



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**MORFOMETRIA DO TEGUMENTO EM JUVENIS DO CAMARÃO DE ÁGUA
DOCE *Macrobrachium rosenbergii***

MARCOS ANTÔNIO SINÉSIO DA SILVA

**AREIA-PB
JULHO-2017**

**MORFOMETRIA DO TEGUMENTO EM JUVENIS DO CAMARÃO DE ÁGUA
DOCE *Macrobrachium rosenbergii***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Zootecnia no Centro
de Ciências Agrárias da Universidade Federal
da Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do título de graduado em Zootecnia

Orientador: PROF. Dr. RICARDO ROMÃO GUERRA

**AREIA-PB
JULHO-2017**

MARCOS ANTÔNIO SINÉSIO DA SILVA

**MORFOMETRIA DO TEGUMENTO EM JUVENIS DO CAMARÃO DE ÁGUA
DOCE *Macrobrachium rosenbergii***

Orientador: _____
Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Universidade Federal da Paraíba

Examinador (a): _____
Prof. Dr. Marcelo Luis Rodrigues
Universidade Federal da Paraíba

Examinador (a) _____
Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena
Universidade Federal da Paraíba

AREIA, ___/___/___

Dedico esse trabalho ao meu pai Francisco de Assis Pereira da Silva (*In Memoriam*), e a
minha Mãe Teresinha Sinésio da Silva.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, gostaria de agradecer a Deus pelas realizações pessoais, principalmente a oportunidade de estudar na UFPB - CCA (Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências Agrárias – Areia - PB). Tornando-me bacharel em zootecnia.

A minha mãe Teresinha Sinésio da Silva, pela educação e formação pessoal, sendo considerada o pilar central da minha vida. Ao meu pai Francisco de Assis Pereira da Silva (*In Memoriam*), minha fonte eterna de inspiração.

Aos meus irmãos, Severino Sinésio da Silva, Josiel Sinésio da Silva, Maria da Graças Sinésio da Silva, Vera Lucia Sinésio da Silva, Maria de Fátima Sinésio da Silva, Hosana Sinésio da Silva, João Batista Sinésio da Silva, José Junior Sinésio da Silva, Maria José Sinésio da Silva, Manoel Messias Sinésio da Silva, pela motivação em concluir minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra pela dedicação e excelente orientação, praticamente durante toda minha vida acadêmica no campus, sendo não só um mestre, mais, sobretudo um amigo pessoal. E o Prof. Dr. Marino Eugênio de Almeida Neto pela co-orientação na elaboração da proposta de trabalho e desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A todos os professores do campus pela contribuição intelectual e formação acadêmica, em especial aos mestres da zootecnia, sendo considerados como peça-chave na minha formação profissional.

E, por fim, a todos aos meus amigos do curso, Ricardo, Robério, Raniere, Jhonatan, Ellen e aos demais colegas que fiz no campus, tais como: Fernando, Lucas, Anderson, Adailton, Rodrigo, Eudes, Bianca, Talita, Dariane, Thamara, e a tantos outros que deixo de citar nesse trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1. O <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	12
3.2. Fisiologia do ciclo de muda.....	13
3.3. Histologia do tegumento e exoesqueleto.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Camarões.....	15
4.2. Método da Setogênese.....	16
4.3. Histologia.....	17
4.4. Análise Estatística.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	18
5.1. Características histológicas do tegumento.....	18
5.2. Características histológicas do tegumento de acordo com os estágios de muda....	21
5.3. Variação das camadas do tegumento de acordo com o ciclo de muda.....	23
6. CONCLUSÕES.....	25
7. REFERÊNCIAS.....	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia dos estágios de muda do *M. rosenbergii*, determinado pelo método da setogênese. **A)** Cauda do *M. rosenbergii*, destacando o endopódito esquerdo como área de observação. **B)** Características do estágio de muda A, destacando a seta (**s**), epiderme (**e**) e nódulo setal (**ns**). **C)** Estágio B, destacando o cone setal (**cs**) e cone interno (**ci**). **D)** estágio C, a formação da linha epidermal (**le**). **E)** Estágio D0, observando a retração máxima da epiderme (**re**). **F)** Estágio D1, o desenvolvimento de setas novas (**sn**) “setogênese”. **G)** Estágio D2, a formação da nova epicutícula (**ne**). **H)** Estágio D3, completa formação das setas novas invaginadas (**sni**)..... **16**
- Figura 2.** Fotomicrografia do tegumento de juvenis do camarão de água doce *M. rosenbergii* de acordo com os estágios de muda. **A)** Corte transversal do segundo segmento abdominal do camarão no estágio de pós-muda recente (estágio A), evidenciando as camadas, (**ep**) epicutícula, (*) endocutícula iniciando a calcificação, (**e**) epiderme e (**tc**) tecido conjuntivo. **B)** Estágio de pós-muda tardia (estágio B), destacando a (**ep**) epicutícula, (**en**) endocutícula e (**e**) epiderme. **C)** A intermuda (estágio C) observando o desprendimento da epiderme e formação da linha epidermal (**ponta da seta**). **D)** Estágio de pré-muda recente (estágio D0) destacando o desprendimento quase total da epiderme, início da apólise (*). **E)** Estágio de pré-muda recente (estágio D1), observa-se a velha epicutícula (**vep**), velha endocutícula (**ven**), e a formação da nova epicutícula (**nep**). **F)** Estágio de pré-muda tardia (estágio D2) destaca-se a nova epicutícula (**nep**) mais evidenciada. **G)** Estágio de pré-muda tardia (estágio D3) observando desprendimento da velha epicutícula (**vep**), com pequena quantidade da camada calcificada (**ponta da seta**), nova epicutícula (**nep**) totalmente formada, nova endocutícula (*) porém não calcificada e a formação das camadas seguintes (**e**) epiderme e (**tc**) tecido conjuntivo..... **19**
- Figura 3.** Análise histológica do desenvolvimento das camadas de tegumento em juvenis de *Macrobrachium rosenbergii*, de acordo com os estágios do ciclo de muda. Dados submetidos a análise de variância ANOVA e post test de Tukey a ($P < 0,05$) de probabilidade..... **22**

