgão um excelente biomarcador de qualidade da água. Nesse contexto, danos às brânquias, devido à exposição à xenobióticos, podem afetar de forma generalizada a homeostase dos animais acometidos.

Os biomarcadores são definidos como as respostas bioquímicas, morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de organismos a xenobióticos presentes no ambiente (Walker et al., 2010). A análise histológica de brânquias de crustáceos tem sido cada vez mais reconhecida como uma ferramenta valiosa para a avaliação dos impactos de poluentes em crustáceos (Maharajan et al., 2015; Negro, 2015; Dutra et al., 2017; Carvalho-Neta et al., 2019; Brazão et al., 2021), sendo considerada um ótimo biomarcador morfológico para interpretação da exposição do animal a poluentes. A brânquia é o primeiro órgão a entrar em contato com o meio aquático, e por consequência à poluição ambiental, sendo altamente sensível a produtos químicos,

respondendo com diferentes alterações estruturais após exposição (Negro, 2015; Carvalho-Neta et al., 2019; Jesus et al., 2020), o que pode ocasionar graves problemas para o organismo. As brânquias dos crustáceos apresentam expressiva superfície, sendo permeável para íons e gases, visando trocas internas e externas (Freire et al., 2008).

O fluido corporal circulante do corpo dos crustáceos é a hemolinfa, e a proteína de transporte do oxigênio dissolvido é a hemocianina (Barbier, 2010). Como a distribuição interna de substâncias tóxicas ocorre em mais de um compartimento, dentro do corpo do crustáceo, a circulação da hemolinfa pode estar envolvida no transporte desses produtos químicos para seus locais de ação (Negro et al., 2011). Brooks (1974), estudando outros artrópodes (insetos), relatou que o ácido fosfórico penetra na cutícula, entrando na hemolinfa e podendo ser transportado a todas as partes do organismo em solução, se solúvel em água, ou ligado a proteínas ou dissolvido em partículas lipídicas, se lipofílicas. Pelo caráter hidrofílico, moléculas com essa característica são mais propensas a permanecerem no fluido circulatório do que pequenas moléculas hidrofóbicas, que são rapidamente distribuídas em vários órgãos e armazenadas no tecido lipídico (Hartley e Graham-Bryce, 1980), o que enfatiza a atuação do NH_3 que devido a sua alta lipossolubilidade torna-se mais difusível através das bicamadas de fosfolipídios (Negro et al., 2011) e por esta razão é a forma mais tóxica dentre todos os compostos nitrogenados (Weihrauch et al., 2004).

A incorporação de nitrito na hemolinfa dos crustáceos pode ocasionar a formação de meta-hemocianina, reduzindo o nível de oxi-hemocianina, provocando problemas respiratórios, causando hipóxia nos tecidos ou mesmo afetando o equilíbrio ácido-base e a excreção de amônia (Brazão et al., 2021). Isso pode reduzir a capacidade imunológica do animal, aumentando a suscetibilidade à infecção por bactérias e causando a morte em casos extremos (Chen e Cheng, 1995; Xian et al., 2011).

Também é relatado que N-NO_2^- e Cl^- competem entre si durante a captação ativa de Cl^- (Jensen, 1996), esse sistema de captação do Cl^- é responsável por regular o transporte de Cl^- na hemolinfa, bem como, pelo equilíbrio ácido-base, através da troca Cl^- influxo e HCO_3^- efluxo ($\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$) (Jensen, 1995). Segundo Dutra et al. (2017), a presença de danos à estrutura branquial de camarões quando expostos ao nitrito pode ser associada a competição desses compostos pelo sistema de captura de Cl^- nas brânquias. Essa competição tem implicações diretas sobre a toxicidade, mas consequências

osmorregulatórias também (Romano e Zeng, 2013). Por exemplo, em crustáceos, a exposição ao nitrito resultou em desequilíbrio, reduzindo os níveis normais de Na^+ e Cl^- para lagostim-do-Pacífico (*Pacifastacu leniusculus*) (Harris e Coley, 1991) e para Camarão-japonês (*Penaeus japonicus*) (Cheng e Chen, 1998).

A produção de amônia durante o catabolismo proteico é uma função normal pela qual o animal naturalmente produz e excreta amônia (Noga, 1996). O nitrito, no entanto, é um composto intermediário no processo de nitrificação da amônia, que também atua no processo osmótico sendo absorvido pela via do cloreto, como já descrito (Romano e Zeng, 2013; Zhang et al., 2015). Devido a isso uma das medidas para mitigação da ação tóxica do nitrito é salinizar o meio de cultivo devido a essa competição (Barbieri et al., 2014)

A exposição à amônia e ao nitrito pode danificar as brânquias dos camarões (Brazão et al., 2021). Em estudo recente realizado por Dutra et al. (2017), foram avaliados os danos causados pela exposição à amônia total e ao nitrito nas brânquias de juvenis de *M. amazonicum*. Os autores observaram que o aumento dos danos à brânquia foi relacionado com o aumento das concentrações de amônia total, e que diferentemente da amônia, o nitrito causou mais danos em concentrações intermediárias, o que demonstra a maior vulnerabilidade das brânquias dos camarões ao nitrito. O resultado encontrado por Dutra et al. (2017) corrobora os achados no presente estudo, considerando que danos foram encontrados em tratamentos intermediários das concentrações de nitrito. No entanto, é importante salientar a necessidade de levarmos em conta a concentração de amônia não ionizada nos estudos e não somente a amônia na sua forma total.

Alterações como espessamento do epitélio lamelar e infiltrações refletem uma reação inflamatória do corpo para evitar maiores danos ao órgão do animal exposto ao agente tóxico (Negro et al., 2011). No entanto, as referidas alterações são classificadas como lesões reversíveis, após interrupção do agente estressante (Bernet et al., 1999). Danos causados às brânquias como tumefação celular, hiperplasia e acúmulo de hemócitos, podem refletir uma adaptação ao estresse causada pela exposição aos xenobióticos, levando a um espessamento do epitélio lamelar, aumentando assim a distância entre o meio interno e externo (Mallatt, 1985; Negro et al. 2011). Esse tipo de interpretação faz com que a histopatologia seja uma ferramenta útil para a compreensão

das alterações morfofisiológicas nas brânquias dos camarões que levam a distúrbios ou até mesmo a morte dos crustáceos expostos a poluentes.

Os efeitos adversos causados pelos poluentes em crustáceos dependem de sua concentração e afinidade, toxicidade intrínseca e biotransformações (James, 1987) e as respostas do próprio indivíduo (Klerks, 1999). O fato da amônia e do nitrito causarem danos às brânquias em diferentes intensidades pode explicar por que o efeito da mortalidade pode mudar com a duração da exposição, onde os compostos podem causar danos às brânquias mesmo sem causar mortalidade do animal. Aplicando os resultados encontrados ao contexto de produção, como os ciclos de produção são maiores ao tempo do experimento, e se os animais forem submetidos a exposições prolongadas, as alterações causadas podem ser agravadas podendo interferir sobre o sucesso da atividade.

Brazão et al. (2021) testando amônia com *M. amazonicum* encontraram nos animais submetidos as concentrações de 11 e 44 mg.L⁻¹ de amônia total danos aumentados no I_{org}, proporcional à mortalidade e à concentração do composto nitrogenado. O mesmo pode ser observado em todas as concentrações de nitrito que foram testadas (0; 1,5; 2,5 e 5 mg.L⁻¹). Espessamento do epitélio lamelar, fusão das lamelas, necrose, levantamento do epitélio lamelar e infiltração hemocítica foram as alterações encontradas pelos autores no referido trabalho, sendo condizentes com as encontradas no presente estudo.

Os poluentes podem ser absorvidos pelos crustáceos pelo tegumento, brânquias e/ou ingestão de alimentos contaminados via trato gastrointestinal, podendo causar toxicidade grave para as funções biológicas normais nos níveis teciduais, celulares e moleculares (Negro et al., 2011). No entanto, os autores colocam que a permeabilidade das barreiras biológicas e a taxa de transporte das substâncias pelo organismo são afetados pela atividade metabólica do animal e, indiretamente, por fatores influenciando esta atividade como temperatura da água, pH, dureza e presença de outros produtos químicos. Sendo que a atividade metabólica do animal é influenciada por seu tamanho corporal, taxa de crescimento, atividade e estado fisiológico (juvenil ou adulto, ecdise, alimentação) (Zitko, 1980). Devido a isso, vê-se que manter os parâmetros de qualidade de água em níveis adequados para a espécie produzida é essencial para a otimização da produção em atividades aquícolas.

As brânquias estão relacionadas com o transporte de gases respiratórios e também com excreção de amônia, pois a maior parte da excreção de compostos nitrogenados residuais ocorre através do epitélio branquial (Negro et al., 2011). Devido a isso, alterações nesse órgão podem prejudicar funções essenciais para o organismo. Negro et al. (2011) ressaltam que danos branquiais podem causar dificuldades na absorção de oxigênio, levando a eventual asfixia, e interrupção da função osmorregulatória, sendo que a diminuição do oxigênio pode causar hipóxia interna progressiva, com diversos efeitos como alterações metabólicas e dificuldades locomotoras. Os autores colocam que a hipóxia interna contínua pode provocar uma liberação constante de ácido láctico como resíduo metabólico, com o consequente desequilíbrio ácido-base. Esse desequilíbrio e seus efeitos histológicos podem eventualmente causar a morte do indivíduo afetado devido à acidose ou asfixia progressiva (Schmidt-Nielsen, 1997). Em situações de hipóxia, muitos crustáceos diminuem seus movimentos como forma de reduzir o oxigênio consumido pelos músculos, usando o oxigênio disponível em vez de usá-lo para o metabolismo (Zou e Stueben, 2006). A mesma resposta ocorre se um animal tem uma deficiência em consumo de oxigênio, pois em ambas as situações a concentração de oxigênio na hemolinfa é insaturado, o que pode afetar a tentativa de escape do animal da área contaminada, agravando os efeitos dos contaminantes; além de deixar os animais mais susceptíveis a predadores (Negro et al., 2011). Apesar das concentrações de oxigênio do presente estudo estarem em níveis ótimos, constatou-se que os animais expostos a ambos os compostos estavam com o comportamento natatório anormal, com dificuldades em se manterem na coluna d'água, e por vezes nadando lateralmente, o que demonstra o desequilíbrio da homeostase desses animais.

Os crustáceos são animais amoniotélicos, onde as brânquias desempenham papel importante na excreção dos compostos nitrogenados (Negro et al., 2011). O mecanismo que suporta a excreção de amônia em crustáceos é a difusão do NH_3 ao longo de um gradiente de concentração e a excreção parcial da forma ionizada NH_4^+ (Weihrauch et al., 1999; 2004). A toxicidade da amônia é mediada pela ativação excessiva de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no cérebro (Negro et al., 2011). Como consequência, o ATP cerebral é esgotado, enquanto o Ca_2^+ intracelular aumenta, com subseqüentes aumentos de K^+ intracelular e, finalmente, morte celular (Weihrauch et al., 1999, 2004), o que indica os resultados observados no presente

estudo onde foram confirmados, maior mortalidade e maiores I_{org} nas concentrações mais elevadas de NH_3 .

A adaptação dos crustáceos a ambientes dulcícolas ocorreu devido à pressão seletiva, demandando a estes animais um ajuste nos seus processos fisiológicos, como aumento na absorção de íons; diminuição da permeabilidade de íons pelo exoesqueleto; e aumento da produção de metabólitos (e.g. urina) (Péqueux, 1995; Augusto et al. 2007), mecanismos necessários em função do nicho ecológico que esses animais possuem. Segundo Péqueux (1995) e Romano e Zeng (2013), os organismos aquáticos de água doce são osmorreguladores, sendo que em crustáceos as enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica atuam na regulação do equilíbrio ácido/base e influxo iônico pelas brânquias, resultando na manutenção da concentração osmótica e de Na^+/Cl^- na hemolinfa mais alta do que na água.

Nos crustáceos, o CO_2 é transportado dentro da hemolinfa via HCO_3^- , onde a anidrase carbônica, localizado basolateralmente, catalisa isso de volta para CO_2 (+ H_2O) ser excretado passivamente para o meio ambiente (Romano e Zeng, 2013). Neste processo, a enzima anidrase carbônica citoplasmática converte o CO_2 e H_2O em H^+ e HCO_3^- , que servem como contraíons para a absorção de Na^+ e Cl^- , respectivamente, através das brânquias, em baixa salinidade (Cameron, 1979; Henry e Cameron, 1982; Henry e Cameron, 1983; Henry et al., 2003). Assim, o desafio de animais de água doce é manterem-se hiperosmóticos em relação ao meio, utilizando-se desse mecanismo para a absorção de sais (Henry, 1988; Mitchell; Henry, 2014).

Os principais mecanismos de regulação iônica e osmótica em crustáceos de água doce incluem absorção de sais através do epitélio branquial especializado (McNamara e Torres 1999; Weihrauch et al. 2004; Belli et al. 2009), sendo que após a absorção de NH_3 , no citosol, a amônia gasosa sofre protonação resultando em NH_4^+ e hidroxila (OH^-) (Arana, 1997). Existem evidências que crustáceos podem excretar ativamente amônio pelas brânquias, até mesmo contra o gradiente de concentração, utilizando a enzima Na^+/K^+ -ATPase (Weihrauch et al., 2004; Masui et al., 2005; Garçon et al., 2009). O processo que esses crustáceos usam para eliminar a amônia é a excreção ativa (Negro et al., 2011). As taxas de excreção da amônia estão correlacionadas com a absorção de Na^+ (Harris et al., 2001). O NH_4^+ substitui o K^+ na ativação da Na^+/K^+ -ATPase sensível à ouabaína, que é localizado nas membranas basolaterais das células do epitélio branquial

(Towle et al., 1981; Towle e Kays, 1986). Esta enzima (Na^+/K^+ -ATPase) é estimulada sinergicamente por NH_4^+ e K^+ (Negro et al., 2011). Em decápodes de água doce, em altas concentrações de NH_4^+ , a bomba expõe um novo sítio de ligação para NH_4^+ que modula a atividade da Na^+/K^+ -ATPase independentemente dos íons K^+ (Romano e Zeng, 2007, 2010). Mais uma vez as brânquias apresentam mecanismos de resposta na tentativa de sobrevivência do organismo aquático frente à exposição às elevadas concentrações de amônia.

