

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**EFEITO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS E
CARBOFURANO NO METABOLISMO DE ROTINA DO CAMARÃO (*PALAEMON*
PANDALIFORMIS, STIMPSON, 1871).**

Kelson Venício Brito Alves

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA -
SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Aquicultura e Pesca

São Paulo
Abril - 2018

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

"EFEITO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES
MÚLTIPLAS E CARBOFURANO NO METABOLISMO DE ROTINA
DO CAMARÃO *PALAEMON PANDALIFORMIS*"

AUTOR: Kelison Venício Brito Alves

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edison Barbieri

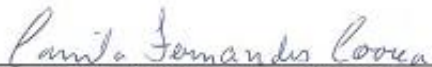
Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Edison Barbieri



Prof. Dr. Cristiane Ottoni



Prof. Dr. Camila Fernandes Correia

Data da realização: 25 de maio de 2018



Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Edison Barbieri

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

B862e

Brito, Kelison Venício

Efeito dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano no metabolismo de rotina do camarão (*Palaemon pandaliformis*) Stempson, 1871. / Kelison Venício Brito. – São Paulo, 2018.
iv, 39f.; il..gráf.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Edison Barbieri

1. Nanoecologia. 2. Nanomateriais. 3. Agrotóxicos. 4. Consumo de oxigênio.
5. Excreção de amônia. Barbieri, Edison II. Título.

CDD 574.3

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Edison Barbieri por todo apoio e dedicação prestado na minha formação como aluno de Iniciação Científica até os dias de hoje como aluno de pós-graduação. Tenho enorme admiração e orgulho por ter sido aluno deste grande pesquisador e professor. Sem seu apoio não teria tido a oportunidade de ingressar na vida acadêmica em Cananeia.

Aos funcionários e pesquisadores do Instituto de Pesca, em especial a equipe da base de apoio de Cananeia. Em particular, agradeço ao senhor Dito Alves por todo apoio prestado.

A Dr^a. Karina Rezende, M.^a Aline Zigiotto e a Mestranda Larissa Y. Roselli, companheiras de laboratório, pela ajuda, incentivo e ensinamentos. Ao Especialista e Mestrando Ricardo Mendes companheiro de laboratório, pela sua amizade de longa data, incentivo a seguir estudando, apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos de graduação em especial a Emily e Adevanil e Prof^a. Dr^a. Andreia Barbosa, pelo apoio prestado na minha graduação e incentivo a cursar e seguir a carreira acadêmica.

A minha família Alves em especial que me apoiaram durante esta jornada. Em particular mãe Eliane Rosa de Brito Alves e pai Roberto Alves, por todo apoio e incentivo emocional e financeiro. Sem vocês eu não teria conseguido cursar o mestrado. Tenho orgulho de vocês pelas pessoas maravilhosas que são!

Agradeço a amizade de todos! Cada frase e página desta dissertação está repleta com sentimento de paz, alegria e apoio! “Obrigado Deus, por toda força divina”

Brother let me be your shelter. I'll never leave you all alone. I can be the one you call. When you're low. Brother let me be your fortress. When the night winds are driving on. Be the one to light the way. Bring you home.

(Brother - Needtobreathe)

Obrigado

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO.....	ii
RESUMO GERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVO GERAL	7
OBJETIVO ESPECÍFICO	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS:	7
CAPÍTULO 1 - Efeito dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano no metabolismo de rotina do Camarão (<i>Palaemon pandaliformis</i> , Stimpson, 1871).	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT:	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
Coleta e Manutenção do organismo teste	17
Nanomaterial e pesticida	18
Consumo Específico de Oxigênio	18
Excreção Específica de Amônia	19
Análises Estatísticas	19
RESULTADOS	20
Consumo de oxigênio.....	20
Excreção de amônia.....	22
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO.....	29
BIBLIOGRAFIA.	30

RESUMO GERAL

Nas últimas décadas constatou-se que a degradação dos ecossistemas aquáticos está ligada diretamente com a emissão de rejeitos domésticos, industriais e agrícolas. Entre eles encontramos, por exemplo, agrotóxicos como o carbofurano, da família carbamato, e nanomateriais manufaturados, como os nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Com o aumento da produção destes materiais torna-se inevitável o efeito à saúde humana e ao meio ambiente. Desta forma este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos subletais dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do carbofurano e de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano utilizando-se como marcador biológico o consumo de oxigênio, a excreção de amônia em *Palaemon pandaliformi*.