RESUMO

O *Macrobrachium rosenbergii* é a espécie de camarão de água doce mais cultivada no Brasil, no entanto, pouco se conhece sobre a fisiologia do animal, principalmente no que diz respeito ao ciclo de muda. Assim, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfometria das camadas do tegumento do *M. rosenbergii*, de acordo com os estágios cronológicos do ciclo de muda. A coleta dos animais foi feita nos viveiros de engorda de camarão do Laboratório de Carcinicultura da UFPB, em Bananeiras-PB. Para tanto, foram retirados 8 camarões com $9,3 \pm 1,4$ g de cada estágio do ciclo de muda, classificados pelo método da setogênese em A, B, C, D0, D1, D2 ou D3, somando 56 animais analisados, sendo coletado o segundo segmento abdominal e fixado em formol a 10%. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia do PPGCAN-UFPB de acordo com o protocolo histológico padrão e posteriormente observadas com o programa de imagem Motic Image Plus 2.0 e analisados estatisticamente com o programa computacional Graph Prism 6.0. Como resultados, foram descritas as camadas do tegumento: epicutícula, camada calcificada, epiderme e tecido conjuntivo. A espessura da camada calcificada e da epiderme variaram de acordo com o ciclo de muda. A camada calcificada teve a menor espessura ($6,4 \pm 1,6\mu\text{m}$) no estágio A, chegando ao pico no estágio C ($39,3 \pm 11,6\mu\text{m}$), diminuindo em seguida. Com a epiderme foi o inverso, com máximo nos estágios A ($44,0 \pm 8,4\mu\text{m}$) e D3 ($44,6 \pm 12,0\mu\text{m}$), chegando ao mínimo no estágio C ($27,2 \pm 9,5\mu\text{m}$). Assim, esses resultados destacam os intensos processos fisiológicos ocorridos no tegumento do *M. rosenbergii* nos momentos pré e pós-muda.

Palavras-chave: Carcinicultura de água doce, *Macrobrachium rosenbergii*, ecdise, histomorfometria.

ABSTRACT

Macrobrachium rosenbergii is the most cultivated freshwater prawn species in Brazil, however, little is known about the physiology of the animal, especially regarding the moulting cycle. Thus, the present study had as objective to describe the morphometry of the layers of the tegument of *M. rosenbergii*, according to the chronological stages of the molting cycle. The animals were collected in the shrimp fattening nurseries of the Carciniculture Laboratory of the UFPB, in Bananeiras-PB. For this, eight shrimps with 9.3 ± 1.4 g of each stage of the moulting cycle, classified by the method of setogenesis in A, B, C, D0, D1, D2 or D3, were collected, adding 56 animals analyzed, being collected The second abdominal segment and fixed in 10% formalin. Histological analyzes were performed in the histology laboratory of the PPGCan-UFPB according to the standard histological protocol and later observed with the Motic Image Plus 2.0 image program and statistically analyzed with the Graph Prism 6.0 computer program. As results, the layers of the integument were described: epicutícula, calcific layer, epidermis and connective tissue. The thickness of the calcified layer and the epidermis varied according to the molting cycle. The calcification had the lowest thickness ($6.4 + 1.6\mu\text{m}$) in stage A, reaching the peak in stage C ($39.3 + 11.6\mu\text{m}$), then decreasing. With the epidermis was the inverse, with maximum in stages A ($44.0 + 8.4\mu\text{m}$) and D3 ($44.6 + 12.0\mu\text{m}$), reaching the minimum in stage C ($27.2 + 9.5\mu\text{m}$). Thus, these results highlight the intense physiological processes that occurred in the tegument of *M. rosenbergii* in the pre and post-molt moments.

Keywords: Freshwater shrimp farming, *Macrobrachium rosenbergii*, ecdise, histomorphometry.

1. INTRODUÇÃO

A produção de camarão de água doce ainda ocupa uma posição inferior a do camarões marinhos nos mercados mundiais, no entanto, sobressai em outros aspectos, tais como: maior resistência a doenças, maturação e larviculturas mais simples e sistemas de produção compatível com pequenas propriedades (Valenti, 2001; Valenti, 2004). Dentro dos setores da aquicultura, a criação de camarões de água doce tem apresentado elevado crescimento em todo o mundo tendo como principal representante a espécie *Macrobrachium rosenbergii* (220.254 toneladas/ano) (FAO, 2016). No entanto, ainda pouco se conhece sobre a biologia e fisiologia interna do *M. rosenbergii*, principalmente no que tange o ciclo de muda e/ou ecdise.

Os crustáceos em geral, incluindo o camarão, possuem um exoesqueleto rígido que reveste todo corpo, conferindo-lhe assim uma resistência mecânica. No entanto, essa estrutura é uma barreira física para o crescimento destes animais, que contornam esse problema através do ciclo de muda. A muda e/ou ecdise é um dos aspectos fisiológicos mais importante para vida dos crustáceos. Esse processo domina praticamente toda a vida desses animais, incluindo a alimentação, reprodução, metabolismo, comportamento e a acuidade sensitiva que são afetados direta e/ou indiretamente pelo ciclo da muda (Passano, 1960). No entanto, a muda representa para os crustáceos a possibilidade de concluir os processos normais de crescimento. Isto ocorre de forma cíclica, cada vez que o organismo está preparado para aumentar de comprimento e peso o velho exoesqueleto é liberado, rapidamente é produzida uma nova cutícula, que posteriormente endurece até adquirir a consistência e dureza do exoesqueleto anterior. Durante este processo o corpo do camarão tende a absorver água para ocorrer a divisão celular, provocando assim o incremento de volume e peso do animal (Chang, 1995).

Para determinar os estágios do ciclo de muda em crustáceos são usados vários métodos, tais como os descritos por Robertson *et al.* (1987) e Chan *et al.* (1988) que incluem observação histológica do tegumento, medição dos gastrólitos e/ou a regeneração dos pereiópodos e observação do desenvolvimento setal dos apêndices (setogênese). No entanto, um dos métodos universalmente usado e aceitos pela comunidade científica é o da setogênese, esse método consiste na observação do desenvolvimento de estruturas dos apêndices, tais como: setas, cones setais, bases setais, nódulos setais e linha epidermal. As setas são protuberâncias externas em apêndices como os urópodos e pleópodos. A

determinação do estágio de muda pela setogênese no apêndice é rápida e invasiva, causando pouco dano nos animais, mesmo depois de repetidas observações.

Inicialmente, o ciclo da muda foi identificado pelo método da setogênese e dividido em cinco estágios principais: estágio A (pós-muda recente), estágio B (pós-muda tardia), estágio C (Intermuda), estágio D (Pré-muda) e estágio E (Ecdise), (Passano, 1960; Smith e Dall, 1985). Posteriormente, Chan *et al.* (1988) subdividiu em sete estágios: estágio A (pós-muda recente), estágio B (pós-muda tardia), estágio C (Intermuda), estágio D0 e D1 (Pré-muda recente) e estágio D2 e D3 (Pré-muda tardia), sendo que o estágio E (Ecdise) não foi descrito, visto que é um evento que dura questão de segundos.