O efluxo passivo de NH_4^+ é difícil devido ao espessamento do epitélio branquial, enquanto a excreção de amônia (NH_3) é difícil por causa de concentrações ambientais (Negro et al., 2011). Esses autores enfatizam que os compostos residuais nitrogenados são eliminados por efluxo ativo, sendo que danos histológicos nas brânquias provocados por agrotóxicos, pesticidas e outros compostos dificultam esse processo de excreção.

Quando os crustáceos não conseguem eliminar a amônia produzida pelo metabolismo dos compostos nitrogenados, ela se acumula na hemolinfa, com diversos efeitos nos indivíduos, como modificação da liberação de citocinas e aumento da atividade das hidrolases lisossômicas (Negro et al., 2011), podendo inferir que a impossibilidade do processo difusivo da amônia pode levar à intoxicação dos animais.

Alterações nas brânquias como infiltração hemocítica; edema, fusão e elevação lamelar; anormalidades na arquitetura; necrose e outras malformações são alguns dos efeitos produzidos por agrotóxicos em camarões de água doce e caranguejos (Negro et al., 2011). Alterações como hiperplasia, necrose e ruptura de células pilares juntas, podem causar maiores danos ao tecido branquial resultando em colapso lamelar e perda funcional do órgão (Jesus et al., 2020). Alterações similares foram encontradas no presente trabalho, o que corrobora as preocupações com a gestão da atividade aquícola na presença desses compostos nitrogenados.

Os presentes resultados reforçam a necessidade do planejamento cuidadoso e gestão de sistemas fechados de água para a criação de *N. davidi*. Deve-se ter cuidado especial não apenas com o monitoramento frequente dos níveis de amônia e nitrito, mas também a práticas de manejo que minimizem o acúmulo desses compostos em tanques de criação, como dimensionamento e montagem adequada do biofiltro, tempo de detenção hidráulica correta, rações com níveis adequados de proteína fornecidas, densidade de estocagem ideal para a espécie, trocas parciais de água se os níveis de

nitrogenado alcançarem valores tóxicos, e se não for possível tentar salinizar a água em concentrações toleráveis para a espécie.

5. CONCLUSÃO

Os resultados confirmam que quanto maiores as concentrações de amônia e nitrito, maiores os danos causados à estrutura branquial, corroborando os dados de mortalidade. Exposições agudas a concentrações de NH_3 e NO_2^- , iguais ou superiores a $0,33 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, resultaram em mortalidades e alterações histológicas nas brânquias. Tal fato ressalta a importância do conhecimento sobre a tolerância de *N. davidi* à exposição à amônia e ao nitrito, pois os compostos nitrogenados ocorrem naturalmente nos sistemas de produção e precisamos saber quais os níveis passam a causar efeitos tóxicos aos organismos cultivados. Em comparação com outros crustáceos cultivados, *N. davidi* se mostrou menos tolerante a ambos os compostos nitrogenados. As brânquias são órgãos que indicam o efeito deletério de agentes estressores contidos no meio aquático.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, D.A.; CHIPPENDALE, D.; KNIGHT, A.W.; COLT, J.E. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Bull., v.154, n.1, p.15-31, 1978. <https://doi.org/10.2307/1540771>
- ARMSTRONG, D.A.; STEPHENSON, M.J.; KNIGHT, A.W. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, v.9, p.39-46, 1976. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90046-6)
- AUGUSTO, A.S.; GREENE, L.J.; LAURE, H.; MCNAMARA, J.C. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Crustacea, Decapoda). J. Crustac. Biol., v.27, p. 626-634, 2007. <https://doi.org/10.1651/S-2796.1>
- BALIÑA, S.; TEMPERONI, B.; LÓPEZ GRECO, L.S.; TROPEA, C. Losing reproduction: Effect of high temperature on female biochemical composition and egg quality in a freshwater crustacean with direct development, the red cherry shrimp, *Neocaridina davidi* (Decapoda, Atyidae). Biol. Bull., v.234, p.139–151, 2018. <https://doi.org/10.1086/698266>
- BALLESTER, E.L.C.; MARZAROTTO, S.A.; CASTRO, C.S.; FROZZA, A.; PASTORE, I.; ABREU, P.C. Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. Aquacult. Res., v.48, n.9, p.1–8, 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13296>

- BARBIER, C. Crevettes d'eau douce en aquariophilie: exemple de maintenance de la *Neocaridina heteropoda* pour les debutants. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire. Toulouse: l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, France, 18-80, 2010.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V.; MELO, C.B.; HENRIQUES, M.B. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquac. Res.*, v.47, n.4, p.1260–1268, 2016. <https://doi.org/10.1111/are.12583>
- BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. A Handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society: Baton Rouge, La, 1998.
- BELLI, N.M.; FALEIROS, R.O.; FIRMINO, K.C.S.; MASUI, D.; LEONE, F.A.; MCNAMARA, J.C.; FURRIEL, R. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.152, p.431–439, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.017>
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25–34, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- BOUVIER, E.L. Crevettes de la famille des Atyidés: Espèces qui font partie des collections du Muséum d'histoire naturelle. *Bull. Mus. natl. hist. nat.*, v.10, p.129–136, 1904.
- BRAZÃO, C.C.; KRACIZY, R.O.; DUTRA, F.M.; OLIVEIRA, A.P.; DA SILVA, R.I.; BALLESTER, E.L.C. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquaculture.*, v.533, n.25, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736204>
- BROOKS, G.T. Chlorinated insecticides. Vol. II. Biological and environmental Aspect. CRC Press Inc., Ohio, 1974.
- CAI, Y.A. Revision of the genus *Neocaridina* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Acta Zootaxonomica Sin.*, v.21, p.129–160, 1996.
- CAMERON, J.N. Effects of inhibitors on blood acid–base status, NaCl fluxes, and trans-gill potential in freshwater blue crabs *Callinectes sapidus*. *J. Comp. Physiol.*, v.133, p.137–141, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF00691469>
- CAMERON, J.N.; BATTERTON, C.V. Studies of ammonia in the rainbow trout: physicochemical parameters, acid base behaviour and respiratory clearance. *J. Exp. Biol.*, v.105, n.1, p.107–125, 2004. <https://doi.org/10.1242/jeb.105.1.107>
- CARVALHO-NETA, R.N.F.; MOTA ANDRADE, T.S.O.; OLIVEIRA, S.R.S.; TORRES, A.R.; CARDOSO, W.S.; SANTOS, D.M.S.; BATISTA, W.S.; SERRA, I.M.R.; BRITO, N.M. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v.26, n.16, p.15884–15893, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04849-0>
- CAVALLI, R.O.; BERGHE, E.V.; LAVENS, P.; THUY, N.T.; WILLE, M.; SORGELOOS, P. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v.125, n.3, p.333–343, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00113-9)
- CAVALLI, R.O.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture*, v.179, n.1-4, p.387-402, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00173-8)
- CERVANTES, F.J. Environmental technologies to treat nitrogen pollution. (second ed.), IWA Publishing, London and New York, 2009.
- CHEN, J.C.; CHEN, K.J.; LIAO, J.M. Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, v.77, p.329-336, 1989. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90217-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90217-2)
- CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. Haemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to urotelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.106, n.3, p.733–737, 1993. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90234-C](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90234-C)

- CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. Accumulation of urea in the haemolymph and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.110, n.1, p.1–6, 1995. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(94\)00084-N](https://doi.org/10.1016/0742-8413(94)00084-N).
- CHEN, J.C.; KUO, Y.Z. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture*, v.104, p.249–260, 1992. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90207-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90207-2)
- CHEN, J.C.; LAI, S.H. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.102, n.1, p.129–133, 1992. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90054-B](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90054-B)
- CHEN, J.C.; SHEU, T.S. Effect of ammonia at different pH levels on larval *Penaeus monodon*. *J. Fish. Soc.*, v.17, n.1, p.59–63, 1990. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90283-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90283-6)
- CHEN, S.; LING, J.; BLANCHETON, J.P. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquac. Eng.*, v.34, p.179–197, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.004>
- CHENG, S.Y.; CHEN, J.C. Effects of nitrite exposure on hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *Penaeus japonicus*. *Aquat. Toxicol.*, v.44, p.129–139, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00064-2)
- CHITHRA, C.; DEVARAJ, H. Purification and characterisation of a 48kDa protein involved in the molting cycle of *Penaeus monodon*. *Food Chem.*, v.134, n.1, p.15–20, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.082>
- COSTA, P.M.; CARREIRA, S.; COSTA, M.H.; CAEIRO, S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat. Toxicol.*, v.126, p.442–454, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.013>
- DUTRA, F.M.; FORNECK, S.C.; BRAZÃO, C.C.; FREIRE, C.A.; BALLESTER, E.L.C. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture*, v.453, p.104–109, 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.038>.
- DUTRA, F.M.; FREIRE, C.A.; SANTOS, A.M.V.; FORNECK, S.C.; BRAZÃO, C.C.; BALLESTER, E.L.C. Acute toxicity of nitrite to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.97, n.5, p.619–625, 2016b. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1932-2>.
- DUTRA, F.M.; RÖNNAU, M.; SPONCHIADO, D.; FORNECK, S.C.; FREIRE, C.A.; BALLESTER, E.L.C. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquat. Toxicol.*, v.187, p.115–123, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.003>
- DUTRA, F.M.; JUVENAL, J.R.; FORNECK, S.C.; BRAZÃO, C.C.; BALLESTER, E.L.C. Gill and haematological alterations in *Macrobrachium amazonicum* adults in acute exposure to ammonia and nitrite isolated and combined. *Aqua. Fish Fish.*, v.2, p.414–424, 2022. <https://doi.org/10.1002/aff2.69>
- EPIFANIO, C.E.; SRNA, R.F. Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, v.3, p.241–246, 1975. <https://doi.org/10.1007/BF00390928>
- ESTEVEZ, F.A. Fundamentos da limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 602p, 1998.
- FIGUEROA-LUCERO, G.; HERNÁNDEZ-RUBIO, M.C.; GUTIÉRREZ-LADRÓN, G. M.J. Acute toxicity of ammonia on *Macrobrachium tenellum* (Smith) larvae. *Rev. Int. de Contam. Ambient.*, v.28, n.2, p.145–150, 2012.
- FREIRE, C.A.; ONKEN, H.; McNAMARA, J.C. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, v.151, n.3, p.272–304, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.008>
- GARÇON, D.P.; MASUI, D.C.; MANTELATTO, F.L.; FURRIEL, R.P.; McNAMARA, J.C.; LEONE, F.A. Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda,

- Brachyura). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, v.154, n.1, p.44–55, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.624>
- GOMES JR, R.S.; LIMA, J.P.V.; CAVALLI, R.O.; CORREIA, E.S. Acute toxicity of ammonia and nitrite to painted river prawn, *Macrobrachium carcinus*, larvae. *J. World Aquac. Soc.*, v.47, n.2, p.239–247, 2016. <https://doi.org/10.1111/jwas.12258>
- GONZÁLEZ-VERA, C.; BROWN, J.H. Effects of alkalinity and total hardness on growth and survival of postlarvae freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Aquaculture*, v.473, p.521–527, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.016>
- GROSS, A.; ABUTBUL, S.; ZILBERG, D. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *J. World Aquacult. Soc.*, v.35, n.3, p.315–321, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00095.x>
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.12, p.714–719, 1977. <https://doi.org/10.1021/es60130a004>
- HARRIS, R.R.; COLEY, S. The effect of nitrite on chloride regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana (Crustacea: Decapoda). *J. Comp. Physiol.*, v.161, p.199–206, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00262884>
- HARRIS, R.R.; COLEY, S.; COLLINS, S.; MCCABE, R. Ammonia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J. Comp. Physiol.*, v.171, p.681–693, 2001. <https://doi.org/10.1007/s003600100219>
- HARTLEY, G.S.; GRAHAM-BRYCE, I.J. Physical principles of pesticide behaviour. The dynamic of applied pesticides in the local environment in relation to biological responses. v. 2. Academic Press Inc., London, 1980.
- HENRY, R.P.; CAMERON, J.N. Acid–base balance in *Callinectes sapidus* during acclimation from high to low salinity. *J. Exp. Biol.*, v.101, p.255–264, 1982. <https://doi.org/10.1242/jeb.101.1.255>
- HENRY R.P. Multiple functions of gill carbonic anhydrase. *J. Exp. Zool.*, v.248, p.19–24, 1988.
- HENRY, R.P.; CAMERON, J.N. The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation, and acid–base balance in the aquatic crab *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Biol.*, v.103, p.205–223, 1983. <https://doi.org/10.1242/jeb.103.1.205>
- HENRY, R.P.; GEHNRICH, S.; WEIHRAUCH, D.; TOWLE, D.W. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.136, p.243–258, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00113-2)
- 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. *Front. Physiol.*, v.3, p.1–33, 2012. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.0043>
- HUNTER, D.A.; UGLOW, R.F. Moulting stage-dependent variability of haemolymph ammonia and total protein levels of *Crangon crangon* (L.) (Crustacea, Decapoda). *Ophelia*, v.37, n.1, p.41–50, 1993. <https://doi.org/10.1080/00785326.1993.10430376>
- JAMES, M.O. Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environ. Health Perspect.*, v.71, p.97–103, 1987. <https://doi.org/10.1289/ehp.877197>
- JENSEN, F.B. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquat. Toxicol.*, v.34, p.95–104, 1996. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00030-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00030-8)
- JESUS, W.B.; OLIVEIRA, S.S.S.; ANDRADE, T.S.O.M.; SOUSA, J.B.M.; PINHEIRO-SOUSA, D.B.; SANTOS, D.M.S.; CARDOSO, W.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biological responses in gills and hepatopancreas of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) as indicative of environmental contamination in mangrove areas in Maranhão State, Brazil. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, v.48, n.2, p.226–236, 2020. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue2-fulltext-2374>