Palavras-chave: nanoecotoxicologia, nanomateriais, agrotóxico, consumo de oxigênio, excreção de amônia.

GENERAL ABSTRACT

In the last decades it has been verified that the degradation of the aquatic ecosystems is linked directly with the emission of domestic, industrial and agricultural waste. These include, for example, agrochemicals such as carbofuran from the carbamate family and manufactured nanomaterials such as multi-walled carbon nanotubes. As the production of these materials increases, the effect on human health and the environment is inevitable. Because there is not only a pollutant in the environment, it is necessary to understand the interaction of these materials and their effects on biota, in order to better understand the potential deleterious effects they may cause. Thus, this study aimed to evaluate the sublethal effects of multiple walled carbon nanotubes, of carbofuran and multiple walled carbon nanotubes and carbofuran using as biomarker oxygen consumption, ammonia excretion in *Palaemon pandaliformis*.

Key-words: nanoecotoxicology, nanomaterials, agrototoxic, oxygen consumption, ammonia excretion.

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, o crescimento da industrialização tem sido um dos fatores responsáveis pelo grande aumento das atividades antrópicas sobre os recursos naturais. Praticamente todos os ecossistemas do planeta foram afetados de alguma forma pelas atividades humanas, como por exemplo, a contaminação dos biomas aquáticos (Goulart e Callisto, 2003; Pinto *et al.* 2013).

A degradação dos ecossistemas aquáticos está ligada diretamente com a emissão de rejeitos domésticos, industriais e agrícolas (Martinez e Cólus, 2002). Os nanomateriais, poluentes emergentes, são exemplos de substâncias às quais os animais aquáticos estão expostos (Paschoalino, 2010; Nogueira *et al.*, 2015), e o aumento da utilização dessa tecnologia pode trazer contaminação ao meio ambiente e a biota aquática. Atualmente os nanomateriais, são utilizados em diferentes setores industriais, como farmacêuticos, têxteis, cosméticos, eletrônicos e ambientais (Paschoalino, 2010; Gambardella *et al.*, 2015). Por possuírem um tamanho diferenciado, nanomateriais como os nanotubos de carbono, são promissores nos setores industriais, pois apresentam características distintas em suas propriedades ópticas, químicas e físicas (Dresselhaus *et al.*, 2001).

A utilização de nanomateriais na aquicultura tem favorecido a melhoria de técnicas que são capazes de resolver diversos problemas, por exemplo, aqueles ligados à saúde animal, reprodução, produção, prevenção e tratamentos decorrentes de agentes patogênicos (Rather *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2015), além de sua aplicação em tanques de aquicultura para maior eficiência na produção (Chang *et al.*, 2010) e melhoramento de filtros, o que confere melhor qualidade da água (Handy *et al.*, 2011).

O uso de nanomateriais, como nanotubos de carbono de paredes múltiplas, já demonstrou sua eficiência no setor da aquicultura, porém estudos anteriores mostraram que esses materiais podem ser maléficos, quando absorvidos pelos organismos aquáticos e em contato com a epiderme (Oberdorster *et al.*, 2005; Paschoalino *et al.*, 2010); além disso, o aumento do descarte incorreto das nanopartículas manufaturadas em ecossistemas naturais deve ser analisado, com o objetivo de diminuir os impactos no meio ambiente, e sua utilização deve ser feita de modo responsável para que sejam reduzidos os efeitos nocivos à saúde humana (Handy, 2012; Becaro, 2013), já que existe um amplo interesse no seu potencial

econômico, tecnológico e científico (Geim e Novoselov, 2007; Klaine *et al.*, 2008; Johnston *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2014; Campos-Garcia *et al.*, 2016).

A partir da década de 40, o aumento da utilização de pesticidas orgânicos na agricultura promoveu maior capacidade produtiva com melhor qualidade, atendendo ao aumento da demanda nos setores alimentícios (Branco, 1988). Entretanto, Bull e Hathaway (1986) observaram que quanto maior a utilização de agrotóxicos de maneira errônea, em doses elevadas ou excessivas, mais estes compostos intensificavam os problemas ambientais.