Para Dannel (1960) e Passano (1960), no final da intermuda o tegumento consiste de cinco camadas: a epiderme, formada por um epitélio subcubóidal simples que está associada a tecidos conectivos, células glandulares, cromatóforos, e terminações nervosas sensitivas. Esta camada é a única constituinte viva do tegumento e é responsável pela secreção das camadas restantes; a camada membranosa, uma camada fina quase imperceptível, protéica e não-calcificada; a endocutícula, principal camada da cutícula. Esta é a maior porção do exoesqueleto, compreende mais de 80% do tegumento. A endocutícula tem muitas lâminas e é rica em quitina, mas pobre em proteína. É severamente mineralizada com cálcio e outros sais; a exocutícula ou camada pigmentada que é composta de 40 – 45 % de quitina e o restante de proteína. Absorvida antes da ecdise em D2 e D3; A epicutícula, uma camada extremamente fina e histologicamente com poucas estruturas. Consiste de composição proteo-lipídica, mas sem quitina. Porém, os autores não destacam quanto essas camadas do tegumento variam ao longo do ciclo, visto que essas camadas são formadas principalmente após a liberação do velho exoesqueleto.

No entanto, o método da setogênese trata-se de uma análise qualitativa das características do tegumento, assim, não relata valores quantitativos das camadas do exoesqueleto que tragam referência para novos estudos. Outro ponto relevante é que a maior parte da estrutura do tegumento é formada depois da ecdise. Desta forma as camadas do tegumento devem variar de acordo com o ciclo de muda. Portanto, o objetivo do presente trabalho é descrever a morfometria do tegumento de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, de acordo com os estágios cronológicos do ciclo de muda, bem como, fazer uma correlação com o método da setogênese para validar essa metodologia para espécie estudada. Assim, podemos obter valores de referência para novos estudos sobre a fisiologia de muda do *M. rosenbergii* e manejo da espécie.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Descrever a morfometria do tegumento de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, de acordo com os estágios cronológicos do ciclo de muda bem como, fazer uma correlação com o método da setogênese para validar essa metodologia para espécie estuda

2.2. Objetivo Específicos

- Identificar as camadas do tegumento no *M. rosenbergii*;
- Fazer uma correlação das características histológicas camada do tegumento com o método da setogênese;
- Quantificar a proporção de cada camada do tegumento de acordo com o ciclo de muda (A, B, C, D₀, D₁, D₂ ou D₃).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O *Macrobrachium rosenbergii*

O *M. rosenbergii* é considerado o maior dos camarões de água doce, podendo atingir 32 cm de comprimento e 500 gramas de peso. Esta espécie foi descrita em 1870 por Der Man, como o nome *Palaemon rosenbergii*. Posteriormente, foi citado na literatura com outros nomes genéricos, sendo então incluído no gênero *Macrobrachium* que é considerado o maior animal da família *Palaemonidae* (Valenti, 1990).

Durante séculos, o cultivo de *M. rosenbergii* era feito de modo rudimentar em vários países asiáticos, o sistema de produção consistia na captura de camarões jovens no ambientes naturais, para criá-los em confinamentos até atingirem tamanho adequado para o consumo humano (Valenti, 1998). O *M. rosenbergii* é a espécie de camarão de água doce mais produzida no Brasil, principalmente por apresentar características como: rusticidade, precocidade, fecundidade, alta fertilidade e prolificidade; portanto adaptam-se muito bem a criação em cativeiros, resistindo a grandes mudanças físico-químicas da água e variações climáticas (Valenti, 1996).

A introdução da espécie no Brasil ocorreu no ano de 1977, por intermédio do Departamento de Oceanografia de UFPE que, com a permissão da extinta Superintendência de Desenvolvimento da Pesca (Sudepe), conseguiu importar pós-larvas do Havaí, gentilmente cedidas pelo AFRC. A espécie demonstrou ótima capacidade de adaptação ao clima nacional; a partir do ano seguinte, foram obtidas pós-larvas em laboratório e efetuados os primeiros testes de crescimento em viveiros experimentais (Valenti, 1998).

Segundo Valenti (1998), a tecnologia dos cultivos em viveiros foi importada do Havaí e adaptada a realidade do país. Trata-se do sistema semi-intensivo contínuo, no qual as pós-larvas são colocadas nos viveiros de engorda, realizando-se despesas seletivas e repovoamento periódicos (Valenti, 1998). Na segunda metade da década de 80, foi introduzida no país tecnologia desenvolvida em Israel, baseada no cultivo em sistema intensivo multifásico, com a utilização de tanques berçários, viveiros berçários e viveiros de engorda. Esta técnica permite uma otimização das áreas disponíveis no ambiente de cultivo, proporcionando produtividade variando de 3 a 5 t/ha/ano (Valenti *et al.*, 1993).

Outra técnica que vem sendo adotada, principalmente no sul do Brasil, é o policultivo do *M. rosenbergii* com determinadas espécies de peixes, como a carpa-capim e a tilápia. A partir da viabilização do processo de produção em massa de pós-larvas, a produção de camarão para consumo se propagou rapidamente pelo país. Já em 1989, existiam 94 fazendas em operação, perfazendo um total de 317,7 ha. Esta área ampliou-se rapidamente para 717 ha, enquanto que o número de laboratórios cresceu para 32 (Valenti, 2001). Posteriormente, houve um declínio na atividade, mas em 1995 pode-se constatar ligeira recuperação da carcinicultura de água doce, sobretudo nas pequenas propriedades (Valenti, 2001).

3.2. Fisiologia do ciclo de muda

Apesar de todo o pacote tecnológico de produção pouco se conhece sobre a fisiologia do *M. rosenbergii*, principalmente no que tange a fisiologia do ciclo de muda. Desta forma, surgiu a necessidade de descrever como ocorre o desenvolvimento desses animais ao longo dos estágios de muda, visto que esse é o principal evento fisiológico dos crustáceos, que interfere diretamente na alimentação, reprodução e comportamento (Passano, 1960).

A muda representa, para os crustáceos, a possibilidade de concluir os processos normais de crescimento. Isto ocorre de forma cíclica cada vez que o organismo está preparado para aumentar de comprimento e peso. O velho exoesqueleto é liberado rapidamente e é produzida uma nova cutícula. Que posteriormente endurece até adquirir a consistência e dureza do exoesqueleto anterior. Durante este processo o corpo do camarão tende a absorver água para ocorrer a divisão celular. Provocando o incremento de volume e peso do animal (Chang, 1995).

Para determinar os estágios do ciclo de muda em crustáceos são usados vários métodos, como os descritos por Chan *et al.* (1988) e Robertson *et al.* (1987). Estes métodos incluem observação histológica do tegumento, medição dos gastrólitos e/ou regeneração dos pereiópodos e observação do desenvolvimento setal dos apêndices (setogênese). No entanto, o método universalmente usado e aceito pela comunidade científica é o da setogênese. Esse método baseia-se na observação do grau de desenvolvimento de estruturas da cutícula, como setas, cones setais, bases setais, nódulos setais e linha epidermal dos apêndices. As setas são protuberâncias externas em apêndices como os urópodos e pleópodos; nas antênulas, as setas aparecem formando uma fina camada. Portanto, a determinação do estágio de muda pela setogênese no apêndice é rápida e causa pouco dano no animal, mesmo com repetidas observações (Chan *et al.*, 1988).