- KLERKS, P.L. Acclimation to Contaminants by the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio*: Individual Contaminants vs. Mixtures. *Ecotoxicology*, v.8, p.277–286, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1008929215781>
- LIN, H.P.; THUET, P.; TRILLES, J.P.; MOUNET-GUILLAUME, R.; CHARMANTIER, G. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.*, v. 117, p. 591–598, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00349770>
- MAHARAJAN, A.; NARAYANASAMY, Y.; GANAPIRIYA, V.; SHANMUGAVEL, K. Histological alterations of a combination of chlorpyrifos and cypermethrin (Nurocombi) insecticide freshwater water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). *J. Basic Appl. Zool.*, v.72, p.104–112, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.08.002>
- MALLASEN, M.; VALENTI, W.C. Effect of nitrite on larval development of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v.261, p.1292–1298, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.048>
- MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and their irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.42, p.630–648, 1985. <https://doi.org/10.1139/f85-083>
- MASUI, D.C.; FURRIEL, R.P.; SILVA, E.C.; MANTELATTO, F.L.; McNAMARA, J.C.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H.M.; FONTES, C.F.; LEONE, F.A. Gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.37, n.12, p.2521–2535, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.004>
- MATTSON, M.P.; SPAZIANI, E. 5-Hydroxytryptamine mediates release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. *Biol. Bull.*, v. 169, p. 246–255, 1985.
- McNAMARA, J.C.; TORRES, A.H. Ultracytochemical location of Na⁺/K⁺-ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Zool.*, v.284, p.617–628, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991101\)284:6<617::AID-JEZ3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991101)284:6<617::AID-JEZ3>3.0.CO;2-V)
- MITCHELL, R.T.; HENRY, R.P. Carbonic anhydrase induction in euryhaline crustaceans is rate-limited at the post-transcriptional level. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.169, p.15–23, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.004>
- MONTAGNA, M.C.; COLLINS, P.A. Toxicity of glyphosate upon the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus*. *Nauplius*, v.13, n.2, p.149–157, 2005.
- MUGNIER, C.; JUSTOU, C. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.309, n.1, p.35–46, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.008>
- MUGNIER, C.; ZIPPER, E.; GOARANT, C.; LEMONNIER, H. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*, v.274, p.398–407, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.033>
- NEGRO, C.L. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills, and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.113, p.87–94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.025>
- NEGRO L.E.; MONTAGNA, M.; COLLINS, P. Freshwater Decapods and Pesticides: An Unavoidable Relation in the Modern World, in: Stoytchera, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World: Risks and Benefits*. InTech, Croatia, pp. 560, 2011.
- NEW, M.B. Farming freshwater prawns: A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *FAO Fisheries Technical Paper*, n.428. 212p, 2002.
- NOGA, E.J. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Mosby-Year Book, St Louis, 1996.
- OSTRENSKY, A.; W. WASIELESKY. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967). *Aquaculture*, v.132, p.339–347, 1995. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00343-M](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00343-M)
- PARRY, G. Excretion, In: *The physiology of Crustacea, Volume I, Metabolism and Growth*, Waterman, TH (ed.), (pp. 341–366), Academic Press, New York, 1960.

- PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. B. Inst. Pesca, v.31, n.1, p.81–88, 2005.
- RAMÍREZ-ROCHÍN, J.; FRÍAS-ESPERICUETA, M.G.; FIERRO-SAÑUDO, J.F.; ALARCÓN-SILVAS, S.G.; FREGOSO-LÓPEZ, M.G.; PÁEZ-OSUNA, F. Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. Aquac. Res., v.48, p.2337–2343, 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13069>.
- ROMANO, N.; ZENG, C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. Aquaculture, v. 266, p. 246–254, 2007. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.035>.
- ROMANO, N.; ZENG, C. Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. Comp. Biochem. Physiol., v.151, p.222–228, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.011>
- 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. Rev. Fish. Sci., v.21, p.1–21, 2013. <http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>.
- SAMPAIO C.M.S.; SILVA, R.R.; SANTOS, J.A.; SALES, S.P. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). Braz. J. Biol., v.67, n.3, p.551–559, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000300022>
- SANTOS-SILVA, M.J. DOS; COSTA, F.F.B.; LEME, F.P.; TAKATA, R.; COSTA, D.C.; MATTIOLI, C.C.; LUZ, R.K.; MIRANDA-FILHO, K.C. Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. Sci. Total Environ., v.616–617, p.1566–1575, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.157>
- SATHAPONDECHA, P.; PANYIM, S.; UDOMKIT, A. Molecular characterization of a cDNA encoding red pigment-concentrating hormone in black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Implication of its function in molt and osmoregulation. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol., v.175, p.124–130, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.06.001>
- SCHMIDT-NIELSEN, K. Animal Physiology, Adaptation and Environment (fifth edition), Cambridge University Press, ISBN13: 9780521570985, New York, 1997.
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations. Water Res., v.5, p.245–266, 1971. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)
- TIMMONS, M.B.; EBELING, J.M. Recirculating aquaculture. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, New York, USA, 2007.
- TIMMONS, M.B.; EBELING, J.M.; WHEATON, F.W.; SUMMERFELT, S.T.; VINCI, B.J. Recirculating Aquaculture System, 2 nd Ed. Ithaca, Cayuga Aquaculture Ventures, 769 p, 2002.
- TOMÁS, A.L.; SGANGA, D.E.; BATTISTA, A.; GRECO, L.S.L. Body coloration, carotenoid content, spermatophore quality and biochemical parameters by effect of temperature in the caridean shrimp *Neocaridina davidi* (Atyidae). Acta Zool., v.102, n.3, p.297–309, 2020. <https://doi.org/10.1111/azo.12336>
- TOWLE, D.W. Role of Na^+K^+ -ATPase in ion regulation by marine and estuarine animals. Mar. Biol., v.2, n.2, p.107–122, 1981.
- TOWLE, D.W.; KAYS, W.T. Basolateral localization of Na^+K^+ -ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. J. Exp. Zool., v.239, p.311–318, 1986. <https://doi.org/10.1002/jez.1402390302>
- TROPEA, C.; STUMPF, L.; LÓPEZ GRECO, L.S. Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). PLoS One, v.10, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119468>

- VAZQUEZ, N.D.; DELEVATI-COLPO, K.; SGANGA, D.E.; LÓPEZ-GRECO, L.S. Density and gender segregation effects in the culture of the caridean ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* Bouvier, 1904 (Caridea: Atyidae). *J. Crust. Biol.*, v.37, p.367–373, 2017. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/rux051>
- WAJSBROT, N.; GASITH, A.; DIAMANT, A.; POPPER, D.M. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *J. Fish Biol.*, v.42, p.321–328, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00336.x>
- WALKER, A.N.; GOLDEN, R.; HORST, M.N. Morphologic effects of in vivo acute exposure to the pesticide methoprene on the hepatopancreas of a nontarget organism, *Homarus americanus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.73, p.1867–1874, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.013>
- WANG, W.; WANG, H.; YU, C.; JIANG, Z. Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae. *Chem. Speciat. Bioavailab.*, v.27, n.4, p.147–155, 2015. <https://doi.org/10.1080/09542299.2015.1113389>
- WANG, W.N.; WANG, A.L.; ZHANG, Y.J.; LI, Z.H.; WANG, J.X.; SUN, R.Y. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, v.232, n.1–4, p.679–686, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.018>
- WATSON, S.W.; BOCK, E.; HARMS, H.; KOOPS, H-P; HOOPER, A.B. Nitrifying bacteria. In: Staley J. T., Bryant M. P., Pfennig N., Holt J. G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v.3. Baltimore, Williams and Wilkins. p.1808–1834, 1989.
- WEIHRAUCH, D.; BECKER, W.; POSTEL, U.; LUCK-KOPP, S.; SIEBERS, D. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol.*, v.169, p.25–37, 1999. <https://doi.org/10.1007/s003600050190>
- WEIHRAUCH, D.; MORRIS, S.; TOWLE, D. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.*, v.207, p.4491–4504, 2004. <https://doi.org/10.1242/jeb.01308>
- WEIHRAUCH, D.; MCNAMARA, J.C.; TOWLE, D.W.; ONKEN, H. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *J. Exp. Biol.*, v.207, p.4623–4631, 2004. <https://doi.org/10.1242/jeb.01333>
- WHEATON, F.W.; HOCHHEIMER, J.N.; KAISER, G.E.; KRONES, M.J.; LIBEY, G.S.; EASTER, C.C. Nitrification principles. In: Timmons, M.B., Losordo, T.M. (Eds.), *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management*. Elsevier, Amsterdam, p.101-126, 1994.
- WILDGOOSE, W.H. *BSAVA manual of ornamental fish*. (2ª edição). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, UK, (3), 2001.
- USEPA (2002) *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*, 5th edn. US Environmental Protection Agency, Washington DC EPA-812-R02-012
- XIAN, J.-A.; WANG, A.-L.; CHEN, X.-D.; GOU, N.-N.; MIAO, Y.-T.; LIAO, S.-A.; YE, C.-X. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Aquaculture*, v.317, n.1–4, p.240–244, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.026>
- ZHANG, Y.; YE, C.; WANG, A.; ZHU, X.; CHEN, C.; XIAN, J.; SUN, Z. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. *Ecotoxicology*, v.24, n.7–8, p.1601–1610, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1477-x>
- ZIN, K.Y.; CHU, C.J. Acute toxicity of ammonia to *Penaeus japonicus* Bate juveniles. *Aquac. Fishery Manag.*, v.22, p.259–263, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1991.tb00515.x>
- ZITKO, V. Metabolism and distribution by aquatic animals, In: *The handbook of environmental chemistry*. v. 2, Part A, Hutzinger O. (ed.), (pp. 221-229), Springer, ISBN: 3-540-09689-2, Heidelberg, German, 1980.

ZOU, E.; STUEBEN, B. Acute exposure to naphthalene reduces oxyregulating capacity of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*, subjected to progressive hypoxia. Mar. Biol., v.149, p.1411–1415, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0294-4>

ARTIGO 3 - Tolerância de juvenis de camarões *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Caridea, Atyidae) e girinos de rã-touro *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) expostos a eteramina

RESUMO

O impacto das ações antropogênicas no ambiente aquático é amplamente conhecido, sendo que atualmente eventos envolvendo acidentes com a inserção de compostos sintéticos em ambientes aquáticos têm sido cada vez mais expressivo e frequente. O uso da água para atividades aquícolas preza pela sua qualidade. Muitas comunidades ribeirinhas dependem desse recurso para criar organismos aquáticos mantidos pelos mananciais. A eteramina é um composto nitrogenado muito empregado em atividades mineradoras, no entanto, pouco se sabe sobre seu efeito sobre a biota aquática. Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar a CL₅₀ e as alterações nas brânquias de juvenis do camarão *Neocaridina davidi* e girinos de *Aquarana catesbeiana* submetidos a diferentes concentrações de eteramina. Juvenis de *N. davidi* e girinos de *A. catesbeiana* foram expostos à eteramina em uma série de testes de toxicidade aguda. Para os camarões, os valores de CL₅₀-96h foram estimados em 0,54 mg.L⁻¹, com nível de segurança calculado em 0,05 mg.L⁻¹. Para os girinos, os valores de CL₅₀-96h foram estimados em 5,11 mg.L⁻¹, com nível de segurança de 0,51 mg.L⁻¹. As brânquias são órgãos multifuncionais que estão em contato direto com o ambiente, possibilitando, portanto, o contato com xenobióticos. No estudo histopatológico, as lesões mais importantes encontradas nas brânquias dos camarões foram espessamento do epitélio lamelar, tumefação celular, infiltração hemocítica, fusão lamelar, hiperplasia e descamação da cutícula lamelar, necrose e edema, e para os girinos foram hipertrofia das células, descolamento do epitélio, desorganização, ruptura do epitélio lamelar, fusões de tufos branquiais e necrose celular. As mortalidades observadas nos testes de toxicidade aguda e as alterações causadas à estrutura branquial mostram que a eteramina afetou diretamente os camarões e os girinos, se mostrando extremamente tóxica aos organismos aquáticos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; CL₅₀; “red cherry”; mineração.

