



Ação de Detergente Doméstico na Biologia Reprodutiva do Camarão de Água Doce *Macrobrachium olfersi*

L. C. MARTINS, R. D. DA ROSA, L. D. RIVERO, E. M. NAZARI & Y. M. R. MÜLLER*

Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, CEP 88010-970, Florianópolis, Santa Catarina

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de detergente de uso doméstico na glândula digestiva, no desenvolvimento embrionário e na reprodução de *M. olfersi*. Camarões foram mantidos em dois aquários (21,5 L de água deionizada): o experimental (aquário I) e o controle (aquário II). Uma dose de 0,075% de detergente doméstico foi adicionada ao aquário I, onde os camarões foram monitorados até o 140º dia de exposição. Durante esse tempo, a maturação gonadal foi acompanhada e os ovos foram removidos das fêmeas ovíferas e medidos. O desenvolvimento foi caracterizado através da morfologia externa dos embriões em cada dia de incubação. Fêmeas dos dois aquários foram crioadestesiadas, sendo o hepatopâncreas e ovários dissecados, fixados em Bouin (24 h), incluídos em parafina e seccionados (8 µm). Ambos os órgãos foram corados com HE e o hepatopâncreas, com Hoescht 33258. Os resultados mostram que a região secretora do hepatopâncreas (aquário II) apresenta tubos constituídos por células B secretoras com evidente aparato vacuolar. Os animais expostos ao detergente mostraram decréscimo no número de células B secretoras e significativa redução do aparato vacuolar. No grupo experimental foi observada redução no tempo de desenvolvimento embrionário, de 14 dias no grupo controle para 11 dias no grupo experimental. O volume dos ovos nos estágios de disco-germinal e pós-nauplius final (tanque I) foram de 0,045 e 0,067 mm³, respectivamente. O volume dos ovos do controle foi, nos mesmos estágios embrionários, de 0,044 e 0,075 respectivamente. Estes resultados sugerem que o detergente de uso doméstico tem efeito negativo sobre a performance reprodutiva de *M. olfersi*.

Palavras-chave: *Macrobrachium olfersi*, detergente, reprodução, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Effects of domestic detergents on the reproductive biology of the prawn *Macrobrachium olfersi*

The aim of this study is evaluate the effects of domestic detergents in the digestive gland, embryonic development and in the reproduction of *M. olfersi*. Prawns were maintained in two tanks with 21.5 L of deionized-water: the experimental (tank I) and the control (tank II). One dose of 0.075% of domestic detergent was added to the tank I, and the prawns were monitored on 140th exposure day. During this time, the gonadal maturation was monitored, the eggs were removed from the ovigerous females and measured. Development was characterized through of external morphology of the embryos in each incubation day. Females from the two tanks were cooled and the hepatopancreas and ovaries were dissected and fixed in Bouin (24 h), embedded in paraffin and sectioned (8 µm). Both organs were stained with HE and the hepatopancreas was also stained with Hoescht 33258. The results show that the secretory region of hepatopancreas (tank II) present tubules constituted by B-cells with an evident vacuolar apparatus. The animals exposed to detergent showed a decrease in the number of B-cells and significant reduction of vacuolar apparatus. In the experimental group was observed a reduction in the embryonic development time from 14 days in control group to 11 days in the experimental group. The egg volume of germinal-disk stage and final post-nauplius (tank I) were 0.045 and 0.067 mm³, respectively and the egg volume of the control was, in the same embryonic stages, 0.044 and 0.075 mm³, respectively. These results suggest that the domestic detergent have a negative effect on the reproductive performance of *M. olfersi*.

Key words: *Macrobrachium olfersi*, detergent, reproduction, embryonic development.

*Corresponding author: Yara Maria Rauh Müller, e-mail: yararm@ccb.ufsc.br.

INTRODUÇÃO

Entre os crustáceos da família Palaemonidae, o gênero *Macrobrachium* é o que apresenta a maior distribuição no Brasil (Bond-Buckup & Buckup, 1989), sendo que, das espécies deste gênero descritas para a Ilha de Santa Catarina, *Macrobrachium olfersi*, conhecida popularmente como pitu, destaca-se por habitar corpos de água doce e salobra, por sua representatividade e periodicidade e pela adaptabilidade às condições experimentais, requisitos essenciais ao adequado andamento de estudos de laboratório (Nazari *et al.*, 2003).