Foram descritos por alguns autores que existem estágios dentro do ciclo de muda dos camarões na qual o consumo de alimento para ou diminui, sendo esse fato extremamente importante no manejo da espécie pelos produtores (Smith e Dall, 1985; Chan *et al.*, 1988). Esse ciclo é considerado um processo cíclico de não-alimentação, sendo denominado, abstinência fisiológica. Há relatos que esse mecanismo de não alimentação esteja associado ao fato de que, no processo de desprendimento do exoesqueleto, algumas estruturas, como boca, esôfago e parte do estômago não esteja totalmente restruturada, assim, deixam de ser funcionais. Sendo que estes órgãos possuem uma capa de quitina em continuação às capas externas, a qual se desprende junto com o antigo exoesqueleto no momento da muda, impedindo que os órgãos sigam realizando suas funções normais (Ceccaldi, 1987).

Inicialmente, o ciclo da muda identificado e descrito pelo método da setogênese, foi dividido em cinco estágios principais: Estágio A (pós-muda recente), Estágio B (pós-muda tardia), Estágio C (Intermuda), Estágio D (Pré-muda) e Estágio E (Ecdise) (Passano, 1960; Smith e Dall, 1985). Posteriormente, Chan *et al.* (1988), subdividiu em

sete estágios: Estágio A (pós-muda recente), Estágio B (pós-muda tardia), Estágio C (Intermuda), Estágio D0 e D1 (Pré-muda recente) e estágio D2 e D3 (Pré-muda tardia), sendo que o estágio E (Ecdise) não foi descrito, visto que é um evento que dura questão de segundos.

3.3. Histologia do tegumento e exoesqueleto

Segundo Dannel, 1960 e Passano, 1960 no final da intermuda quando o exoesqueleto do camarão está tontamente formado o tegumento é subdividido em de cinco camadas histológica: A epiderme, formada por um epitélio subcuboidal simples que está associada a tecidos conectivos, células glandulares, cromatóforos, e terminações nervosas sensitivas, sendo está camada a única constituinte viva do tegumento e é responsável pela secreção das camadas restantes; A camada membranosa, uma camada fina quase imperceptível, protéica e não-calcificada; A endocutícula, principal camada da cutícula. Esta é a maior porção do exoesqueleto, compreende mais de 80% do tegumento. A endocutícula tem muitas lâminas e é rica em quitina, mas pobre em proteína. É severamente mineralizada com cálcio e outros sais; A exocutícula ou camada pigmentada. Composta de 40 – 45 % de quitina e o restante de proteína. Absorvida antes da ecdise em D2 e D3; A epicutícula, uma camada extremamente fina e histologicamente com poucas estruturas. Consiste de composição proteo-lipídica, mas sem quitina. Porém, os autores não destacam quanto essas camadas do tegumento variam ao longo do ciclo, visto que essas camadas são formadas principalmente após a liberação do velho exoesqueleto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Camarões

Os camarões foram coletados no viveiro de engorda do Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias (CCHSA), no município de Bananeiras- PB, localizado na microrregião do Brejo Paraibano 06° 45' 00" S 35° 37' 58" O, altitude de 526 m, clima tropical chuvoso e verão seco com temperatura média de 28°C no verão e mínima de 10°C no inverno. Para tanto, foram retirados 8 camarões com peso médio de $9,3 \pm 1,4g$ e

classificados pelo método da setogênese em cada 7 estágios do ciclo de muda, totalizando um número de 56 animais analisados.

4.2. Método da Setogênese

Imediatamente após a captura, os camarões foram analisados com a lupa estereoscópica utilizando o método da setogênese descrito por Chan et al. (1988) adaptado para espécie estudada, no qual foram identificados os estágios de muda. Para tanto, foi observado no endópodo esquerdo do urópodo o desenvolvimento setal, tais como: setas, cones setais, cone interno, bases setais, nódulos setais, e linha epidermal, (figura 1). Assim, os camarões foram classificados como pertencentes os estágios A, B, C, D0, D1, D2 e D3.