ABSTRACT

The impact of anthropogenic actions on the aquatic environment is widely known, and currently events involving accidents with the insertion of synthetic compounds in aquatic environments have been increasingly expressive and frequent. The use of water for aquaculture activities values its quality. Many riverside communities depend on this resource to create aquatic organisms maintained by the springs. Etheramine is a nitrogenous compound widely used in mining activities, however, little is known about its effect on aquatic biota. Therefore, the objective of this work was to verify the LC_{50} and changes in the gills of juvenile shrimp *Neocaridina davidi* and tadpoles of *Aquarana catesbeiana* submitted to different concentrations of etheramine. Juveniles of *N. davidi* and tadpoles of *A. catesbeiana* were exposed to etheramine in a series of acute toxicity tests. For shrimp, LC_{50-96h} values were estimated at 0.54 mg.L^{-1} , with a safety level calculated at 0.05 mg.L^{-1} . For tadpoles, LC_{50-96h} values were estimated at 5.11 mg.L^{-1} , with a safety level of 0.51 mg.L^{-1} . Gills are multifunctional organs that are in direct contact with the environment, thus enabling contact with xenobiotics. In the histopathological study, the most important lesions found in the gills of shrimp were thickening of the lamellar epithelium, cell swelling, hemocytic infiltration, lamellar fusion, hyperplasia and desquamation of the lamellar cuticle, necrosis and edema, and for tadpoles they were cell hypertrophy, detachment of the epithelium, disorganization, rupture of the lamellar epithelium, fusions of gill tufts and cell necrosis. The mortalities observed in the acute toxicity tests and the changes caused to the gill structure show that etheramine directly affected shrimp and tadpoles, proving to be extremely toxic to aquatic organisms.

Keywords: Ecotoxicology; LC_{50} ; “red cherry”; mining.

1. INTRODUÇÃO

O impacto negativo das ações antropogênicas no ambiente aquático é amplamente conhecido (Derraik, 2002; Murphy et al., 2012). Atualmente notícias envolvendo acidentes com a inserção de compostos sintéticos em ambientes aquáticos têm sido comuns, eventos catastróficos como rompimentos recentes de barragens de rejeito de mineração, poluição causada por esgotos, uso de praguicidas em locais próximos a mananciais, etc, são exemplos notórios. No caso da atividade mineradora, um dos grandes problemas do rompimento de barragens de rejeitos é a disposição ao curso d'água do composto químico denominado eteramina, que é o coletor usado no processo de beneficiamento do minério de ferro (Pires et al., 2003), que tem potencial de interferir na comunidade aquática devido à sua elevada toxicidade. O seu monitoramento no meio ambiente deve receber mais atenção devido aos últimos acidentes envolvendo rompimentos de barragens. Nesse contexto, esses eventos tornaram-se alvos de pesquisa com relação ao impacto causado na biota aquática.

Os anfíbios contribuem amplamente para os serviços ecossistêmicos, desempenhando papel importante no controle de surtos de pragas; na dinâmica da cadeia alimentar, para a ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos e terrestres (Pinto-Vidal et al., 2022) e alguns participando da cadeia de fornecimento da alimentação humana como a rã-touro (*Aquarana catesbeiana*, Shaw, 1802). Apesar de terem uma elevada relevância para o ecossistema e para as sociedades humanas, os anfíbios têm sofrido declínio ao longo das últimas décadas (Alroy, 2015). As principais ameaças à sobrevivência dos anfíbios são representadas pela destruição de seus habitats, doenças e poluição (Heatwole, 2013; Alroy, 2015; Salla et al., 2015).

Por estarem em contato direto com a água, os anfíbios estão susceptíveis à exposição de xenobióticos ali presentes. Os poluentes uma vez no ambiente pode atuar de forma aditiva, isolada ou em sinergia com outros xenobióticos. Eles têm potencial para causar alterações em nível celular, se expandindo para níveis fisiológicos, ecológicos e populacionais (Collins, 2010). O uso de biomarcadores morfológicos faz-se necessário para entender o impacto de poluentes na fisiologia geral dos organismos (Abdalla et al., 2013; Dal-Medico et al., 2014; Rissoli et al., 2016; Salla et al., 2016).

A alta suscetibilidade a poluentes devido à sua pele permeável tornam os anfíbios indicadores de qualidade ambiental (Relyea, 2003). Além disso, seu ciclo de vida duplo (aquático e terrestre) aumenta a probabilidade de exposição a contaminantes ambientais (Murphy et al., 2000). Em regiões tropicais como na América do Sul, especialmente no Brasil, dados de Alroy (2015) indicam que várias espécies de anfíbios (anuros) encontram-se com alguma ameaça de extinção.

Os crustáceos também contribuem com ecologicamente, participando da dinâmica da cadeia alimentar, na ciclagem de nutrientes, e também ganhando destaque na aquicultura ornamental. Crustáceos como os camarões “red cherry” da espécie *Neocaridina davidi* têm sido comumente comercializados como espécie ornamental no mundo devido a sua beleza e facilidade de manutenção em cativeiro. Originalmente, essa é uma espécie de camarão de água doce de ciclo de vida curto, de pequeno tamanho que habita riachos e lagos na Ásia (Cai, 1996).

Assim, considerando as diversas fontes potenciais de contaminação, o declínio das espécies de anfíbios nos últimos anos, o contexto dos desastres ambientais envolvendo rompimento de barragens de mineração, e os problemas de intoxicação por compostos nitrogenados em condições de cativeiro, o anfíbio *A. catesbeiana* e o crustáceo *N. davidi*, foram os organismos escolhidos no presente estudo para entender a atuação da eteramina por meio do estudo toxicológico agudo e tecidual das brânquias.

Além da função principal de trocas gasosas, a brânquia também atua na alimentação por filtração, excreção de nitrogênio amoniacal, íono e osmorregulação (Evans e Nunez, 2015; Koppang et al., 2015). As relações entre as características estruturais, as funções multifisiológicas e a adaptabilidade das brânquias às mudanças ambientais têm atraído atenção para uso deste órgão vital em estudos de biomonitoramento da qualidade da água no ambiente natural ou em cativeiro (Chen et al., 2012).

O efeito tóxico agudo da eteramina permanece desconhecido para a maioria dos organismos aquáticos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo: estimar os efeitos gerados pela exposição aguda da eteramina em girinos de rã-touro *A. catesbeiana* e em juvenis de camarão *N. davidi*, por meio da estimativa da concentração letal mediana (CL₅₀), assim como os seus respectivos níveis de segurança e efeitos causados no tecido branquial dos organismos testados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com os girinos de rã-touro foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de acordo com o protocolo de nº 34/2022. Foi realizado no setor de maricultura do laboratório de Aquacultura – LAQUA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFMG. A metodologia utilizada na avaliação da concentração letal mediana (CL₅₀-96 h) foi baseada no manual da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 2002) e nas diretrizes da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM, 2014).

2.1. Instalações e Condições Experimentais

Os girinos utilizados no experimento foram obtidos de reprodutores do setor de Ranicultura do LAQUA/UFMG. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas três vezes ao dia (8:00, 12:00 e 16:00 h) até o início dos testes de toxicidade, quando os animais estavam no estágio de desenvolvimento 25 de Gosner (1960). Os girinos foram alimentados com ração comercial para peixes carnívoros da marca Guabi ® (44% proteína bruta, 8% extrato etéreo, 4% fibra bruta, 15% matéria mineral) com granulometria de 2 a 4 mm. Os peletes da ração foram triturados em um moinho de discos (Inbramaq ®) para obtenção de uma fração farelada. Antes da realização do experimento, os girinos foram mantidos em piscinas plásticas de 400 L em uma densidade aproximada de 2,5 girinos/L. As piscinas foram abastecidas com água de poço artesiano, mantidas à temperatura de $25 \pm 1,80$ °C, e fotoperíodo de 14 h de luz.

Os camarões utilizados no experimento foram obtidos do setor de Ornamentais do LAQUA/UFMG. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (8:00 e 16:00h) com ração comercial para invertebrados da marca Alcon ® (36% proteína bruta, 3,5% extrato etéreo, 7,5% fibra bruta, 10% matéria mineral). Antes da realização do experimento, os camarões foram mantidos em aquários de 20 L em uma densidade aproximada de 7 camarões/L. Os aquários foram abastecidos com água de poço artesiano, mantidos à temperatura de $25 \pm 1,45$ °C, e fotoperíodo de 12 h de luz.

Os animais foram pesados em balança analítica (Bel Engineering) e foi mensurado o comprimento total (extremidade anterior do focinho até a extremidade distal da cauda) dos girinos e dos camarões (distância entre a margem distal do rostrum até a extremidade distal do telson) usando paquímetro. A definição das concentrações de amônia e nitrito a serem testadas se deu por meio de teste toxicológico agudo preliminar. Para o teste preliminar (96 h), três girinos de *A. catesbeiana* ($40,3 \pm 3,5$ mg; $1,9 \pm 0,3$ cm), e três juvenis de *N. davidi* ($19,22 \pm 1,03$ mg, $1,5 \pm 0,10$ cm), foram mantidos separadamente em béqueres de vidro (1 L), nas cinco concentrações testadas e um controle, sem réplica. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano, e os recipientes foram acondicionados em câmara de germinação BOD (SL-224) com controle de temperatura, sob aeração contínua e fotoperíodo de 12 L.

Para os bioensaios definitivos, os girinos de rã-touro ($43,1 \pm 2,5$ mg, $1,9 \pm 0,2$ cm) e os juvenis de *N. davidi* ($18,17 \pm 1,18$ mg, $1,52 \pm 0,19$ cm) foram mantidos em jejum por 24 h antes do experimento (Fig. 1). Os animais foram alocados em grupos de 10 animais com duas repetições por tratamento. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco concentrações de eteramina (2, 5, 8, 11 e 14 mg.L⁻¹) e um controle (0 mg.L⁻¹) para os girinos; e cinco concentrações de eteramina (0,1; 0,6; 1,1; 1,6 e 2,1 mg.L⁻¹) e um controle (0 mg.L⁻¹) para os camarões. Os níveis de eteramina foram obtidos a partir de soluções estoques de Flotigam EDA C 100%. Diariamente foram feitas renovações totais da solução testada, caracterizando um teste de toxicidade semi-estático.



Figura 1. A - Girino de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (1960). B – Camarão *N. davidi*.

Para avaliação da mortalidade, os animais foram observados a cada uma hora durante as 96 h. O critério para avaliação da mortalidade foi a ausência de qualquer tipo de movimento ou reação a estímulo mecânico, tocando os camarões e girinos com um

bastão de vidro. Todos os animais utilizados para as análises histológicas coletadas estavam em estado de morbidade.

2.2. Análise físico-química da água

Duas vezes ao dia foram registrados os dados de pH e temperatura de todas as unidades experimentais com pHmetro portátil (Hanna®, modelo HI 98130), e oxigênio dissolvido (OD) com sonda portátil (YSI 550A). As análises de alcalinidade e dureza foram realizadas pelo método titulométrico, e amônia e nitrito por espectrofotometria no Espectrofotômetro Biochrom Libra S22 (APHA, 1992), mensuradas a cada 24 h.

2.3. Estudo Histológico

Para o tratamento dos girinos foi utilizada a metodologia descrita por Luna (1968). Os órgãos foram fixados em líquido de bouin, por 8 h, e transferidos para álcool 70%. Posteriormente, foi feito o processamento histológico seguindo os processos de desidratação em séries crescentes de álcoois, diafanização em xilol, impregnação e inclusão do animal em parafina.

Para o tratamento dos camarões foi utilizada a metodologia descrita por Bell e Lightner (1998). Os animais foram fixados em líquido de Davidson por 24 h e transferidos para álcool 70%. Posteriormente, para a confecção das lâminas histológicas foi realizado o processamento seguindo os processos de desidratação em série crescente de álcoois, diafanização em xilol, impregnação e inclusão do animal em parafina.

As peças foram seccionadas em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M15) com cortes de 5 µm de espessura para montagem das lâminas e coradas em hematoxilina-eosina (HE). As preparações foram montadas com Entellan New, observadas e fotografadas em microscópio óptico (Nikon® eclipse SI) equipado com uma câmera (Prime cam intervision®) e visualizado no software PRIME CAM.

As alterações histopatológicas foram avaliadas de acordo com o método descrito por Bernet et al. (1999), para os girinos, e para os camarões foi utilizado o método de Bernet et al. (1999), adaptado para invertebrados conforme Costa et al. (2013).

O valor de pontuação (a) foi aplicado de acordo com o grau de distribuição e intensidade da lesão do órgão, onde: "0" = ausência; "1-2" = ocorrência leve; "3-4" =

ocorrência moderada e "5-6" = ocorrência acentuada. As alterações foram classificadas de acordo com o tipo de reação padrão (1-4), com um fator de importância (w) de acordo com o grau de reversibilidade, onde: 1 = alterações facilmente reversíveis; 2 = alterações moderadas, reversíveis com o término da exposição, e 3 = alterações irreversíveis. A partir das classificações foi calculado o Índice do Órgão (I_{org}) (Fig. 2)

$$I_{org.} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

Figura 2. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração). Fonte: Bernet et al. (1999).

2.4. Análise estatística e tratamento dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. As concentrações letais medianas (CL_{50}) e os intervalos de confiança (95%) foram estimados de acordo com os dados de mortalidade durante as 96 h de exposição, com o programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977) e o nível de segurança (NS) conforme descrito por Sprague (1971).

Todas as análises foram submetidas à avaliação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Bartlett) e cumprido os requisitos, posteriormente foi feito análise de regressão. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico R Studio Versão 1.2.5033.

3. RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as variáveis físico-químicas da água dos girinos de rã-touro.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão - d.v.) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos girinos de rã-touro a diferentes concentrações de eteramina.