De modo geral nos palemonídeos, a visualização dos ovários é facilitada pela transparência da carapaça do cefalotórax, em que é possível acompanhar os estágios de maturação pelas mudanças em sua coloração, tamanho e forma (Arculeo *et al.*, 1995). Além disso, possuem uma câmara incubadora externa, onde os ovos permanecem até a eclosão, e, devido à transparência do córion, é possível caracterizar a morfologia dos embriões durante todo o período de incubação (Müller *et al.*, 2003, 2004).

O processo reprodutivo é controlado por mecanismos endógenos através de hormônios produzidos pelo sistema endócrino-peduncular (Wilder *et al.*, 1994). Contudo, por se tratar de invertebrados aquáticos, estas funções apresentam também forte dependência das variações de fatores exógenos, como temperatura, salinidade e fotoperíodo (Díaz *et al.*, 2003). Outro fator relevante para a reprodução é a alimentação das fêmeas, pois as características do vitelo dependem diretamente da sua dieta, sendo o hepatopâncreas responsável pelo metabolismo dos nutrientes indispensáveis ao processo reprodutivo.

Os organismos aquáticos encontram-se num meio onde estão naturalmente diluídos vários elementos, inclusive poluentes. Normalmente, devido à sua diluição, os efeitos dos poluentes aquáticos não podem ser imediatamente reconhecidos nos organismos, tendo-se dificuldade de compreender maiores implicações no ambiente (Blockwell *et al.*, 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório sugerem que detergentes domésticos, freqüentes nos efluentes urbanos, influenciam o repertório comportamental, a reprodução e o desenvolvimento embrionário das espécies nativas de palemonídeos.

Por serem sensíveis às alterações ambientais, os crustáceos são considerados indicadores de contaminação aquática (Rinderhagen *et al.*, 2000), auxiliando em trabalhos que visam a identificar ambientes alterados, com fins de preservação e manutenção do equilíbrio trófico.

Este estudo visa a avaliar o efeito de detergente de uso doméstico sobre a glândula digestiva, o desenvolvimento embrionário e a reprodução de *M. olfersi* coletados em corpos de água doce da Ilha de Santa Catarina, onde é lançada grande parte dos efluentes urbanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares adultos de *M. olfersi* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri (27°43'S e 48°32'W) – IBAMA nº 10/04. A captura foi realizada com puçá (malha 0,5 cm) passado entre as pedras de fundo e na vegetação submersa, sendo os animais capturados transportados para o laboratório em recipientes com água do local de coleta e aeração constante. Em laboratório foram realizadas a pesagem e a determinação do comprimento total dos exemplares, bem como a sexagem, através da análise dos caracteres sexuais secundários, sendo os indivíduos separados em machos, fêmeas e fêmeas ovíferas.

Foram montados dois aquários (aquário I: experimental; aquário II: controle) nas dimensões de 30 cm × 30 cm × 50 cm, com 21,5 L de água deionizada, sedimento arenoso e pedras para abrigo. A temperatura foi controlada a 24°C (±1°C) e salinidade em 0‰ (Müller *et al.*, 1999). Machos, fêmeas e fêmeas ovíferas foram mantidos com aeração constante e alimentação diária. No aquário I foi adicionado detergente de uso doméstico, na concentração de 0,075%, e o aquário II foi mantido nas mesmas condições, porém sem a adição do detergente.

Os animais foram monitorados diariamente, sendo a maturação ovariana acompanhada macroscopicamente, através da mudança de coloração e do tamanho dos ovários, visualizados devido à transparência da carapaça do cefalotórax.

As fêmeas ovíferas tiveram uma amostra de ovos (n = 50) retirada diariamente, a qual foi submetida à análise morfológica *in vivo* (10X e 40X), para reconhecimento das estruturas embrionárias típicas de cada estágio do desenvolvimento (Müller *et al.*, 2003). Os ovos foram medidos com ocular micrométrica (40X), sendo obtidos os valores (mm) dos eixos (l) longitudinal e (h) transversal, para o cálculo do volume através da fórmula $v = \pi lh^2/6$ (Odinetz-Colart & Rabelo, 1996).

Após 140 dias de exposição, as fêmeas foram crionestesiadas e dissecadas para retirada do hepatopâncreas e ovários, que foram em seguida fixados em Bouin (24 h), sendo posteriormente desidratados em série etanólica crescente, incluídos em parafina e seccionados (8 µm). Ambos os órgãos foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE). O hepatopâncreas foi submetido ainda à técnica de Hoescht 33258 para detecção de sítios apoptóticos, sendo as lâminas imersas em tampão Mc Ilvaine (5 minutos) e transferidas para solução de Hoescht 33258/tampão Mc Ilvaine (1:2000) (12 minutos). Em seguida, foram lavadas em água destilada, montadas com tampão Mc Ilvaine e vedadas com esmalte.