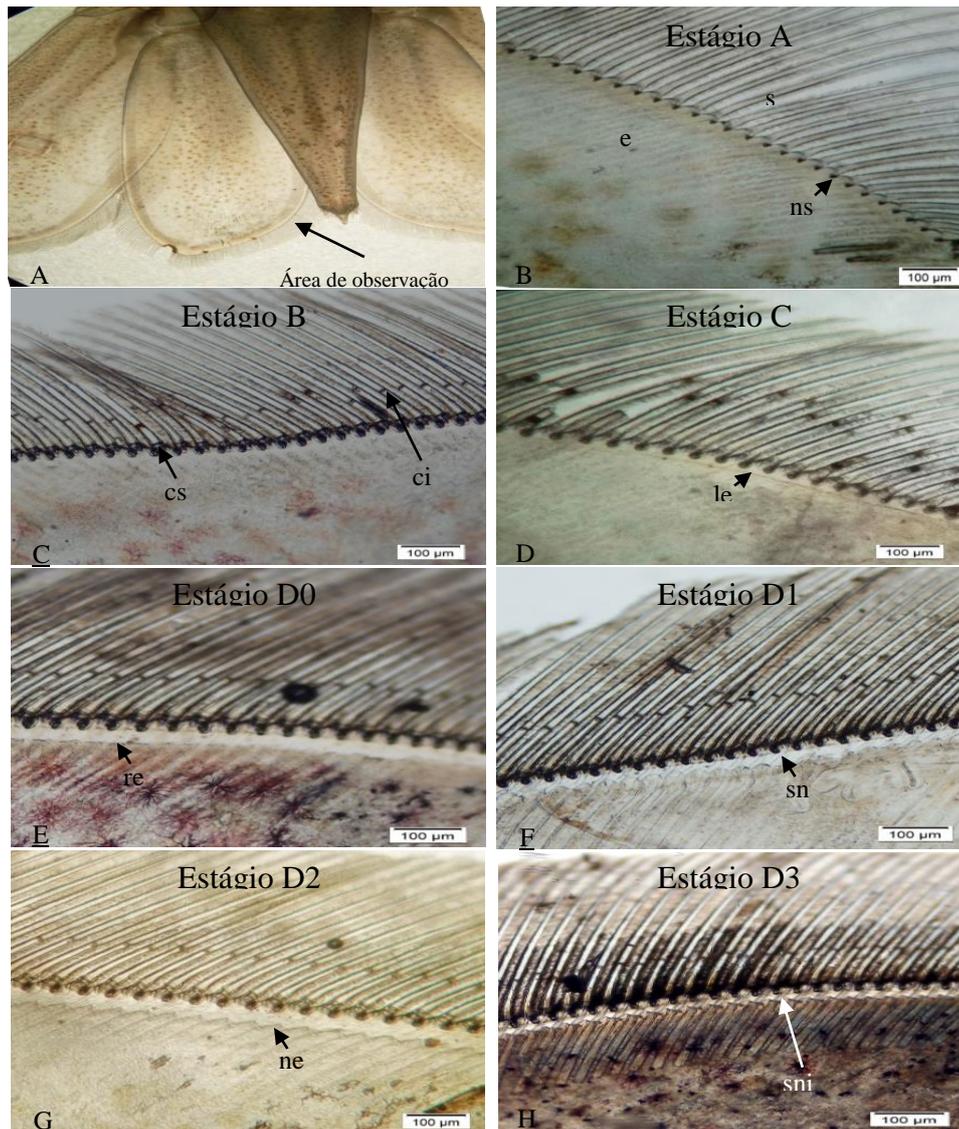


Figura 1. Fotomicrografia dos estágios de muda do *M. rosenbergii*, determinado pelo método da setogênese. **A)** Cauda do *M. rosenbergii*, destacando o endopódito esquerdo como área de observação. **B)** Características do estágio de muda A, destacando a seta (**s**), epiderme (**e**) e nódulo setal (**ns**). **C)** Estágio B, destacando o cone setal (**cs**) e cone interno (**ci**). **D)** estágio C, a formação da linha epidermal (**le**). **E)** Estágio D0, observando a retração máxima da epiderme (**re**). **F)** Estágio D1, o desenvolvimento de setas novas (**sn**) “setogênese”. **G)** Estágio D2, a formação da nova epicutícula (**ne**). **H)** Estágio D3, completa formação das setas novas invaginadas (**sni**).

4.3. Histologia

A análise histológica foi realizado no Laboratório de Histologia do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn), UFPB, Areia, PB, Brasil. Os camarões foram anestesiados mediante a resfriamento, injetado 5 mL⁻¹ de formol a 10% na região do cefalotórax, dissecados, coletado o segundo segmento abdominal e fixado em uma

solução de formol a 10%, posteriormente, utilizado o processamento histológico. As amostras foram submetidas ao protocolo padrão de inclusão e emblocadas em parafina pelo método descrito por (Ramos *et al.*, 2011). Os blocos foram identificados e cortados com micrótomo rotativo na espessura de 5 µm e montados em lâminas de vidro. As lâminas foram diafanizadas em dois banhos de xilol por 10 minutos, hidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico, 100, 95 e 70% por 3 minutos cada, lavadas em água corrente por 3 minutos. Em seguida coradas com hematoxilina, durante 4 minutos e lavadas em água corrente 4 minutos para a reação, e corada pela eosina por 2 minutos. Então as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, 70, 90, 100%, com duração de 2 minutos cada. Depois diafanizadas em dois banhos de xilol por 5 minutos e montada a lâmina com Entellan.

Para análise do tegumento, foram digitalizadas 3 fotomicrografias por animal com objetiva de 20x e quantificado 1 mensurações por foto, perfazendo um número amostral de 24 mensurações de cada estágio de muda. As fotomicrografias foram capturas no microscópio Olympus BX-60 e câmera Zeiss AxioCam acoplada com programa de captura de imagens digitais Motic Image Plus 2.0.

4.4. Análise Estatística

As dados morfométricos de altura da epicutícula, altura da camada calcificada, altura da epiderme e altura do tecido conjuntivo foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o programa Graph Prism 6.0 para identificar as diferenças entre os estágios de muda.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Características histológicas do tegumento

A partir das observações histológicas, destaca-se que o tegumento do *M. rosenbergii* é constituído de quatro camadas: epicutícula, a camada mais externa do tegumento responsável por manter o contato com o meio externo, formando uma barreira física de proteção para o animal. A endocutícula, constituída por uma camada calcificada,

formando a maior parte do tegumento; a epiderme formada por uma epitélio estratificado cúbico; e o tecido conjuntivo ligando a epiderme ao músculo (figura 2A).

Nesse estudo com *M. rosenbergii* a exocutícula foi considerada dentro da epicutícula, pois a epicutícula trata-se de uma camada fina praticamente imperceptível. Entretanto, a epicutícula apresentou como característica histológica uma intensa basofilia (Figura 2B). Segundo Promwikorn *et al.* (2005), esse fato está relacionado com a constituição química da camada externa, sendo que o mesmo autor destaca em estudos com *Penaeus monodon* que a epicutícula é formada principalmente por carboidratos e proteínas na forma de glicoproteínas que pode ser usada como um precursor da quitina, pois é constituído de um polímero de 80-90% de N-acetilglucosamina e 10-20% de glucosamina. Moura *et al.* (2007), destaca que a quitina é segundo carboidrato mais abundante na natureza, encontrado principalmente no exoesqueleto de crustáceos. O autor ainda destaca que, camarões apresentam na sua composição química cerca de 5 a 7% de quitina.

A endocutícula apresentou uma coloração mais acidófila. Segundo Deniel, (1960) e Passano (1960), a endocutícula é a principal camada da cutícula, e é considerada a maior porção do exoesqueleto dos crustáceos, compreendendo mais de 80% do tegumento. A endocutícula tem muitas lâminas e é rica em quitina, mas pobre em proteína. É severamente mineralizada com cálcio e outros sais.

A epiderme dos camarões analisados apresentam características que corroboram com as de Deniel (1960) e Passano (1960) sendo formada por um epitélio subcúbico simples que está associada ao tecido conjuntivo, células glandulares, cromatóforos e terminações nervosas sensitivas. Portanto, provavelmente está camada a única constituinte viva do tegumento sendo responsável pela proliferação celular e formação das camadas supracitadas. Na camada de tecido conjuntivo, observou-se que a mesma estava fazendo a ligação entre a epiderme e a camada muscular, provavelmente sendo responsável por ligar o músculo com as camadas superiores (figura 2G). Segundo Junqueira e Carneiro (2008), o tecido conjuntivo pode desempenhar diferentes funções no organismo, tais como, preenchimento de espaços entre órgãos, sustentação, defesa e nutrição.