Parâmetros de qualidade da água	Eteramina – Concentração Nominal					
	0	2	5	8	11	14
N-AT (mg.L ⁻¹) - Real	0,82 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,02
N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,27 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01
Temperatura (°C)	25,58 $\pm$ 0,03	25,70 $\pm$ 0,21	25,56 $\pm$ 0,01	25,78 $\pm$ 0,01	25,51 $\pm$ 0,06	25,55 $\pm$ 0,07
pH	7,76 $\pm$ 0,01	7,72 $\pm$ 0,03	7,75 $\pm$ 0,03	7,74 $\pm$ 0,01	7,74 $\pm$ 0,02	7,75 $\pm$ 0,03
OD (mg.L ⁻¹)*	5,94 $\pm$ 0,11	5,93 $\pm$ 0,33	5,91 $\pm$ 0,05	6,10 $\pm$ 0,15	5,88 $\pm$ 0,12	5,96 $\pm$ 0,10
OD (%)*	79,19 $\pm$ 0,24	78,42 $\pm$ 0,33	77,54 $\pm$ 0,25	78,21 $\pm$ 0,07	78,93 $\pm$ 0,47	79,17 $\pm$ 0,70
Alcalinidade	82,5 $\pm$ 0,71	84,5 $\pm$ 2,12	84,0 $\pm$ 2,83	83,0 $\pm$ 1,41	85,0 $\pm$ 1,41	84,0 $\pm$ 2,83
Dureza	64,0 $\pm$ 2,83	63,0 $\pm$ 1,41	63,5 $\pm$ 0,71	63,5 $\pm$ 0,70	63,5 $\pm$ 0,71	64,0 $\pm$ 2,82

* OD – oxigênio dissolvido, OD (%) – percentual de saturação de oxigênio

Na tabela 2 estão apresentadas as variáveis físico-químicas da água dos juvenis de *N. davidi*.

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão - d.v.) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de *N. davidi* a diferentes concentrações de eteramina.

Parâmetros de qualidade da água	Eteramina – Concentração Nominal					
	0	0.1	0.6	1.1	1.6	2.1
N-AT (mg.L ⁻¹) - Real	0,75 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,08
N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,24 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01
Temperatura (°C)	25,52 $\pm$ 0,05	25,54 $\pm$ 0,07	25,57 $\pm$ 0,03	25,56 $\pm$ 0,33	25,61 $\pm$ 0,26	25,70 $\pm$ 0,13
pH	7,75 $\pm$ 0,01	7,72 $\pm$ 0,03	7,77 $\pm$ 0,01	7,75 $\pm$ 0,04	7,75 $\pm$ 0,04	7,75 $\pm$ 0,03
OD (mg.L ⁻¹)*	5,80 $\pm$ 0,09	5,78 $\pm$ 0,01	5,82 $\pm$ 0,18	5,72 $\pm$ 0,16	5,80 $\pm$ 0,19	5,85 $\pm$ 0,05
OD (%)*	78,78 $\pm$ 0,05	78,19 $\pm$ 0,81	77,98 $\pm$ 0,13	78,80 $\pm$ 0,07	78,40 $\pm$ 0,28	78,46 $\pm$ 0,43
Alcalinidade	83,0 $\pm$ 1,41	83,0 $\pm$ 1,41	84,0 $\pm$ 2,83	86,0 $\pm$ 2,82	83,0 $\pm$ 1,41	86,0 $\pm$ 1,40
Dureza	66,2 $\pm$ 0,28	66,8 $\pm$ 1,13	65,0 $\pm$ 1,41	65,4 $\pm$ 1,98	64,0 $\pm$ 2,82	65,0 $\pm$ 1,41

* OD – oxigênio dissolvido, OD (%) – percentual de saturação de oxigênio

3.1. Sobrevivência e Concentração Letal Mediana - CL₅₀

Não foi observada mortalidade no grupo controle nos testes de toxicidade aguda para os animais testados (Fig. 3 e 4).

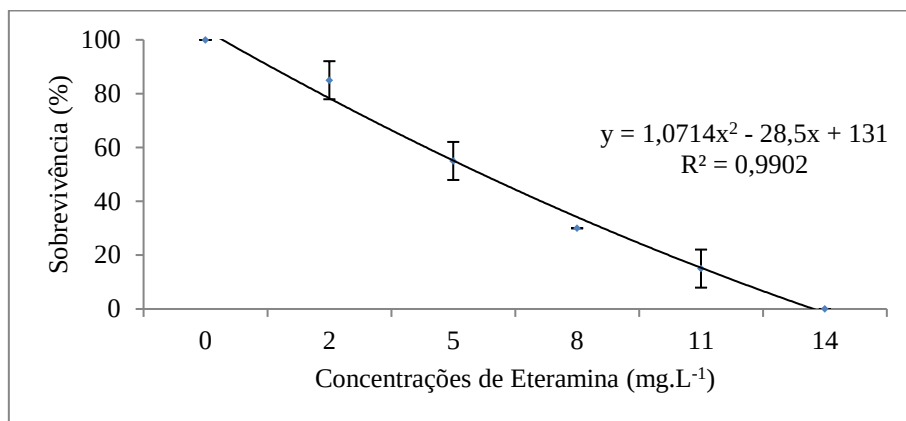


Figura 3. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de girinos de rã touro (*A. catesbeiana*) expostos a níveis crescentes de eteramina.

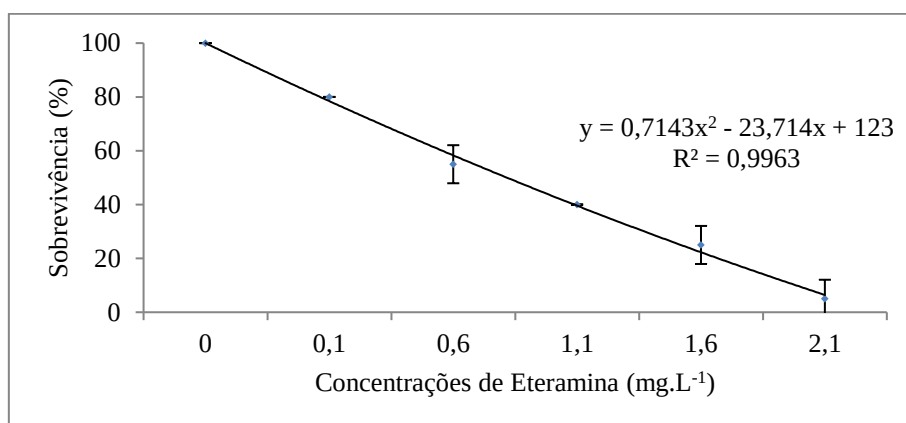


Figura 4. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de juvenis de *N. davidi* expostos a níveis crescentes de eteramina.

Foi possível observar o efeito da eteramina na sobrevivência dos animais já nas primeiras 48 h de exposição em todas as concentrações (Tab. 3).

Tabela 3. Valores das concentrações letais medianas (CL₅₀) e intervalos de confiança (IC) da eteramina estimados durante a exposição dos girinos de rã-touro e juvenis de *N. davidi* e o nível de segurança (NS) (mg.L⁻¹) em 96 h.

CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Tempo (h)				NS (mg.L ⁻¹)
	24	48	72	96	
<i>A. catesbeiana</i>	-	7,08 (5,89 - 8,50)	5,65 (4,33 - 7,36)	5,11 (3,89 - 6,71)	0,51
<i>N. davidi</i>	-	1,30 (0,95 - 1,79)	0,78 (0,59 - 1,03)	0,54 (0,37 - 0,80)	0,05

3.2. Biomarcador morfológico

No presente estudo, a histopatologia foi utilizada como ferramenta de detecção de respostas dos animais frente à exposição aguda à eteramina. O dano causado aos organismos, devido as alterações morfológicas, pode ser expresso pelo Índice de órgão (I_{org}) (Fig. 5 e 6). O I_{org} branquial aumentou quando os animais foram expostos às concentrações crescentes de eteramina, indicando que a exposição induz a ocorrência de alterações branquiais.

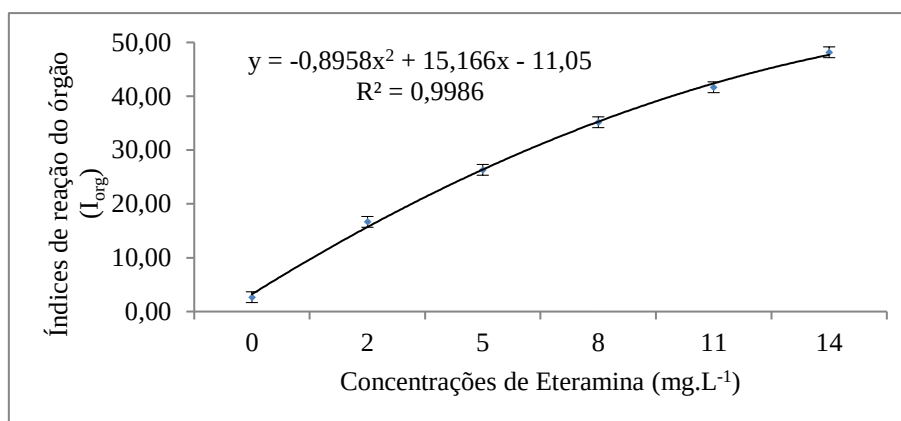


Figura 5. Valores médios e desvio padrão do índice de órgãos de girinos de rã touro (*A. catesbeiana*) expostos a níveis crescentes de eteramina.

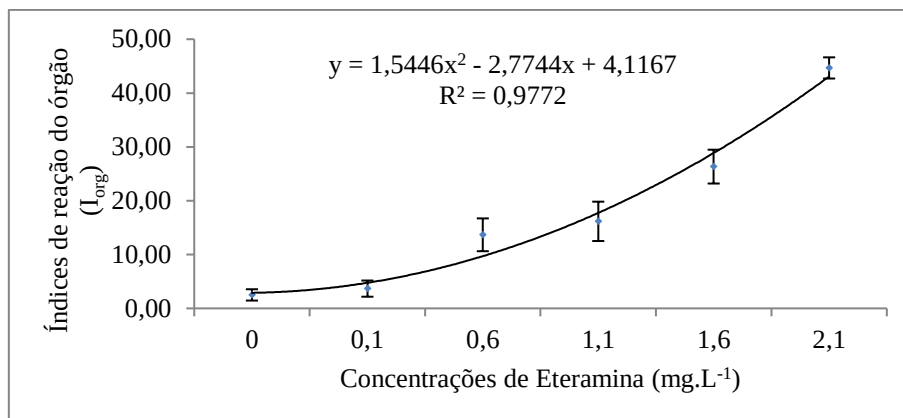


Figura 6. Valores médios e desvio padrão do índice de órgãos de juvenis de *N. davidi* expostos a níveis crescentes de eteramina.

As brânquias dos girinos no grupo controle apresentaram hiperplasia leve e desprendimento do epitélio respiratório (Fig. 7A). Essas alterações são comuns em indivíduos jovens, e pelas brânquias estarem em contato direto com a água, pequenas alterações são esperadas. Já nos animais expostos a eteramina, as alterações histopatológicas observadas foram: hiperplasia, hipertrofia, desprendimento do epitélio, desorganização, ruptura do epitélio lamelar, vasos congestionados, fusões de tufos branquiais e necrose. Entretanto, essas alterações foram mais frequentes, com a intensidade de moderada a severa, nas maiores concentrações (Fig. 7B-C), assim como mostra o índice de órgão (Fig. 3).

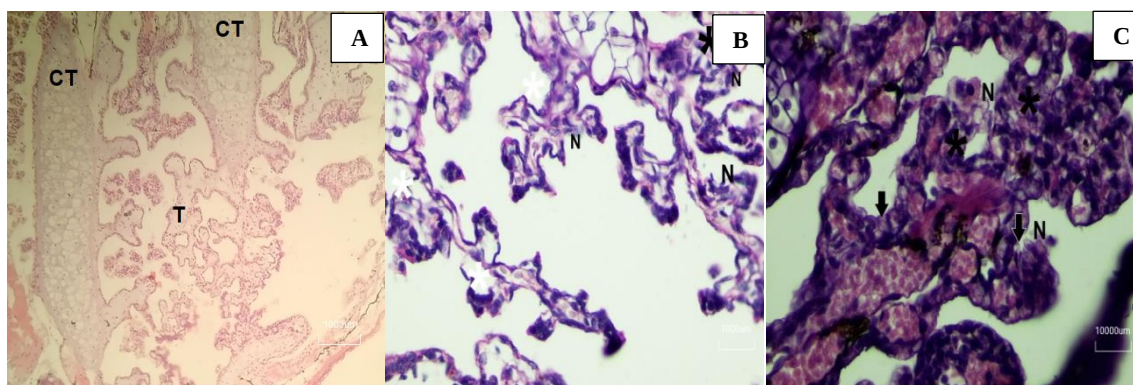


Figura 7. Fotomicrografias de girinos de rã-touro *A. catesbeiana* estágio 25 de Gosner (1960) expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, tufo branquial com ramificações (T), tecido cartilaginoso (CT) em aumento de 100x; B – Brânquias dos animais expostos a 2 mg.L⁻¹ de eteramina, fusão dos tufos branquiais (asterisco preto), necrose (N) e descolamento epitelial (asterisco branco) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 14 mg.L⁻¹ de eteramina, hiperplasia (seta preta), fusão dos tufos branquiais (asterisco preto) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.

As brânquias dos camarões no grupo controle apresentaram leve espessamento do epitélio lamelar e infiltrações hemocíticas (Fig. 8A). Essas alterações são comuns em indivíduos jovens, e pelas brânquias estarem em contato direto com a água, pequenas alterações são esperadas. Já nos animais expostos a eteramina, as alterações histopatológicas observadas foram: tumefação celular, fusão lamelar, espessamento do epitélio lamelar, hiperplasias, infiltrado hemocítico, desorganização, descamação da cutícula lamelar, edema e necrose. Entretanto, essas alterações foram mais frequentes, com a intensidade de moderada a severa, nas maiores concentrações (Fig. 8B-C), assim como mostra o índice de órgão (Fig. 3).