O carbamato é um agrotóxico muito utilizado na agricultura brasileira como pesticida, pois apresenta uma maior eficiência no controle de pragas agrícolas, atuando por contato direto ou após sua ingestão (FMC, 1997). Porém, com a ação dos fenômenos naturais, como por exemplo, as chuvas nas plantações e o transporte de substâncias do solo para os leitos aquáticos encontraram o carbamato na fauna aquática como seu destino final (Paschoalino, 2010).

O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) é um inseticida da família dos carbamatos, que possui alta toxicidade para invertebrados e vertebrados aquáticos, sendo diariamente aceitável na ingestão de 0 a 0,002 mg/Kg/dia, sendo estabelecido limite máximo de $7\mu\text{gL}^{-1}$ (World Health Organization, 1996). Esta substância pode ser facilmente degradada no ambiente, porém proporciona efeitos deletérios em espécies não-alvo, antes que haja sua dissipação ambiental (Moreira *et al.*, 2004).

Devido aos efeitos nocivos às espécies não-alvo, o carbofurano foi proibido nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006) mas no Brasil continua sendo utilizado na agricultura (Alves, 2001; Grutzmacher *et al.*, 2008; Mansano *et al.*, 2013). Sabendo-se da grande utilização de Carbofurano na agricultura brasileira (Mansano *et al.*, 2013), e da intensificação industrial para elaboração de novos nanomateriais (Gambardella *et al.*, 2015), criou-se a necessidade de investigar os efeitos causados por essas substancias, realizando testes agudos de exposições simples e combinadas, a fim de observar e analisar seus reais efeitos em organismos aquáticos e prever os possíveis efeitos tóxicos quando ambas substancias forem descartadas separadamente no ambiente e, da mesma forma, prever a possível interação de ambos xenobióticos e seus efeitos deletérios quando expostos na biota aquática.

A espécie *Palaemon pandaliformis*, pode ser considerada um bioindicador da qualidade da água em ambientes dulcícolas, por ser uma espécie de ampla distribuição

no litoral brasileiro (De Melo, 2003), e sensível a poluentes (Duran *et al.*, 2015b), portanto esta espécie foi utilizada para avaliar e determinar os efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano e a interação de ambos em seu metabolismo.

Assim, elaborou-se o artigo, intitulado “Efeito dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, carbofurano e suas interações no metabolismo de rotina do Camarão (*Palaemon pandaliformis*, Stimpson, 1871)”, o qual será apresentado na forma de capítulo desta dissertação.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e do carbofurano, e a interação entre ambas as substâncias no metabolismo de rotina na espécie de camarão de água doce, *Palaemon pandaliformis*, utilizando-se como marcador fisiológico o consumo específico de oxigênio e a excreção específica de amônia, estudando se há ou não aumentos ou diminuições quando expostos aos xenobioticos empregados.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Observar o comportamento dos camarões de água doce da espécie, *Palaemon pandaliformis*, quando em contato com as nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano.

Auxiliar na identificação dos efeitos tóxicos no metabolismo de rotina do *Palaemon pandaliformis*, utilizando como marcadores biológicos o consumo de oxigênio e excreção de amônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Alves G.G., 2001. Agrotóxicos no Vale do Ribeira. Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA).

Bull D., Hathaway D., 1986. Pragas e venenos: Agrotóxicos no Brasil e no terceiro Mundo. Petrópolis: Vozes/Oxfam/Fase.

Campos-Garcia J., Martinez D.S.T., Rezende K.F.O., Da Silva J.R.M.C., Alves O.L., Barbieri E., 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile Tilapia exposed to carbofuran and multi walled carbon nanotubes. *Ecotoxicology and Environmental Safety Journal*. 133, 481- 488.

Chang C.C., Hsu I.K., Aykol M., Hung W.H., Chen C.C., Cronin S.B., 2010. A new lower limit for the ultimate breaking strain of carbon nanotubes. *ACS. NANO*. 4. 5095 - 5100.

DE Melo G.A.S., 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Editora Loyola. São Paulo.

Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Avouris P., 2001. Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications. *Topics in Applied Physics*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Durán N., Martinez D.S.T., Silveira C.P., Durán M., De Moraes A.C.M., Simões M.B., Alves O.L., Fávaro W.J., 2015. Graphene oxide: a carrier for pharmaceuticals and a scaffold for cell interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 15(4); 309 - 327

FMC, 1977. Carbofuran Data Summary. FMC. Corporation. Philadelphia. 97, 1 - 9.