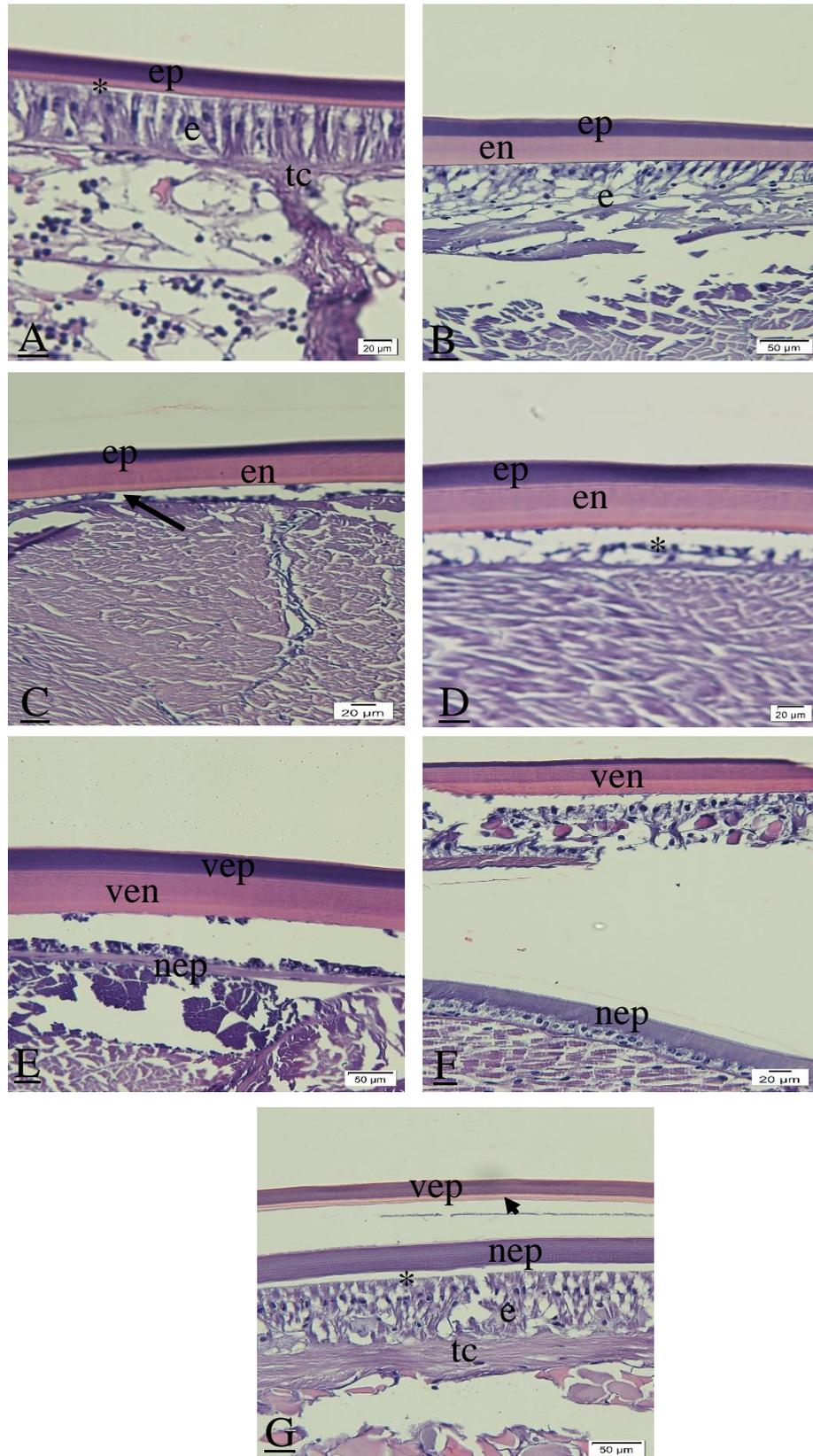


Figura 2. Fotomicrografia do tegumento de juvenis do camarão de água doce *M. rosenbergii* de acordo com os estágios de muda. **A)** Corte transversal do segundo segmento abdominal do camarão no estágio de pós-muda recente (estágio A), evidenciando as camadas, (**ep**) epicutícula, (*****) endocutícula iniciando a calcificação, (**e**) epiderme e (**tc**) tecido conjuntivo. **B)** Estágio de pós-muda tardia (estágio B), destacando a (**ep**) epicutícula, (**en**) endocutícula e (**e**) epiderme. **C)** A intermuda (estágio C) observando o desprendimento da epiderme e formação da linha epidermal (**ponta da seta**). **D)** Estágio de pré-muda

recente (estágio D0) destacando o desprendimento quase total da epiderme, início da apólise (*). **E**) Estágio de pré-muda recente (estágio D1), observa-se a velha epicutícula (**vep**), velha endocutícula (**ven**), e a formação da nova epicutícula (**nep**). **F**) Estágio de pré-muda tardia (estágio D2) destaca-se a nova epicutícula (**nep**) mais evidenciada. **G**) Estágio de pré-muda tardia (estágio D3) observando desprendimento da velha epicutícula (**vep**), com pequena quantidade da camada calcificada (**ponta da seta**), nova epicutícula (**nep**) totalmente formada, nova endocutícula (*) porém não calcificada e a formação das camadas seguintes (**e**) epiderme e (**tc**) tecido conjuntivo.

5.2. Características histológicas do tegumento de acordo com os estágios de muda

O estágio de pós-muda recente (estágio A), ocorreu imediatamente após a muda. Desta forma, observou-se que a epicutícula estava formando a maior parte do exoesqueleto, enquanto que a camada calcificada era pouco evidente mantendo-se ligada a epiderme (figura 2A). Esse fato corrobora com os encontrados por Promwikorn *et al.* (2005) em estudos com *Penaues monodon*, os autores observam que nos (estágio A) existe duas camadas, epicutícula e endocutícula, sendo a epicutícula encontrada em maior proporção. Almeida Neto e Freire (2007), destacam em estudos com *Litopenaeus vannamei* que o exoesqueleto no (estágio A) está semi-calcificado e com alta permeabilidade. Portanto, essas características confirmam a hipótese observada no presente estudo, sendo também confirmada por Chan *et al.* (1988) através do método da setogênese em trabalhos com a espécie *Litopenaeus vannamei*.

No estágio de pós-muda tardia (estágio B) observou-se a manutenção da epicutícula e o aumento da endocutícula (figura 2B). Esse fato também foi relatado por Promwikorn *et al.* (2005) em estudos com *Penaues monodon*, destacando o desenvolvimento da endocutícula em relação ao estágio anterior. A epiderme continuou a manter o contato com a endocutícula, corroborando com as características observadas por Chan *et al.* (1988) através do método da setogênese, sendo que o mesmo autor destaca que no estágio de pós-muda tardia a epiderme ainda mantém o contato com a endocutícula, provavelmente essa característica pode estar relacionada ao fato de que está ocorrendo a deposição de nutrientes na nova endocutícula. Pois, a epiderme é a única constituinte viva do tegumento sendo responsável pela formação das camadas adjacentes.

Para o estágio de intermuda (estágio C) foi observado o maior desenvolvimento da endocutícula e o desprendimento da epiderme (figura 2C). Portanto, essas características confirmam as observadas também pelo método da setogênese por Chan *et al.* (1988). Onde os autores destacam a formação de todas as estruturas do exoesqueleto, tais como, cones, setas nodulos, bases e a formação da linha epidermal.