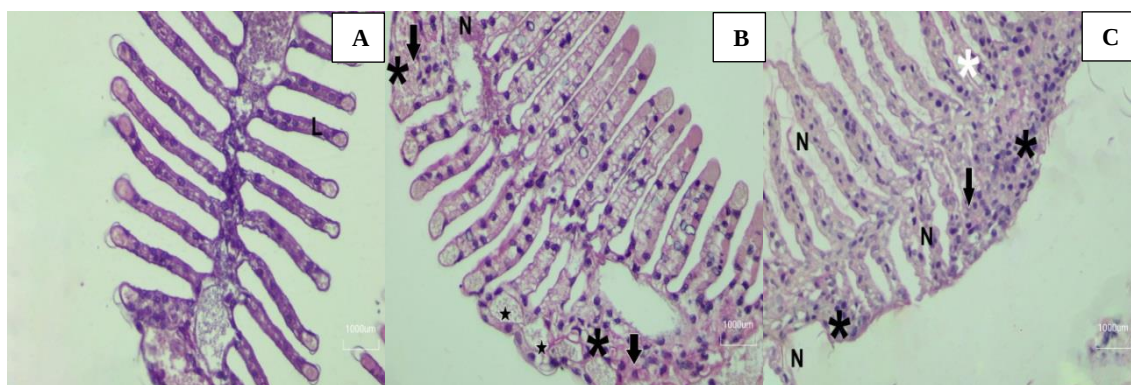


Figura 8. Fotomicrografias de juvenis de *N. davidi* expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A – Brânquias dos animais do grupo controle, lamelas secundárias (L) em aumento de 400x; B – Brânquias dos animais expostos a 0,6 mg.L⁻¹ de eteramina, fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), necrose (N), edema dos canais marginais (estrela preta) e hiperplasia (seta preta) em aumento de 400X; C – Brânquias dos animais expostos a 2,1 mg.L⁻¹ de eteramina, hiperplasia (seta preta), fusão das lamelas branquiais (asterisco preto), descolamento epitelial (asterisco branco) e necrose (N) em aumento de 400X. Coloração HE.

4. DISCUSSÃO

Com o crescimento populacional humano e consequente intensificação da atividade antrópica, a poluição química tem aumentado e prejudicado os ambientes terrestres e aquáticos, sendo que a maioria dos poluentes ambientais está ameaçando a saúde humana, mas também a integridade da biota e a função dos ecossistemas (Khattab et al., 2021).

Devido a conversão da eteramina em outros compostos nitrogenados, como nitrito e amônia (Scorsafava et al., 2010), faz-se o uso comparativo dos resultados encontrados no presente estudo com estes compostos, por serem substâncias que ganham destaque quando se fala em animais aquáticos devido ao seu potencial de intoxicação. Vale salientar que, os crustáceos são particularmente vulneráveis aos resíduos ricos em nitrogênio (Camargo et al., 2005), e por isso, inferimos que os mecanismos de intoxicação são similares para os compostos. Portanto, no presente trabalho, as comparações dos efeitos deletérios causados pela eteramina foram feitas utilizando comparações com compostos nitrogenados em diferentes espécies de peixes, crustáceos, e anfíbios, uma vez que atualmente, não há trabalhos semelhantes conduzidos com a substância e espécies utilizadas, fase de desenvolvimento e em condições experimentais similares ao do estudo.

Ainda há pouca informação sobre a toxicidade de aminas empregadas no processo de flotação, assim como seu comportamento, uma vez dispostas na barragem de rejeitos. Não existem normativas para as eteraminas, no entanto existem diretrizes enfatizando limites para algumas substâncias obtidas após seu processo de degradação. Na presença de agentes de nitrosação, as aminas podem ser convertidas em nitrosaminas (Greim et al., 1998) que são compostos carcinogênicos (Dutra et al., 2007). Nos Estados Unidos, existem padrões definidos pela Agência de Proteção Ambiental - USEPA (2002) para a concentração de certas nitrosaminas, onde o limite máximo de concentração de nitrosaminas presentes na água são: 0,00069; 0,0050 e 3,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para N-N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodipropilamina e N-nitrosodifenilamina, respectivamente. E para organismos aquáticos são: 3,0; 0,51 e 6,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para N-N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodipropilamina e N-nitrosodifenilamina, respectivamente. Valores abaixo dos que foram utilizados no presente estudo. O que só enfatiza os cuidados que devem ser tomados com a disposição e uso da eteramina visto a possibilidade de conversão em outros compostos tóxicos. Devido à toxicidade para os organismos aquáticos, a alta demanda química de oxigênio, propriedades corrosivas e alto custo, estudos com a possível remoção e reutilização de eteraminas são importantes (Gusmão et al., 2014).

Não existe no Brasil legislação específica sobre aminas em efluentes de mineração. No entanto, existe a Resolução CONAMA nº 430/11, que dispõe sobre as

condições e padrões de lançamento de efluentes, onde apresenta um valor de nitrogênio amoniacal de 20 mg.L⁻¹; e a Portaria MS nº 2.914/11, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, onde apresenta valor de 10; 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹ para nitrato, nitrito e nitrogênio amoniacal, respectivamente. Compostos que podem ser problemáticos também em ambientes de cultivo, assim como a substância teste do presente estudo.

Com relação a histologia, a brânquia é um órgão multifuncional vital uma vez que representa o local fundamental para as trocas gasosas, regulação de íons, excreção de produtos metabólicos e que se encontra em contato direto com o meio aquático circundante, sendo um órgão alvo para a exposição a contaminantes contidos no ambiente (Perry, 1997; Au, 2004; Wei e Yang, 2015). Em função dessas peculiaridades e também da sua alta permeabilidade, é particularmente importante o estudo da integridade das brânquias em biomonitoramentos e avaliações de impactos ambientais (Maharajan et al., 2015; Wei e Yang, 2015), por ser um importante biomarcador histopatológico devido à sua suscetibilidade ao aparecimento de lesões após exposição a substâncias químicas na água (Bernet et al., 1999; Au, 2004). Santos et al. (2021) enfatizam que o epitélio branquial é uma das principais superfícies de contato com o meio ambiente e constitui uma das primeiras linhas de defesa do organismo e, por isso, um dos primeiros órgãos a ser afetado. No entanto, os autores destacam que as lesões branquiais são pouco documentadas, principalmente quando se referem aos anfíbios.

Os anfíbios apresentam uma pele fina, altamente permeável e vascularizada (Wake e Vredenburg, 2008; Larsen e Ramløv, 2013), adaptação para maximizar a respiração cutânea e os mecanismos de equilíbrio osmótico (Heatwole e Wilkinson, 2009). No entanto, essa característica pode prejudicar esses animais deixando-os mais suscetíveis a xenobióticos devido à falta de uma barreira hidrofóbica e sua alta porosidade às moléculas de água (Van Meter et al., 2014). Na fase inicial de vida dos anfíbios, os girinos são ainda mais suscetíveis a contaminantes, pois nascem e se desenvolvem na água, possuem pele altamente permeável e sofrem complexas alterações morfofisiológicas (Shi, 2000), podendo absorver substâncias químicas também por meio das brânquias (Bueno-Guimarães et al., 2001).

Como as variáveis de qualidade de água não foram limitantes para os girinos e os camarões, as alterações nas brânquias observadas foram devido aos níveis de eteramina avaliados, que tiveram maior incidência com o aumento das concentrações. A maior concentração a que os camarões foram expostos equivale a menor concentração de exposição dos girinos, o que independentemente da tolerância, lesões similares estavam presentes, em escalas de acometimento diferentes. Edemas intersticiais; descamação, hiperplasia e hipertrofia epiteliais, e fusão lamelar são lesões que sugerem mecanismos de defesa (Erkmen e Kolankaya, 2000), dificultando o acesso do agente tóxico ao sangue, que pode interferir sobre as trocas gasosas (McDonald e Wood, 1993). Essas alterações podem simplesmente refletir uma adaptação fisiológica ao estresse (Mallatt, 1985).

Importante salientar que no presente estudo as variáveis limnológicas avaliadas permaneceram dentro da faixa recomendada para a produção de crustáceos (Vasquez et al., 1989; Timmons et al., 2002, Sampaio et al., 2007), e para os girinos de rã-touro (Hayashi et al., 2004; Cribb et al., 2013).

O uso da histopatologia quantitativa em estudos toxicológicos com crustáceos e anfíbios ainda é escasso na literatura científica. Encontram-se, descrições qualitativas das lesões encontradas, o que gera uma interpretação incompleta do grau de acometimento dos organismos submetidos à exposição aos xenobióticos.

Com relação às descrições das lesões, a hiperplasia é uma das primeiras alterações que surgem quando há um aumento na concentração de amônia no ambiente, caracterizando-se pelo aumento na proliferação das células no epitélio a qual pode levar à fusão lamelar e rompimento das células pilares (Thomson, 1978; Karasu-Benli e Köksal, 2005). Pode ser induzida por um aumento funcional do órgão ou por irritação química (Mumford et al., 2007). Ela reduz o espaço interlamelar, podendo causar uma fusão lamelar parcial ou completa, reduzindo a superfície para absorção de xenobióticos presente (Bernet et al., 1999; Koca et al., 2005; Camargo e Martinez, 2007), sendo considerada, portanto, um mecanismo de defesa.

A hiperplasia e a descamação epitelial são alterações inespecíficas, que podem servir como defesa (Hinton et al. 1992; Ojha, 1999), pois a regeneração celular diminuem a área de superfície da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (Karlsson-Norrgren et al., 1985). Essas alterações aumentam a distância entre a

água e o sangue, em virtude da redução ou cessação da passagem da água entre as lamelas (Lupi et al., 2007), criando uma barreira, mas que juntamente com o desprendimento epitelial, reduzem as trocas gasosas, podendo levar a ruptura de vasos sanguíneos, hemorragia (Nowak et al., 1992; Thophon et al., 2003), e hipóxia (Mallatt, 1985; Camargo e Martinez, 2007), se o agente tóxico não for removido.

O desprendimento do epitélio respiratório também é uma reação inicial das brânquias quando o animal está exposto a algum agente estressor (Winkaler et al., 2001), tendo como finalidade reduzir a funcionalidade do órgão atingido (Bernet et al., 1999), em uma possível tentativa de diminuir a contaminação pela substância tóxica. Já a necrose é a morte celular que leva a ruptura do epitélio lamelar (Pelgrom et al., 1995) sendo uma lesão que ocorre em condições de maior toxicidad (Abel et al., 1976).

Para os camarões funciona da mesma forma, lesões como acúmulo de hemócitos e edema (Negro et al., 2011), levantamento epitelial, fusão lamelar, hipertrofia e hiperplasia podem ser entendidas como um mecanismo protetor, reduzindo a superfície de contato das brânquias com o fluido contaminado e, portanto, o contato com a hemolinfa (Çaliskan et al., 2003; Maharajan et al., 2015). No entanto, este mecanismo pode comprometer as trocas gasosas através das brânquias (Korkmaz et al., 2009). Alterações histopatológicas podem interferir sobre os processos fisiológicos, levando o animal à hipóxia, insuficiência respiratória e até a morte (Çaliskan et al., 2003).

Trabalhos realizados com brânquias de peixes mostraram que este órgão é afetado pela amônia, apresentando lesões e alterações em sua estrutura (Arana, 1997; Saravana-Bhavan e Geraldine, 2000), como: hiperemias, edemas e aneurismas na carpa comum *Cyprinus carpio* (Peyghan e Takami, 2002); hiperplasia e fusão lamelar em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Karasu-Benli e Köksal, 2005); degeneração dos filamentos primários e secundários, telangiectasia e a congestão dos vasos sanguíneos dos filamentos secundários em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Esam et al., 2022) e no pompano dourado (*Trachinotus ovatus*) (Liu et al., 2021); necrose, hiperplasia e respostas inflamatória em bagres amarelos *Pelteobagrus fulvidraco* (Zhong et al., 2023). O que corrobora com o fato de que altos níveis de amônia não ionizada em corpos d'água destruírem o sistema excretor e o equilíbrio osmótico em camarões (Qiu et al., 2018), devido a brânquia ser um órgão envolvido nestas atividades.

Como comparativo de CL_{50} para peixes com um estudo recente, Mangang e Pandey (2021) estudando o peixe ósseo *Osteobrama belangeri* ($21 \pm 1,5$ g) expostos a amônia não ionizada, encontraram valor de CL_{50} -96h de $1,36 \text{ mg.L}^{-1}$; e observaram que as brânquias apresentaram hiperplasia de células epiteliais, levantamento epitelial; hiperplasia de células de cloreto, fusão lamelar; edema intersticial, congestão sanguínea com hemorragia, hipertrofia e necrose. Valor similar ao encontrado de eteramina para *N. davidi* para CL_{50} -48 h que foi de $1,30 \text{ mg.L}^{-1}$.

Em crustáceos, a exposição a amônia também pode causar alterações morfológicas e fisiológicas branquiais como espessamento e descamação epitelial, constrição e colapso lamelar, ruptura das células pilares, necrose e infiltrações de hemócitos (Rebelo et al., 2000; Romano e Zeng, 2007), podendo o órgão se recuperar de algumas lesões se cessada a exposição (Romano e Zeng, 2010). A infiltração de hemócitos aumenta em concentrações mais altas de amônia, sendo provavelmente uma resposta para fagocitar tecidos e/ou células danificados (Harrison e Humes, 1992). No entanto, a prevalência de hemócitos, juntamente com o colapso das lamelas branquiais, na presença de altas concentrações de amônia, provavelmente ocasiona a redução do fluxo de hemolinfa, que é necessário para as trocas gasosas (Romano e Zeng, 2007).