Gambardella C., Costa E., Piazza V., Fabbrocini A., Magi E., Faimali M., Garaventa F., 2015. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*. 111, 41-49.

Geim A.K., Novoselov K.S., (2007). The Rise of Graphene. *Nature Materials*. 6, 183 - 191.

Goulart M.E., Callisto M., 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*. 2(1); 153 - 164.

Grützmacher D.D., Grützmacher A.D., Agostinetto D., Loeck A.E., Roman R., Peixoto S.C., Zanella R., 2008. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no Sul do Brasil. *Revista Engenharia Agrícola e Ambiental*. 12(6); 632 - 637.

Handy R.D., Al-bairuty G., Al-jubory A., Ramsden C.S., Boyle D., Shaw B.J., Henry T.B., 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: A target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*. 79(4); 821 - 853.

Branco S.M., 1988. *O Meio Ambiente em Debate*, editora Moderna, São Paulo.

Kleiner, K., Hogan, J., 2003. How safe is nanotech?. *New Scientist*. 177, 14 - 15.

Mansano A.S., Moreira R.A., Rocha O. Toxicidade aguda do agrotóxico carbofurano ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* daday, 1902. *Saúde Saneamento e Meio Ambiente*. 9(11); 91 - 103.

Martinez C.B.R., Cólus I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para monitoramento da poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: Moacyr, E., Bianchini, E., Shibatta, A, O., Pimenta, J, A. (Eds), *A Bacia do Rio Tibagi*. MC. Gráf., Londrina. 49. pp. 551 - 577.

Nogueira V., Lopes I., *et al.*, 2015. Assessing the ecotoxicity of metal nano-oxides with potential for waste water treatment. *Environmental Science Pollution Research*. 22, 13212 - 13224.

Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 113(7); 823 - 839.

Paschoalino M.P., Marccone G.P.S, Jardim W.F., 2010. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*. 33(2); 421 - 430.

Pinto A.M.T.P., Hirdes L.M., Sanches Filho P.J., 2013. Determinação de metais pesados nos camarões (*Farfantepenaeus paulensis*) consumidos na cidade de Pelotas-RS. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 8(1); 129 - 134.

Pope C.A., Burnett R.T., Thurston G.D., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Godleski J.J., 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: Epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 109(1); 71 - 77.

Prestes, E.B., Clemente Z., Castro V.L.S.S., Jonsson C.M., 2013. Avaliação da toxicidade aguda de Piraclostrobin, Epoxiconazol e sua Mistura em *Colossoma macropomum* (Tambaqui). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 8(1); 125 - 128.

Rather M.A., Sharma R., Aklakur M., Ahmad S., Kumar N., Khan M., Ramya, V.L., 2011. Nanotechnology: A novel tool for aquaculture and fisheries development: a prospective mini-review. *Fisheries and Aquaculture Journal*. 16,1 - 15.

USEPA, 2006. Interim registration eligibility decision - carbofuran. U.S.A. Environmental Protection Agency, Washington.

World Health Organization, 1996. Guidelines for drinking-water quality. Geneva 2. Health Criteria and other Supporting Information. 2, 940 - 946.

CAPÍTULO 1

Efeito dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano no metabolismo de rotina do Camarão (*Palaemon pandaliformis*, Stimpson, 1871).

Efeito dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano no metabolismo de rotina do Camarão (*Palaemon pandaliformis*, Stimpson, 1871).

Autores: Kelison Venicio Brito Alves ¹, Edison Barbieri ^{2*}

¹ Programa de Pós Graduação do Instituto de Pesca-SP-APTA SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000 – Cananeia, SP, Brazil.

² Instituto de Pesca – APTA SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000 – Cananeia, SP, Brazil.

*Corresponding author at:

Instituto de Pesca – APTA- SAA/SP, Caixa Postal 157, SP 11990-000 – Cananeia, SP, Brazil. E-mail address: edisonbarbieri@yahoo.com.br (Edison Barbieri).