No estágio de pré-muda recente (estágio D0), observou-se a retração máxima da epiderme (figura 2D). Essa característica também foi observada pelo método da setogênese por Chan *et al.* (1988). Os autores destacam que nesse estágio ocorre o processo de descolamento da epiderme do exoesqueleto, este definido como apólise. Desta forma, nesse espaço liberado pela epiderme ocorre a secreção de enzimas endógenas para degradação do velho exoesqueleto.

Durante o estágio de pré-muda recente (estágio D1), visualizou-se a velha epicutícula, a velha endocutícula e a formação da nova epicutícula (figura 2E). Promwikorn *et al.* (2005), em estudos com *Penaeus monodon*, destaca como característica do estágio D1 a formação de uma camada mebranosa, provavelmente a nova epicutícula observada no presente estudo. No método da setogênese, Chan *et al.* (1988) relata como principal característica desse estágio o aparecimento de novas setas, portanto, essas novas setas surgem a partir da formação da nova epicutícula observada no presente estudo.

Enquanto que no estágio de pré-muda tardia (estágio D2) ocorreu o desprendimento total da velha epicutícula e a formação quase que por completa da nova epicutícula (figura 2F). Smith e Dall (1985), em observações pelo método da setogênese com *Penaeus esculentus*, destacam como características do estágio D2, a secreção da nova epicutícula e as novas setas mais evidente, porém ainda mal formadas. Provavelmente, as setas ainda estão pouco evidente devido a formação incompleta da epicutícula do exoesqueleto, como foi observado durante o atual estudo.

O estágio de pré-muda tardia (estágio D3), ocorre poucas horas antes da ecdise. Portanto, caracterizou-se pelo desprendimento da velha epicutícula, com pequena quantidade da camada calcificada e a nova epicutícula totalmente formada. Entretanto, a nova endocutícula ainda não estava calcificada (figura 2G). Esse fato corrobora com as características relatadas por Smith e Dall (1985), onde os autores destacam que os animais prestes a mudar cessam sua alimentação e intensificam a absorção de água. Este estágio caracteriza-se pelo máximo de reabsorção dos componentes presentes no velho exoesqueleto, este estando muito frágil podendo se romper. Desta forma, o início deste estágio é observado cerca de 12 - 24 horas antes da muda.

5.3. Variação das camadas do tegumento de acordo com o ciclo de muda

Para os dados morfométricos analisados, observa-se que foram significativos ($P < 0.05$) em praticamente todas as camadas do tegumento de acordo com os estágios do ciclo de muda identificados pelo método da setogênese, exceto a epicutícula (Figura 3).

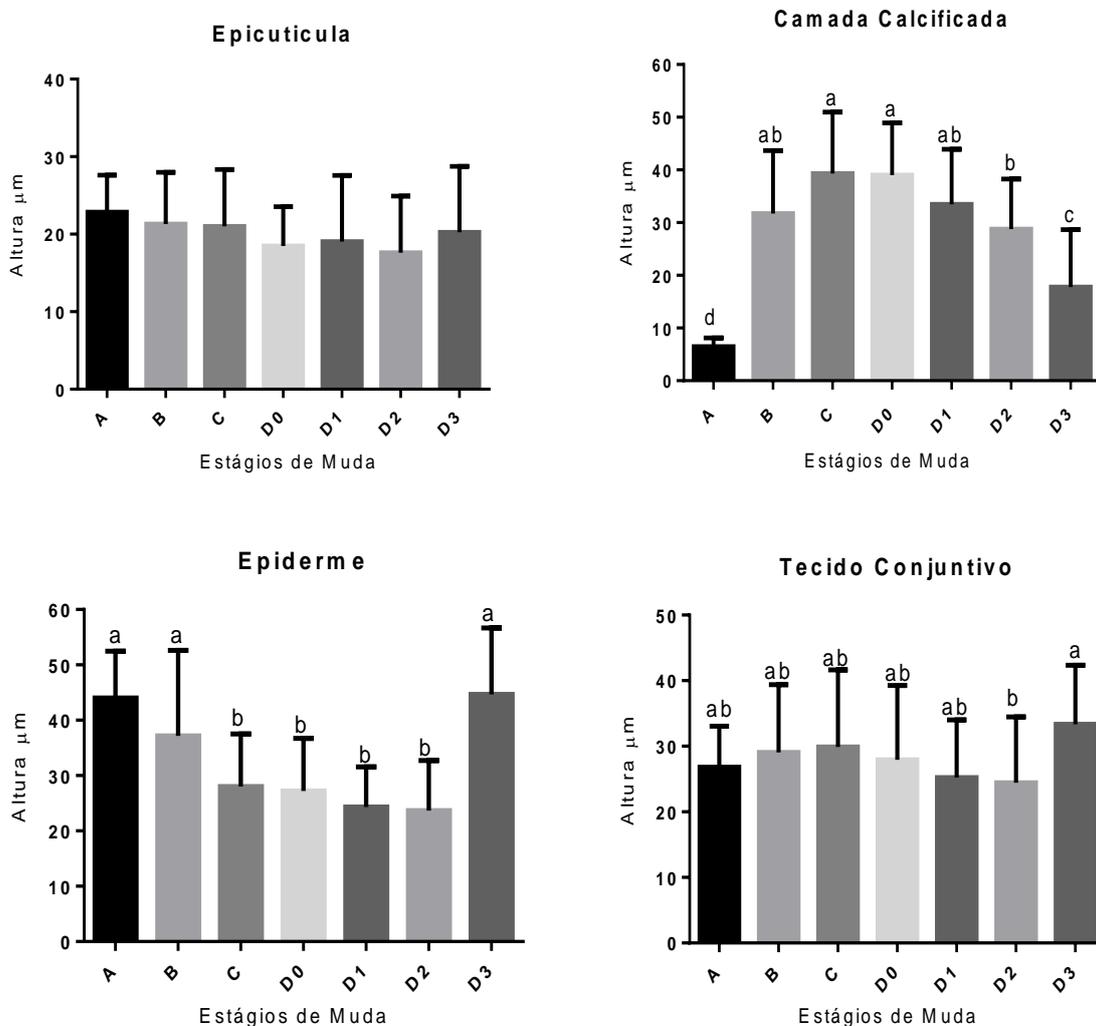


Figura 3. Análise histológica do desenvolvimento das camadas de tegumento em juvenis de *Macrobrachium rosenbergii*, de acordo com os estágios do ciclo de muda. Dados submetidos a análise de variância ANOVA e post test de Tukey a ($P < 0,05$) de probabilidade.