Dutra et al. (2017) expondo o camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* a 5 mg.L^{-1} de amônia total, observaram algumas alterações regressivas nas brânquias e inflamações como tumefação celular, espessamento do epitélio lamelar, infiltração hemocítica e elevação do epitélio lamelar. Já na exposição da maior concentração testada de amônia total, 80 mg.L^{-1} , houve uma prevalência de dano regressivo com presença de necroses, edemas e levantamento do epitélio lamelar, além de fusão e espessamento do epitélio lamelar. Os valores de I_{org} para esses tratamentos foram, 10,7 e 50,5, respectivamente. Valores similares ao encontrado no presente estudo apesar de substâncias teste diferentes. O I_{org} branquial neste estudo aumentou quando os animais foram expostos as primeiras concentrações de eteramina, sendo intensificadas com o aumento das concentrações, indicando que a exposição à eteramina induziu a ocorrência de alterações branquiais em ambas as espécies. Quando os resultados de mortalidade são comparados com as análises de índice de órgãos e as alterações presentes nas análises histológicas das brânquias, fica evidente que as alterações mais severas são causadas pelo aumento nas concentrações de eteramina.

Devido a possibilidade de conversão da eteramina em nitrito, faz-se importante também a comparação. Quando presente na água o nitrito é imediatamente incorporado na hemolinfa e no intestino dos camarões através da absorção branquial, se acumulando posteriormente nos tecidos (Cheng e Chen, 1999). Quando entra em contato com o plasma sanguíneo, convertem a hemoglobina em metamoglobina, diminuindo a capacidade de transporte de oxigênio do sangue (Eddy e Williams, 1994). Altas concentrações dos compostos nitrogenados afetam processos importantes para a aquicultura (Montoya et al., 1999), como a osmorregulação, respiração, consumo alimentar, mortalidade (Kuhn et al., 2010; Campos et al., 2012; Barbieri et al., 2016) e crescimento dos camarões (Chen e Chen, 1992; Campos et al., 2015).

Em girinos, o NO_2^- pode causar hipóxia tecidual afetando e retardando as mudanças fisiológicas e morfológicas que ocorrem durante a metamorfose, além de alterações comportamentais, visto que, a hipóxia tecidual poderia forçar os animais a se manterem em águas rasas, na tentativa de captar o oxigênio com mais eficiência, o que pode deixá-los mais propensos a predação (Marco e Blaustein, 1999).

Para crustáceos, Romano e Zeng (2009) estudando siri pintado *Portunus pelagicus* demonstraram que concentrações de 3 mg.L^{-1} de N-NO_2^- após 20 dias aumentaram os danos branquiais, apresentando alterações como elevação epitelial, células pilares rompidas, espessamento epitelial e edema. E em maiores concentrações de nitrito, foi observado o aumento da presença de hemócitos dentro das lamelas branquiais. A infiltração de hemócitos é uma resposta para potencialmente remover tecido danificado e pesquisas podem ser justificadas para determinar se a cicatrização das brânquias é possível (Romano e Zeng, 2013).

Para o macrocrustáceo *M. amazonicum*, Dutra et al. (2017) expondo os animais a concentrações de 1, 2, 4, 8 e 16 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , encontraram valores de I_{org} de 12; 12; 27,66; 28,33 e 30,33, respectivamente. Os autores encontraram danos como tumefação celular, fusão celular, espessamento do epitélio lamelar, infiltração hemocítica, necrose. Com a mesma espécie, Brazão et al. (2021) expondo os animais a concentrações de 11, 22 e 44 mg.L^{-1} de N-AT encontraram valores de I_{org} médios de 9; 42 e 40, respectivamente; e para exposição a concentrações de 1,5; 2,5 e 5 mg.L^{-1} de N-NO_2^- , encontraram valores de I_{org} médios de 13, 18 e 35, respectivamente. O I_{org} aumentou proporcionalmente à mortalidade e às concentrações dos compostos nitrogenados

testados. Os autores encontraram danos como espessamento do epitélio lamelar, fusão das lamelas, necrose, levantamento do epitélio lamelar e infiltração hemocítica; e as CL_{50-96h} para N-AT e $N-NO_2^-$ foram estimadas em 29,85 e 2,49 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Dutra et al. (2022) expondo a mesma espécie de camarão a concentrações de 18, 36 e 72 $mg.L^{-1}$ de N-AT, no pH 7,9 encontraram valores de I_{org} médios de 27, 45 e 40, respectivamente; e para exposição a concentrações de 1, 2 e 4 $mg.L^{-1}$ de $N-NO_2^-$ encontraram valores de I_{org} médios de 22, 30 e 44, respectivamente. Os autores encontraram danos como tumefação celular, espessamento do epitélio lamelar, levantamento da cutícula lamelar, fusão lamelar, edema e necrose; e a CL_{50-96h} para N-AT e $N-NO_2^-$ foi de 27,98 $mg.L^{-1}$ e 1,87 $mg.L^{-1}$, respectivamente. A exemplificação desses 3 artigos corroboram o presente estudo no demonstrativo do aumento dos valores do índice com aumento das concentrações do $N-NO_2^-$, comportamento similar ao presente estudo com aumento das concentrações da eteramina.

Macêdo et al. (2020) estudando a qualidade ambiental da bacia do rio Doce após receber os impactos dos rejeitos de mineração liberados pelo rompimento da barragem de Fundão, usaram as brânquias do lambari *Astyanax lacustris* para monitoramento. Os peixes foram expostos por sete dias a amostras de água obtidas 32 meses após o desastre, e apresentaram alterações histológicas nas brânquias como desorganização das lamelas secundárias, elevação epitelial, redução da área interlamelar e células de cloreto. A barragem desse estudo continha 50 milhões de m^3 de rejeitos, onde 34 milhões de m^3 foram lançados de imediato com o rompimento e os 16 milhões restantes foram carreados, aos poucos para jusante do acidente (IBAMA, 2015). Além disto, o acetato de eteramina, coletor no beneficiamento do minério de ferro foi encontrado nessa barragem, sendo importante enfatizar seu potencial de interferir na comunidade aquática devido à sua toxicidade (Mansur et al., 2016), sendo que exposições prolongadas podem causar acúmulo no organismo (Gonçalves et al, 2016).

Visto o potencial de acometimento dos compostos nitrogenados, corroborado com os resultados do presente estudo, é preciso monitoramento dos ambientes já acometidos pelo extravasamento de eteramina e/ou rompimentos de barragens que utilizem essa substância no processo de mineração.

5. CONCLUSÃO

Os animais mostraram-se susceptíveis à exposição aguda de eteramina. Exposições agudas a concentrações de eteramina iguais ou superiores a 2 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ para girinos de rã-touro *A. catesbeiana* e em juvenis de camarão *N. davidi*, respectivamente, resultaram em mortalidades e alterações histopatológicas nas brânquias. A análise histológica se apresenta como uma ferramenta útil para a compreensão das alterações nas brânquias dos anfíbios e camarões que levam a distúrbios ou até mesmo a morte dos animais expostos a eteramina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.C.; MARTINS, L.P.A.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; RIZZI, G.M.; COSTA, M.J.; SALLA, R.F.; KALININ, A.L.; MONTEIRO, D.A. The impact of cadmium chloride on the gonadal morphology of the North American bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802). *Fresenius Environ. Bull.*, v.22, n.7A, p.1962-1966, 2013.
- ABEL, P.D. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Fish Biol.*, v.9, p.441-446, 1976. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb04692.x>
- ALROY, J. Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.112, n.42, p.13003-13008, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>
- APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th. Washington, DC: APHA, 1992.
- ARANA, L.V. Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis: UFSC, 1997. 166 p.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. *Am. Soc. Test. Mater. ASTM Stand* 2014, <https://doi.org/10.1520/E0729-96R14>
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Mar. Pollut. Bull.*, v.48, p.817-834, 2004.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V.; MELO, C.B.; HENRIQUES, M.B. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquac. Res.*, v.47, n.4, p.1-9, 2016. <https://doi.org/10.1111/are.12583>
- BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. A Handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society: Baton Rouge, La, 1998.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25-34, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 2914/2011. Estabelece as responsabilidades e procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

- BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.
- BRAZÃO, C.C.; KRACIZY, R.O.; DUTRA, F.M.; OLIVEIRA, A.P.; SILVA, R.I.; BALLESTER, E.L.C. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquaculture*, v.533, n.25, p.736204, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736204>
- BUENO-GUIMARÃES, H.M.; FERREIRA, C.M.; GARCIA, M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Tadpole epithelium test: potential use of histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.67, p.202-209, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001280111>
- CAI, Y. A revision of the genus *Neocaridina* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Acta Zootaxonomica Sin.*, v.21, n.2, p.129-160, 1996.
- ÇALISKAN, M.; ERKMEN, B.; YERLI, S.V. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.14, p.117-120, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(03\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(03)00046-2)
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, v.5, n.3, p.327-336, 2007.
- CAMARGO, J.A.; ALONSO, A.; SALAMANCA, A. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, v.58, p.1255-1267, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- CAMPOS, B.R.; FURTADO, P.S.; D'INCAO, F.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. The chronic toxicity of ammonia, nitrite and nitrate on juvenile *Farfantepenaeus brasiliensis* (Crustacea: Decapoda). *Bol. Inst. Pesca*, v.41, n.2, p.261-269, 2015.
- CAMPOS, B.R.; MIRANDA-FILHO, K.C.; D'INCAO, F.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Decapoda). *Atlântica*, v.34, n.1, p.75-81, 2012. <https://doi.org/10.5088/atl.2012.34.1.75>
- CHEN, J.C.; CHEN, S.F. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v.101, n.3, p.453-458, 1992. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90069-J](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90069-J)
- CHEN, P.-J.; TAN, S.-W.; WU, W.-L. Stabilization or oxidation of nanoscale zerovalent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish. *Environ. Sci. Technol.*, v.46, p.8431-8439, 2012. <https://doi.org/10.1021/es3006783>
- CHENG, S.Y.; CHEN, J.C. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquat. Toxicol.*, v.45, n.1, p.35-46, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(98\)00090-3](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(98)00090-3)
- COLLINS, J.P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Dis. Aquat. Organ.*, v.92, p.93-99, 2010. <https://doi.org/10.3354/dao02307>
- COSTA, P.M.; CARREIRA, S.; COSTA M.H.; CAEIRO, S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat. Toxicol.*, v.126, p.442-454, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.013>
- CRIBB, A.Y.; AFONSO, A.M.; MOSTÉRIO, C.M.F. Manual técnico de ranicultura. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Brasília, DF, 2013.
- DAL-MEDICO, S.E.; RISSOLI, R.Z.; GAMERO, F.U.; VICTÓRIO, J.A.; SALLA, R.F.; ABDALLA, F.C.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; CARVALHO, C.S.; COSTA, M.J. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil (1 ppb) on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.1, n.104, p.168-174, 2014.
- DERRAIK, J.G.B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, v.44, p.842-852, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5)
- DUTRA, F.M.; RONNAU, M.; SPONCHIADO, D.; FORNECK, S.C.; BALLESTER, C.A.F.; CUPERTINO, E.L. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum*

- juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquat. Toxicol.*, v.187, p.115-123, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.003>
- DUTRA, F.M.; JUVENAL, J.R.; FORNECK, S.C.; BRAZÃO, C.C.; BALLESTER, E.L.C. Gill and haematological alterations in *Macrobrachium amazonicum* adults in acute exposure to ammonia and nitrite isolated and combined. *Aqua. Fish Fish.*, v.2, p.414-424, 2022. <https://doi.org/10.1002/aff2.69>
- EDDY, F.B.; WILLIAMS, E.M. Freshwater fish and nitrite. In Howells G, ed, *Water Quality for Freshwater Fish*. Gordon and Breach Science, Yverdon, Switzerland, 1994, pp. 117-143.
- ERKMEN B.; KOLANKAYA D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kızılırmak River, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.64, p.418-425, 2000. <https://doi.org/10.1007/s001280000017>
- ESAM, F.; KHALAFALLA, M.M.; GEWAILY, M.S.; ABDO, S.; HASSAN, A.M.; DAWOOD, M.A.O. Acute ammonia exposure combined with heat stress impaired the histological features of gills and liver tissues and the expression responses of immune and antioxidative related genes in Nile tilapia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.231, p.113187, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113187>
- EVANS, A.N.; NUNEZ, B.S. Freshwater acclimation elicits a decrease in plasma corticosteroids in the euryhaline Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.222, p.167-172, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.08.010>
- GONÇALVES, R.; PINTO, R.G.; WANDERLEY, L.J. Conflitos ambientais e pilhagem dos territórios na bacia do Rio Doce. In: ZONTA, M.; TROCATE, C. (Orgs.). *A questão mineral no Brasil - v.2 Antes fosse mais leve a carga: Reflexões sobre o desastre da Samarco/Vale/BHP Billiton*. Marabá, PA: Editorial Iguana, 2016. 237 p.
- GREIM, H.; BURY, D.; KLIMISCH, H.J.; OEBEN-NEGELE, M.; ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K. Toxicity of aliphatic amines: Structure-activity relationship. *Chemosphere*, v.36, n.2, p.271-295, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00365-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00365-2)
- GUSMÃO, K.A.G.; GURGEL, L.V.A.; MELO, T.M.S.; Carvalho, C.F.; Gil, L.F. Adsorption studies of etherdiamine onto modified sugarcane bagasses in aqueous solution. *J. Environ. Manage.*, v.133, p.332-342, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.040>
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.12, p.714-719, 1977. <https://doi.org/10.1021/es60130a004>
- HARRISON, F.W.; HUMES, A.G. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Volume 10: Decapod Crustaceans. John Wiley & Sons, Inc., 1992.
- HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; GALDIOLI, E.M.; FURUYA, V.R.B.; BOSCOLO, W.R. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *R. Bras. Zootec.*, v.33, n.1, p.14-20, 2004.
- HEATWOLE, H. (2013). Worldwide decline and extinction of amphibians. In K. Rohde (Ed.), *The Balance of Nature and Human Impact* (p. 259-278). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139095075.025
- HEATWOLE, H.; WILKINSON, J.W. *Amphibian Biology Volume 8- Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. Baulkham Hill: Surrey Beatty & Sons. 2009 327p.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. Pages: 155 –196 in: Huggett, R.J.; Kimerli, R.A.; Mehrle, P.M.; Bergman, H.L. editor. *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Ratón, FL, USA, 1992.
- IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais*. IBAMA. Minas Gerais,