RESUMO

Sabendo-se da possível contaminação dos leitos aquáticos por nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano, criou-se a necessidade de investigar os reais efeitos desses xenobioticos quando expostos no ambiente aquático. Neste contexto o objetivo deste trabalho, foi avaliar os efeitos da exposição simples de nanotubos de carbono de paredes múltiplas 0.0; 0.001; 0.1; 0.5 e 1.0 mg/L, de carbofurano 0.0; 0.0001; 0.001; 0.005 e 0.01 mg/L e da interação por meio do uso das mesmas concentrações de carbofurano acrescidas de 0.1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, analisando como biomarcador o consumo de oxigênio e excreção de amônia do camarão, *Palaemon pandaliformis*, expostos durante 24 horas. As exposições a diferentes concentrações de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e de carbofurano, de forma isolada, causaram aumento do consumo de oxigênio e da excreção de amônia em todas as concentrações empregadas, quando comparadas aos grupos controles sem adição de xenobiótico. Ao observar o consumo de oxigênio na exposição combinada de carbofurano acrescida de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, observou-se que os efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, e do carbofurano aumentaram, quando comparados com as suas respectivas exposições simples. Ao analisar a excreção de amônia comparando as exposições simples com as exposições combinadas não observamos diferenças na excreção de amônia. Concluimos nesse

estudo que os efeitos subletais dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, e do carbofurano e quando ambos se interagem, demonstraram ser prejudicial à espécie de camarão de água doce, *Palaemon pandaliformis*. São necessários mais estudos para investigar os reais efeitos tóxicos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e do carbofurano quando expostos ao ambiente aquático.

Palavras Chaves: nanoecotoxicologia, carbofurano, consumo de oxigênio, excreção de amônia, metabolismo de camarões.

Effect of multiple-walled carbon nanotubes and carbofuran on routine shrimp metabolism (*Palaemon pandaliformis*, Stimpson, 1871).

ABSTRACT:

Knowing the possible contamination of the aquatic beds by multiple-walled carbon nanotubes and carbofuran, it was necessary to investigate the real effects of these xenobiotics when exposed in the aquatic environment. In this context the objective of this work, it valued the effects of the simple exhibition of multi-walled carbon nanotubes 0.0; 0.001; 0.1; 0.5 and 1.0 mg/L, of carbofuran 0.0; 0.0001; 0.001; 0.005 and 0.01 mg/L and the interaction through the use of the same concentrations of carbofuran added of 0.1 mg/L of multi-walled carbon nanotubes, analyzing how biomarkes the consumption of oxygen and excretion of ammonical of the shrimp, *Palaemon pandaliformis*, exposed during 24 hours. The exhibitions to different concentrations of multi-walled carbon nanotubes and of carbofuran, in the isolated form, they caused increase of the consumption of oxygen and of the excretion ammonical in all the employed concentrations, when controls were compared to the groups without addition of xenobiotics. While observing the consumption of oxygen in the combined exhibition of carbofuran added of multi-walled carbon nanotubes, it was noticed that the effects of the multi-walled carbon nanotubes and of the carbofuran they increased, when compared with his respective simple exhibitions. While analyzing the excretion of ammonical comparing the simple exhibition with the combined exhibitions we do not observe differences in the ammonical excretion. We end in this study that the sublethal effects of the multi-walled carbon nanotubes and of

the carbofuran and whe both if they interact, demonstrated to be damaging to the sort of shrimp of fresh water, *Palaemon pandaliformis*. More studies are necessary to investigate the real toxic effects of multi-walled carbon nanotubes and of the carbofuran when exposed to the aquatic environment.

Key words: nanoecotoxicology, carbofuran, oxygen consumption, ammonia excretion, shrimp metabolism

INTRODUÇÃO

Os nanomateriais manufacturados possuem propriedades únicas específicas, as quais diferem da encontrada na natureza (Handy *et al.*, 2011), além disto, possuem uma maior facilidade em se ligar a outros compósitos (Guazelli e Perez, 2009), dentre as diversas classificações de tamanho dos nanomateriais a escala de tamanho compreendida entre 1 a 100nm é a mais descrita (Moore, 2006; Smith, 2007; Masciangioli e Zhang, 2013; Roco, 2013), contudo, muito embora exista a crescente, ainda não se sabe ao certo a toxicidade desses nanomateriais, quando expostos ao meio ambiente aquático (Martinez e Alves, 2013).