Provavelmente a epicutícula não teve variação devido a sua constituição química como foi supracitado anteriormente por Promwikorn *et al.* (2005) em estudos com *Penaeus monodon*, por ser constituída principalmente de quitina considerado um polímero de difícil absorção pelo animal. No entanto a camada calcificada variou significativamente ($P < 0,05$) durante todo o ciclo de muda obtendo a menor espessura ($6,4 \pm 1,6\mu\text{m}$) no estágio de pós-muda recente (estágio A), chegando ao pico no estágio

de intermuda (estágio C) ($39,3 \pm 11,6\mu\text{m}$), diminuindo significativamente nos estágios de pré-muda (estágios D1, D2, D3). Portanto, esses resultados corroboram com a hipótese de Passano (1960) que destaca que a maior parte do tegumento dos decápodes é formada depois da ecdise e a calcificação começa apenas após a liberação do velho exoesqueleto, fato esse confirmado no presente estudo (figura 2G) e a calcificação da exocutícula começa dentro de poucas horas depois da muda, enquanto ainda está no estágio A (figura 2A).

Almeida Neto e Freire (2007), ainda reafirmam essa hipótese em estudos com *Litopenaeus vannamei*, destacando a correlação entre o estágio de pós-muda A e a textura mole, que pode ser explicada pelo fato de que o exoesqueleto neste estágio estar semi-calcificado e com alta permeabilidade, o que o torna macio. Portanto, as camadas calcificadas do exoesqueleto do camarão, como a epicutícula, a camada pigmentada da endocutícula e, principalmente, a endocutícula, são os responsáveis pela dureza do exoesqueleto como foi observada no atual estudo.

A epiderme variou inversamente a camada calcificada, chegando ao máximo nos estágios A ($44,0 \pm 8,4\mu\text{m}$) e D3 ($44,6 \pm 12,0\mu\text{m}$), e mínimo no estágio C ($27,2 \pm 9,5\mu\text{m}$). Esses resultados corroboram com os encontrados por Promwikorn *et al.* (2007), os autores observaram em estudos bioquímicos do tegumento em *Penaeus monodon* de acordo com os estágios de muda que as células epidermais aumentam em altura e número de células, esse fato foi relacionado com o aumento do armazenamento de carboidratos, proteínas, muco e outras substâncias de regeneração cuticular. Portanto, essas características reafirmam os resultados encontrados no presente estudo de que ocorre intensos processos fisiológicos no tegumento do *M. rosenbergii* nos momentos pré e pós-muda.

Enquanto que a camada de tecido conjuntivo não variou nos estágios de pré e pós-muda. No entanto, segundo Junqueira e Carneiro (2008) o tecido conjuntivo é formado principalmente por matriz extracelular, sendo essa estrutura composta de diferentes combinações de proteínas fibrosas e substâncias fundamentais que pode desempenha diferentes funções no organismo, tais como, preenchimento de espaços entre órgãos, sustentação, defesa e nutrição.

6. CONCLUSÕES

O tegumento do *M. rosenbergii* é constituído de quatro camadas: epicutícula, a camada mais externa do animal responsável por manter o contato com o meio externo. A endocutícula, constituída por uma camada calcificada, formando a maior parte do tegumento; a epiderme formada por uma epitélio estratificado cúbico responsável pela formação das camadas superiores; e o tecido conjuntivo constituído de matriz extracelular responsável pela ligação da epiderme com a camada muscular.

Durante o processo do ciclo de muda ocorreu variação nas camadas do tegumento do *M. rosenbergii*, principalmente na camada calcificada e na epiderme. Sendo observado que a camada calcificada chegou ao pico no estágio de intermuda, diminuindo nos estágios de pré e pós-muda. Enquanto que a epiderme foi o inverso, com o máximo nos estágios de pré e pós-muda e o mínimo no estágio de intermuda.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-NETO, M. E.; FREIRE, A. G. Avaliação de consumo alimentar e textura do exoesqueleto do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) em cultivo comercial, durante o ciclo de muda. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 33, n. 2, p. 147-156, 2007.
- CECCALDI, H. La digestión en los crustáceos. In: MONTEROS, J. E. de los; LABARTA, U. *Nutrición en acuicultura*. España: Industrias Gráficas, v. 1, p. 67-84, 1987
- CHAN, S. M.; RANKIN, S. M.; KEELEY, L. L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biological Bulletin*, v. 175, p. 185-192, 1988.
- CHANG, E. S. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 193, p. 1-14, 1995.
- DENNEL, R. Integument and exoesqueleton. In: WATERMAN. T. (Ed). *The Physiology of Crustacea. Metabolism and Growth*. Academic Press, v. 1, p. 449-472, 1960.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fao statistical yearbook 2016. Trends in the fisheries sector*. Rome. 2016. 146p.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. H. Tecido epithelial. *Histologia Básica*, v. 10, p. 47-68, 2008.
- MOURA, C. M.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. A. A. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. *VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias*, v. 16, n. 1, p. 37-45, 2007.
- PASSANO, L. M. Molting and its Control. In: WATERMAN. T. (Ed). *The Physiology of Crustacea*, v. I: *Metabolism and Growth*. Academic Press, 1960. p. 473-536.
- PROMWIKORN, W.; BOONYOUNG, P.; KIRIRAT, P. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci. Technol*, v. 27, n. 3, p. 765-772, 2005.
- PROMWIKORN, W.; KIRIRAT, P.; INTASARO, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Changes in integument histology and protein expression related to the molting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and*

- Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 148, n. 1, p. 20-31, 2007.
- ROBERTSON, L.; BRAY, W.; TRUJILLO, J. L.; LAWRENCE, A. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. Journal of the world aquaculture society, v. 18, n. 3, p. 180-185, 1987.
- RAMOS A. H.; SANTOS, L. M.; MIGLINO M. A.; PERES J. A.; GUERRA R. R. Biometria, histologia e morfometria do sistema digestório do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre. Biotemas, v. 24, p. 111-119, 2011.
- SKINNER, D. M. Molting and regeneration. In: BLISS, D. E. The Biology of Crustacea, v. 9: Integument, Pigments, and Hormonal Processes. Academic Press, 1985. p. 43-146.
- SMITH, D. M.; DALL, W. Moulting the tiger prawn *Penaeus esculentus*. In: Second Australian National Prawn Seminar. Rothlisberg, P. C.; Hill, B. J.; Staples, D. J. (Editors). Cleveland. Australia. p. 85-95, 1985.
- VALENTI, W. C. Carcinicultura de água doce como agronegócio. In: I CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, Vitória, 2004. Anais...52.
- VALENTI, W. C. 2001. A modernização da carcinicultura de água doce. Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarões, abril de 2001. 56-58p.
- VALENTI, W. C. Criação de camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, v. 22, p. 757-785, 1990.
- VALENTI, W. C. Criação de camarões em águas interiores. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina veterinária e Zootecnia, 1996.
- VALENTI, W. C.; MELLO, J. D. T. C. D.; CASTAGNOLLI, N. Efeito da densidade populacional sobre as curvas de crescimento de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) em cultivo semi-intensivo (Crustacea, Palaemonidae). Revista brasileira de Zoologia, p. 427-438, 1993.
- VALENTI, W. C. Carcinicultura de água doce: Tecnologia para a produção de camarões. 1998.