A análise morfométrica dos órgãos foi realizada a partir das medidas do diâmetro das ovogônias, dos ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, bem como dos vacúolos das células secretoras do hepatopâncreas, através de ocular micrométrica (100X).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia geral do hepatopâncreas dos grupos controle e experimental mostrou-se bastante similar. A estrutura da região medular do órgão, em corte transversal, do grupo experimental não sofreu modificação. Através das técnicas utilizadas, não foi possível observar alterações no número e na microestrutura dos ácinos dos grupos analisados. Contudo, pôde-se constatar redução de 42% no diâmetro dos vacúolos das células B secretoras, presentes nos ácinos dos animais expostos ao detergente. O diâmetro médio dos vacúolos dessas células do grupo controle foi de 27,78 μm , enquanto os do grupo experimental tinham em média 16,14 μm (Tabela 1).

O número de células nos tecidos do hepatopâncreas mostrou-se bastante semelhante entre os dois grupos. Através da técnica de Hoescht não foi possível detectar apoptose das células acinares e das células epiteliais que revestem as paredes dos túbulos dessa glândula. O efeito do detergente sobre a estrutura celular do hepatopâncreas pode ser explicado pelo fato de os camarões se alimentarem no sedimento, onde provavelmente se acumulam grandes quantidades de contami-

nantes (Blockwell *et al.*, 1998), os quais são transferidos diretamente para a glândula digestiva.

A maturação ovariana pôde ser observada de maneira semelhante no aquário experimental e no controle, mostrando que o detergente não afetou a sucessão dos estágios, podendo ser reconhecida a seguinte seqüência de maturação: imaturo, maturação inicial, intermediária e maduro. Através da análise histológica e morfométrica dos ovários maduros observou-se, principalmente, redução no diâmetro dos ovócitos vitelogênicos dos organismos do grupo experimental (Figura 1).

A redução no diâmetro das células germinativas pode estar relacionada à diminuição das células B do hepatopâncreas, uma vez que estas, entre outras funções, são responsáveis pela síntese e secreção de precursores para a formação do vitelo nas células germinativas. O detergente pode ter interferido na atividade das células B secretoras, o que pode ser constatado pela redução do seu aparato vacuolar. Assim, pode ter ocorrido diminuição da produção protéica no hepatopâncreas e, conseqüentemente, redução na disponibilidade desses compostos para as células germinativas, ocasionando redução no seu diâmetro.

Tabela 1 — Diâmetro dos vacúolos das células B secretoras de hepatopâncreas de *M. ofersi* dos grupos controle e experimental.

Grupo	Diâmetro dos vacúolos (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média	DP (\pm)
Controle	16,75	46,85	27,78	7,69
Experimental	10,39	23,74	16,14	3,57

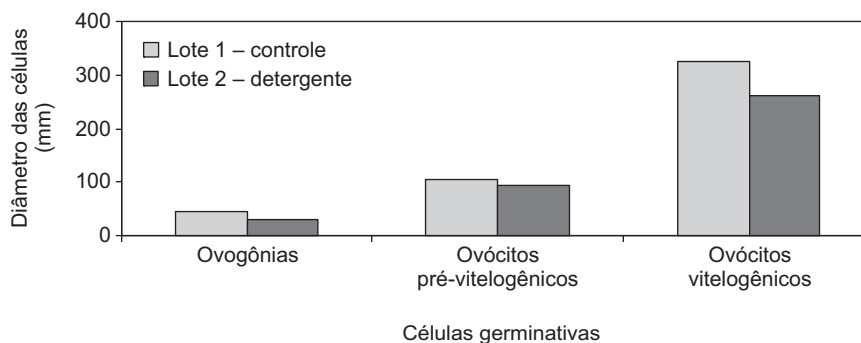


Figura 1 — Valores do diâmetro das células germinativas de ovários de *M. ofersi* dos grupos controle e experimental.

O acompanhamento do desenvolvimento embrionário dos ovos das fêmeas ovígeras dos grupos experimental e controle possibilitou a observação de alterações no tempo de desenvolvimento e na morfologia geral dos embriões. O tempo médio de desenvolvimento embrionário dos ovos do aquário controle foi de 14 dias, corroborando os dados apresentados por Müller *et al.* (2003, 2004). Os ovos expostos ao detergente desenvolveram-se num período menor de 11 dias. Os estágios iniciais de desenvolvimento observados nos dois grupos foram bastante similares, sendo possível observar as estruturas pré-naupliares e naupliares típicas. Contudo, sugere-se que os estágios finais da embriogênese do grupo experimental foram mais acelerados, ocasionando a redução no tempo de desenvolvimento.