Com a utilização de nanomateriais por diversos setores industriais são de grande interesse na elaboração de novos produtos com distintos comportamentos (Handy *et al.*, 2011). Entretanto existem poucos estudos com relação a sua toxicidade nos ambientes e o que causam nos processos fisiológicos dos animais aquáticos (Britto *et al.*, 2012). Todavia, há um aumento na utilização dos nanomateriais em produtos rotineiros como, fármacos, têxteis, látex, alimentos e tecnologias, (Paschoalino, 2010).

Para a engenharia de aquicultura, os nanomateriais estão ligados diretamente na criação de novas gaiolas de peixes, mais resistentes ao ambiente e, filtros modernos com maior capacidade de limpeza da água em tanques (Handy *et al.*, 2011). Na aquicultura a dispersão desses xenobióticos no meio aquático é facilitada por desgastes.

Klaper *et al.*, (2010) destacam que os nanomateriais manufacturados atingem com facilidade a biota aquática, o que torna fundamental determinar se estes nanomateriais irão causar impactos a esses organismos.

Estudos sugerem que os nanomateriais podem ter uma permeabilidade maior através da epiderme, membranas celulares e mucosas de invertebrados e vertebrados

aquáticos, já que possuem pequena dimensão, reatividade química elevada e propriedades físicas e ópticas distintas (Dresselhaus *et al.*, 2001)., Além disso, os nanomateriais possuem efeito tóxico ampliado quando em contato com outros xenobióticos, devido principalmente a sua maior área superficial em comparação às partículas maiores (Oberdorster *et al.*, 2005; Paschoalino *et al.*, 2010), o que confere maior aderência de outras moléculas, facilitando o transporte de outros poluentes pelo ambiente (Kleiner *et al.*, 2003).

Ao analisar estudos anteriores com invertebrados aquáticos, *Palaemonetes pugio*, *Mercenaria mercenária*, *Llyanassa obsoleta*, *Leptocheirus plumulosus*, expostos a 5 mg/L de nanopartículas de ouro e *Leptocheirus plumulosus* expostos a 1000; 1500 e 2000 ug.g de óxido de zinco; óxido de níquel e óxido de cobre, *Artemia Salina*, *Daphnia magna* expostos a 8,2; 10,2; 12,8; 16,0 e 20,0 mg/L de nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de ferro, foi observada a toxicidade aguda das nanopartículas e seus efeitos deletérios em todos os organismos-testes analisados (Ferry *et al.*, 2009; Ates *et al.*, 2013 a; Hanna *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2015).

Gambardella *et al.* (2015), ao investigarem os efeitos tóxicos da nanopartículas de prata sobre a *Amphisobalanus amphitrite* e *Artemia salina*, constataram que houve mortalidade em 48 horas após exposição as concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 50 mg/L, além de alteração da capacidade natatória. Ferry *et al.* (2009), ao expor o *Palaemonetes pugio* a concentrações de nanopartículas de ouro, verificou alterações nas branquias, confirmando a toxicidade desse material frente ao organismo-teste. Ao estudar a espécie *Leptocheirus plumulosus* expostos a diferentes concentrações de nanopartículas de cobre, Hanna *et al.* (2013) verificaram mortalidade em diferentes concentrações, além de acumulação nos anfípodes. Park *et al.* (2014) também observaram mortalidade de 43% em 96 horas de exposição da espécie *Tigriopus japonicus* em concentração de 40 mg/L. Entretanto, Nogueira *et al.* (2015) ao exporem *A. salina* a concentrações entre 8,2 e 20 mg/L de nanopartículas de dióxido de titânio, não observaram nenhum efeito tóxico em 96 horas de exposição. Entretanto, ao comparar com o estudo de Ates *et al.*, (2013) ao expor *A. salina* em diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de zinco, observou bioacumulação e mortalidade quando se aumentava a concentração e o tempo de exposição sendo a maior de 100 mg/L até 96 horas.

Sabendo-se da toxicidade dos nanomateriais quando em contatos com organismo aquáticos (Handy *et al.*, 2008a), intensificou-se a necessidade de avaliar os

possíveis efeitos deletérios e toxicidade dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, quando em contato simples com a espécie de Camarão *Palaemon pandaliformis*, e também em interação com o carbofurano. Além das nanopartículas manufaturadas, os organismos aquáticos estão expostos a outros agrotóxicos (Barbieri *et al.*, 2013), como o carbofurano, um carbamato muito conhecido no Brasil (Barbieri *et al.*, 2013) e utilizado como pesticida (FMC, 1997). O carbofurano é facilmente degradado, porém pode provocar efeitos nocivos em espécies não alvos antes que ocorra a dispersão no ambiente, assim apresenta alta toxicidade (World Health Organization, 1996; Moreira *et al.*, 2004). Os efeitos tóxicos do carbofurano são semelhantes aos de outros carbamatos, uma vez que inibem a produção de acetilcolinesterase nas junções sinápticas e neuromusculares (Jash e Bhattacharaya, 1983).