2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_Ibama.pdf. Acessado em: 17 fev. 2023.
- KARASU-BENLI, A.C.; KÖKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. Turkish J. Vet. Anim. Sci., v.29, p.339-344, 2005.
- KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C.; FÖRLIN, L. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol., v.27, p.81-95, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb04011.x>
- KHATTAB, N.M.A.; SABER, S.A.; EL-SALKH, B.A.; SAID, R.E.M. The Efficiency of *Sclerophrys regularis* as a Bioindicator. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. (B. Zoology), v.13, n.1, p.91-101, 2021. <https://doi.org/10.21608/EAJBSZ.2021.154321>
- KOCA, Y.B.; KOCA, S.; YILDIZ, S.; GÜRCÜ, B.; OSANÇ, E.; TUNÇBAŞ, O.; AKSOY, G. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine stream (Aydın/Turkey) with determination of water pollution. Environ. Toxicol., v.20, p.560-571, 2005. <https://doi.org/10.1002/tox.20145>
- KOPPANG, E.O.; KVELLESTAD, A.; FISCHER, U. 5-Fish mucosal immunity: gill. Mucosal Health Aquaculture. (2015) p.93-133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00005-4>
- KORKMAZ, N.; CENGİZ, E.I.; UNLU, E.; UYSAL, E.; YANAR, M. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. Environ. Toxicol. Pharmacol., v.28, p.198-205, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2009.04.004>
- KUHN, D.D.; SMITH, S.A.; BOARDMAN, G.D.; ANGIER, M.W.; MARSH, L.F.J.; GEORGE, J. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. Aquaculture, v.309, n.1-4, p.109-114, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.014>
- LARSEN, E.H.; RAMLØV, H. Role of cutaneous surface fluid in frog osmoregulation. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., v.165, n.3, p.365-370, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.005>
- LIU, M.-J.; GUO, H.-Y.; LIU, B.; ZHU, K.-C.; GUO, L.; LIU, B.-S.; ZHANG, N.; YANG, J.-W.; JIANG, S.-G.; ZHANG, D.-C. Gill oxidative damage caused by acute ammonia stress was reduced through the HIF-1 α /NF- κ B signaling pathway in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Ecotoxicol. Environ. Saf., v.222, p.112504, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112504>
- LUNA, L.G. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York, Mc-Graw Hill, 1968.
- LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. Rev. Fafibe (online), n.3, p.1-6, 2007.
- MACÊDO, A.K.S.; SANTOS, K.P.E.; BRIGHENTI, L.S.; WINDMÖLLER, C.C.; BARBOSA, F.A.R.; RIBEIRO, R.I.M.A.; SANTOS, H.B.; THOMÉ, R.G. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustres* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. Sci. Total Environ., v.735, n.15, p. 139505, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>
- MAHARAJAN, A.; NARAYANASAMY, Y.; GANAPIRIYA, V.; SHANMUGAVEL, K. Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). J. Basic Appl. Zool., v.72, p.104-112, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.08.002>
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and their irritants: a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci., v.42, p.630-648, 1985. <https://doi.org/10.1139/f85-083>

- MANGANG, Y.A.; PANDEY, P.K. Hemato-biochemical responses and histopathological alterations in the gill and kidney tissues of *Osteobrama belangeri* (Valenciennes, 1844) exposed to different sub-lethal unionized ammonia. *Aquaculture*, v.542, p. 736887, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736887>
- MARCO, A.; BLAUSTEIN, A.R. The effects of nitrite on the behavior and metamorphosis in cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, n.5, p.946-949, 1999. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180519>
- MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (eds) *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall Fish and Fisheries Series, vol 9. Springer, Dordrecht, 1993. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2304-4_12
- MONTOYA, R.A.; LAWRENCE, A.L.; GRANT, W.E.; VELASO, M. Simulation of nitrogen dynamics and shrimp growth in an intensive shrimp culture system: effects of feed and feeding parameters. *Ecol. Modell.*, v.122, n.1-2, p.81-95, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(99\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(99)00123-4)
- MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MACCONNELL, B.; BLAZER, V. *Fish Histology and Histopathology*. 4th Edition, US Fish & Wildlife Service, West Virginia, 2007.
- MURPHY, E.A.; POST, G.B.; BUCKLEY, B.T.; LIPPINCOTT, R.L.; ROBSON, M.G. Future challenges to protecting public health from drinking-water contaminants. *Annu. Rev. Public Health*, v.33, n.1, p.209-224, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031811-124506>
- MURPHY, J.E.; PHILLIPS, C.A.; BAESLEY, V.R. Aspects of Amphibian Ecology. In: Sparling, D. W., Linder, G. and Bishop, C. A., (eds) 2000. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). p. 141-179.
- NEGRO, L.E.; MONTAGNA, M.; COLLINS, P. Freshwater decapods and pesticides: an unavoidable relation in the modern world. M. Stoytchera (Ed.), *Pesticides in the Modern World: Risks and Benefits*, InTech, Croatia, 2011, pp. 560.
- NOWAK, B.F.; DEAVIN, F.G.; SARJITO-MUNDAY, B.L. Scanning electron microscopy in aquatic toxicology. *J. Comput. Assist. Microsc.*, v.4, p.241-246, 1992.
- OJHA, J. Fish gills: potential indicators of ecodegradation of aquatic environments. In: MITTAL, A. K.; EDDY, F. B.; DATTAMUNSHI, J. S. (Editores). *Water/air transition in biology*. E.U.A.: Science Publishers, cap. 18, p. 263-279, 1999.
- PELGROM, S.M.G.J.; LOCK, R.A.C.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquatic. Toxicol.*, v.32, p.303-320, 1995. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00004-N](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00004-N)
- PELTIER, W.H.; WEBER, C. L. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, 3. EPA/600/4-85/013, Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, 1985, p.216.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, v.59, p.325-347, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.325>
- PEYGHAN, R.; TAKAMI, G.A. Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. *Aquaculture International*, v.10, p.317-325, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1022408529458>
- PINTO-VIDAL, F.A.; CARVALHO, C.S.; ABDALLA, F.C.; UTSUNOMIYA, H.S.M.; SALLA, R.F.; JONES-COSTA, M. Effects of lithium and selenium in the tail muscle of American bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) during premetamorphosis. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v.29, p.1975-1984, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15686-5>

- PIRES, J.M.M.; LENA, J.C.; MACHADO, C.C.; PEREIRA, R.S. Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco mineração: estudo de caso da barragem de Germano. *Rev. Árvore*, v.27, n.3, p.393-397, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000300017>
- QIU, L.; SHI, X.; YU, S.; HAN, Q.; DIAO, X.; ZHOU, H. Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress. *Frontiers in Physiology*, v.9, p.1-10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00211>
- REBELO, M.F.; RODRIGUEZ, E.M.; SANTOS, E.A.; ANSALDO, M. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.125, n.2, p.157-164, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00093-6)
- RELYEA, R.A. Predator cues and pesticides: A double dose of danger for amphibians. *Ecol. Appl.*, v.13, n.6, p.1515-1521, 2003. <https://doi.org/10.1890/02-5298>
- RISSOLI, R.Z.; ABDALLA, F.C.; COSTA, M.C.; RANTIN, F.T.; MCKENZIE, D.J.; KALININ, A.L. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original and Roundup Transorb on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, v.1, n.156, p.37-44, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.083>
- ROMANO, N.; ZENG, C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, v.266, p.246-254, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.035>
- ROMANO, N.; ZENG, C. Subchronic exposure to nitrite, potassium and their combination on survival, growth, total haemocyte count and gill structure of juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.72, p.1287-1295, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.02.003>
- ROMANO, N.; ZENG, C. Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.151, p.222-228, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.011>
- 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, *Rev. Fish. Sci.*, v.21, n.1, p.1-21, 2013. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- SALLA, R.F.; GAMERO, F.U.; RIBEIRO, L.R.; RIZZI, G.M.; DAL-MEDICO, S.E.; RISSOLI, R.Z.; VIEIRA, C.A.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; LEITE, D.S.; ABDALLA, F.C.; TOLEDO, L.F.; COSTA, M.J. Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.*, v.323, p.487-496, 2015. <https://doi.org/10.1002/jez.1945>
- SALLA, R.F.; GAMERO, F.U.; RISSOLI, R.Z.; DAL-MEDICO, S.E.; CASTANHO, L.M.; CARVALHO, C.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; KALININ, A.L.; ABDALLA, F.C.; COSTA, M.J. Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, v.1, n.144, p.1862-1868, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.042>
- SAMPAIO, C.M.S.; SILVA, R.R.; SANTOS, J.A.; SALES, S.P. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Braz. J. Biol.*, v.67, p.551-559, 2007.
- SANTOS, D.S.; FRANÇA, F.M.; MARCANTONIO, A.S.; VIRIATO, C.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; BADARÓ-PEDROSO, C.; FERREIRA, C.M. Histopathological changes in the gills of zebrafish (*Danio rerio*) and bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) caused by the use of formaldehyde. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v.4, n.3, p.3832-3847, 2021. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n3-090>

- SARAVANA-BHAVAN, P.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat. Toxicol.*, v.50, p.331-339, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00096-5)
- SCORSAFAVA, M.A.; SOUZA, A.; STOFER, M.; NUNES, C.A.; MILANEZ, T.V. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.69, n.2, p.229-232, 2010. <https://doi.org/10.53393/rial.2010.v69.32661>
- SHAW, G. General Zoology or Systematic Natural History. Volume III, Part 1. Amphibia. London, 1802.
- SHI, Y.-B. Amphibian Meamorphosis. From Morphology to Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York, 2000.
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.*, v.5, n.6, p.245-266, 1971. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)
- THOMSON, R.G. Patologia geral veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, v.121, p.307-320, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00270-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00270-1)
- TIMMONS, M.B.; EBELING, J.M.; WHEATON, F.W.; SUMMERFELT, S.T.; VINCI, B.J. Recirculating Aquaculture System, 2 nd Ed. Ithaca, Cayuga Aquaculture Ventures, 769 p, 2002.
- USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. National Recommended Water Quality Criteria. 2002. Disponível em: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>. Acesso em: 01 jan. 2019
- _____. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater. 2002.
- VAN METER, R.J.; GLINSKI, D.A.; HONG, T.; CYTERSKI, M.; HENDERSON, W.M.; PURUCKER, S.T. Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. *Environ. Pollut.*, v.193, p.262-268, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.003>
- VASQUEZ, O.E.; ROUSE, D.B.; ROGERS, W.A. Growth response of *Macrobrachium rosenbergii* to different levels of hardness. *J. World Aquac. Soc.*, v.20, n.2, p.90-92, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1989.tb00528.x>
- WAKE, D.B.; VREDENBURG, V.T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS*, v.105, n.1, p.11466-11473, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- WEI, K.; YANG, J. Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.113, p.446-453, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.032>
- WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Histological and physiological biomarkers to assess fish health in Londrina streams, state of Paraná. *Acta Sci. Biol. Sci.*, v.23, n.2, p.507-514, 2001. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v23i0.2708>
- ZHONG, L.; LIU, S.; ZUO, F.; GENG, Y.; OUYANG, P.; CHEN, D.; YANG, S.; ZHENG, W.; XIONG, Y.; CAI, W.; HUANG, X. The IL17 signaling pathway: A potential signaling pathway mediating gill hyperplasia and inflammation under ammonia nitrogen stress was identified by multi-omics analysis. *Sci. Total Environ.*, v.867, p.161581, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161581>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os níveis de segurança encontrados no presente estudo auxiliam na compreensão da atividade dos compostos nitrogenados em um sistema biológico e reforça os cuidados preconizados com poluentes no ambiente aquático. No entanto, é necessária a comprovação desses níveis de segurança de exposição por meio de testes subcrônicos e crônicos. Resultados conflitantes podem ser produzidos pela sensibilidade desigual entre espécies testes, causada por diferenças no metabolismo, condições fisiológicas e pelo órgão utilizado na avaliação de diferentes substâncias tóxicas em condições experimentais. Ressaltando a necessidade de mais estudos com a rã-touro *A. catesbeiana* e com os camarões *N. davidi*, em diferentes fases de vida e expostos a diferentes compostos a que possa vir a ter contato em sistemas produtivos, ou em casos acidentais, já que ambas as espécies são adaptadas ao sistema produtivo e podem servir de comparativo para anfíbios e crustáceos exóticos e nativos ameaçados de extinção.

O presente estudo trás um alerta a comunidade científica e aos produtores dos perigos que os compostos nitrogenados amônia, nitrito e a eteramina representam para organismos aquáticos, sendo importante o gerenciamento desses contaminantes em recursos hídricos utilizados na produção. Considerando que os dados sobre a concentração de eteramina no ambiente e o seu efeito sobre os organismos vivos são escassos, é de se esperar que, em função do seu contínuo e crescente emprego nas atividades de mineração, e o risco inerente do rompimento de barragens, que tenhamos mais demandas para os ecotoxicologistas buscarem respostas frente à exposição da biota aquática à eteramina, buscando por meio desses estudos uma possível proteção dos mananciais.