Observaram-se anormalidades morfológicas nos ovos e embriões do grupo experimental, sendo constatadas alterações no tamanho, cor e forma dos ovos, bem como na pigmentação do corpo e olhos dos embriões. Anormalidades morfológicas induzidas por compostos inorgânicos foram observadas por Ohta *et al.* (1998) em ovos de *Daphnia magna*, sendo reportadas principalmente malformações de carapaça. Neste mesmo estudo foi constatado que o tempo de desenvolvimento foi mais prolongado nos indivíduos tratados do que no grupo controle.

Na maioria das desovas analisadas notou-se alteração no volume dos ovos, não sendo possível estabelecer um padrão de variação por fêmea. Nos estágios iniciais do desenvolvimento (disco-germinal – E3), a média do volume dos ovos foi semelhante entre o grupo experimental (0,045 mm³) e controle (0,044 mm³). Contudo, nos estágios finais (pós-nauplius final – E11) foram observadas diferenças mais expressivas, com o volume dos ovos dos grupos experimental e controle sendo respectivamente de 0,067 e 0,075 mm³.

Nossos resultados mostram que o detergente influencia o funcionamento dos órgãos analisados, afetando também o desenvolvimento embrionário, evidência da importância dos fatores exógenos na reprodução desses animais. A diminuição da performance reprodutiva tem sido reportada em outros estudos como um efeito subletal de contaminantes em ambientes de água doce (Blockwell *et al.*, 1998). Estudos mostram o uso de palaemonídeos como modelo animal adequado para determinação da toxicidade de metais, agentes químicos e biológicos (Rayburn & Fisher, 1997; Oberdörster *et al.*, 1999; Mariño-Balsa *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCULEO, M., PAYEN, G., CUTTITTA, A., GALIOTO, G. & RIGGIO, S., 1995, A survey of ovarian maturation in a population of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda). *Anim. Biol.*, 4: 13-18.
- BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L., 1989, Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Rev. Brasil. Biol.*, 49(4): 883-896.
- BLOCKWELL, S. J., TAYLOR, E. J., JONES, I. & PASCOE, D., 1998, The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 41-47.
- DÍAZ, A. C., SOUSA, L. G., CUARTAS, E. I. & PETRIELLA, A. M., 2003, Growth, molt and survival of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea) under different light-dark conditions. *Iheringia*, 93(3): 249-254.
- MARIÑO-BALSA, J. C., POZA, E., VÁZQUEZ, E. & BEIRAS, R., 2000, Comparative toxicity of dissolved metal to early larval stages of *Palaemon serratus*, *Manja squinaldo*, and *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 345-351.
- MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M., AMMAR, D., FERREIRA, E. C., BELTRAME, I. T. & PACHECO, C., 1999, Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revta. Bras. Zool.*, 16(3): 629-636.
- MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M. & SIMÕES-COSTA, M. S., 2003, Stages in the embryonic development of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 23(4): 670-676.
- MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D. & NAZARI, E. M., 2004, Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revta. Bras. Zool.*, 21(1): 27-32.
- NAZARI, E. M., SIMÕES-COSTA, M. S., MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D. & DIAS, M., 2003, Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuma* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 23(4): 862-868.
- OBBERDÖRSTER, E., MARTIN, M., IDE, C. F. & MCLACHLAN, J. A., 1999, Benthic community structure and biomarker induction in grass shrimp in an estuarine system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 512-518.
- ODINETZ-COLART, H. & RABELO, C., 1996, Variation in the egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 16(4): 684-688.
- OHTA, T., TOKISHITA, S., SHIGA, Y., HANAZATO, T. & YAMAGATA, H., 1998, An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: malformations induced by ethylenethiourea. *Environ. Resear., Section A*, 77: 43-48.
- RAYBURN, J. R. & FISCHER, W. S., 1997, Developmental toxicity of three carrier solvents using embryos of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33: 217-221.
- RINDERHAGEN, M., RITTERHOFF, J. & ZAUKE, G. P., 2000, Crustaceans as bioindicators. Biomonitoring of polluted water – Reviews and Actual Topics (A. Gerhardt, ed.). Trans Tech Pub Seitech Publications. *Environmental Research Forum*, 9: 1-34.
- WILDER, M. N., OKUMURA, T., SUZUKI, Y., FUSEYANI, N. & AIDA, K., 1994, Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration. *Zool. Sci.*, 11: 45-53.