De acordo com Pinto *et al.* (2013), a fauna aquática sofre grandes impactos causados pela ação antrópica nos arredores dos ambientes aquáticos, pois essas ações resultam na contaminação por diversos xenobióticos. Barbieri (2007), Barbieri e Paes (2011) sugerem que estudos a respeito do metabolismo de rotina em peixes e camarões podem ser essenciais para avaliar a qualidade do ambiente em que estes animais estão inseridos.

Os camarões da espécie *Palaemon pandaliformis*, da família Palaemonidae, popularmente conhecido como Camarão Branco, Fantasma ou Potitinga, ocorre desde o sul do Brasil até a Guatemala (De Melo, 2003). A espécie é detritívora de hábito bentônico e pequeno porte. Geralmente, são encontrados no substrato dos manguezais, próximo às raízes da vegetação marginal e apresentam grande importância para o ecossistema (Coelho, 1963; 1964; Bond-Buckup e Buckup, 1999).

O *Palaemon pandaliformis* é considerado um ótimo bioindicador da poluição de origem antrópica em ambientes aquáticos, já que está intimamente relacionada ao sedimento, onde é capaz de assimilar os xenobióticos biomagnificando-os ao longo da cadeia (Martins *et al.*, 2006). Por esse motivo muitas espécies de crustáceos são usadas em estudos de toxicidade, já que conferem sensibilidade as alterações ambientais (Barbieri e Paes, 2011).

Neste trabalho analisaram-se os efeitos do carbofurano, dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e a interação entre as duas substâncias, avaliando seus efeitos deletérios no metabolismo de rotina do camarão *Palaemon pandaliformis*, seguindo o pressuposto de que a modulação das duas substâncias, em conjunto,

provocaria alterações no consumo de oxigênio e excreção de amônia para a espécie em exposição aos xenobióticos.

O elucidar destas questões pode auxiliar no monitoramento de fontes poluidoras, atenuando os danos ao ambiente onde são descartados os resíduos tóxicos (Becaro, 2013).

A hipótese do presente estudo foi que com a exposição combinada dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano haveria potencialização dos efeitos quando expostos juntos no metabolismo da espécie de camarão, *Palaemon pandaliformis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e Manutenção do organismo teste

Espécimes do camarão *Palaemon pandaliformis* foram coletados com auxílio de rede de puçá e peneira, durante a maré baixa, nas margens do rio Mandira, localizado dentro dos limites da Reserva Extrativista do Mandira, coordenada geográfica (25° 0,58.95'' S, 48° 0'13.79'' W), município de Cananeia, estado de São Paulo, e transportados para o laboratório de Estudos Ecotoxicológicos do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul, Instituto de Pesca em Cananeia.

Os indivíduos coletados foram alocados em tanques circulares com capacidade de 1.000 Litros devidamente higienizados, e passaram por um período de aclimação, com duração mínima de 2 semanas (14 dias), em temperatura controlada de 20°C (\pm 2°C) com aeração constante, e renovação diária de água desclorada.

Os *P. pandaliformis* foram alimentados regularmente com ração extrusada específica para camarões e submetidos a um jejum de 24 horas, antes de serem utilizados nos experimentos de metabolismo de rotina.

Os organismos testes utilizados neste estudo, foram escolhidos e manuseados nos experimentos segundo as recomendações da USEPA (2002).

Características físico-químicas da água

A característica da água utilizada para os experimentos foram: pH 6,8 (\pm 0,3); oxigênio dissolvido 6,3 (\pm 0,2mg/L); dureza entre 46 e 48 mg de CaCO₃/L; condutividade elétrica 42 (\pm 2,4) μ S cm⁻¹. A condutividade elétrica foi determinada por

meio de um condutivímetro portátil, previamente calibrado com solução padrão de 1413 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

Nanomaterial e pesticida

O pesticida empregado foi o carbofurano de padrão analítico (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) (99,5%, Sigma) (Campos e Barbieri, 2013). Enquanto que o nanomaterial empregado foi o nanotubos de carbono de paredes múltiplas, fornecido pelo Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química - UNICAMP. (IJIMA, 1991).

Este nanomaterial é constituído de folhas de grafenos enroladas de maneira a formar uma peça cilíndrica com diâmetro próximo de 1 nanometro, o mesmo foi crescido de deposição de vapor químico e comercialmente disponibilizado (CDV) por [Ctube 100, CNT Co. Ltd., Incheon - South Korea], foi oxidado com ácido nítrico, na intenção de gerar grupos oxigenados na superfície dos nanotubos e melhorar sua dispersão em água (Martinez *et al.*, 2013).

Consumo Específico de Oxigênio

Um total de 75 camarões foram submetidos aos ensaios de metabolismo de rotina e avaliados pelo consumo específico de oxigênio, no intuito de analisar os efeitos subletais dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano. Para isso separaram-se 5 grupos para o teste do nanotubos de carbono de paredes múltiplas contendo 5 animais em cada grupo com peso médio úmido de 0,20 gramas (± 2 gramas), de acordo com o seguinte delineamento:

- Controle: 0,0 mg/L; Grupo 1: 0,001 mg/L; Grupo 2: 0,1 mg/L; Grupo 3: 0,5 mg/L; Grupo 4: 1,0 mg/L.

Para os testes do carbofurano, outros 5 grupos, contendo 5 animais em cada com peso médio úmido de 0,20 gramas (± 2 gramas), foram formados de acordo com o delineamento seguinte:

- Controle: 0,0 mg/L; Grupo 1: 0,0001 mg/L; Grupo 2: 0,001 mg/L; Grupo 3: 0,005 mg/L; Grupo 4: 0,01 mg/L.

Para a avaliação da interação entre as duas substâncias seguiu-se o mesmo procedimento adotado para o carbofurano, porém acrescentadas de nanotubos de carbono

de paredes múltiplas na concentração de 0,1 mg/L, totalizando 1 grupo controle 0,0 mg/L e 4 experimentais.

No início de cada experimento foram separados cinco aquários, sendo um para cada grupo, contendo 3 litros de água filtrada com aeração constante, mantidos a 22 ± 1 °C, e os contaminantes adicionados com o auxílio de pipetas de precisão, para obter-se a concentração final determinada e garantir a homogeneidade na distribuição.

Passados 10 minutos desse procedimento, inseriram-se os indivíduos de *P. pandaliformis* nos aquários e após 24h de exposição aos contaminantes, os camarões foram separados em respirômetros cilíndricos com volume de 180 ml, sendo um indivíduo por aparelho, os quais foram mantidos em sistema com circulação constante de água por 30 minutos, para diminuir o estresse causado pelo manuseio. Em seguida, os respirômetros foram fechados, interrompendo o fluxo interno de água a fim de isolar o sistema. Após uma hora, coletaram-se imediatamente as amostras de água dos respirômetros, para a análise do consumo de oxigênio.

O consumo específico de oxigênio foi determinado segundo o método de Winkler (1888), através da diferença das concentrações de oxigênio dissolvido entre o início e o final de uma hora com o volume do respirômetro, a massa úmida dos indivíduos e o tempo de confinamento ($\text{mLO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

As concentrações dos xenobióticos foram determinadas através de estudos prévios realizados no laboratório e das concentrações encontradas na água da região Marques *et al.*, (2007).

Excreção Específica de Amônia

As amostras de água coletadas para análise da excreção de amônia foram realizadas simultaneamente com as coletas de consumo específico de oxigênio.

A excreção de amônia foi determinada pela diferença entre as concentrações de nitrogênio amoniacal inicial e final de uma hora, de acordo com o volume do respirômetro, a massa úmida do *P. pandaliformis* e o tempo de confinamento ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método de Nessler (Greenberg, 1995).

Análises Estatísticas

As médias do consumo específico de oxigênio e da excreção de amônia dos camarões foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com confiabilidade de 95%, e ao teste de homocedasticidade de Levene. Posteriormente, aplicou-se o teste ANOVA para comparar os tratamentos e o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Consumo de oxigênio

A exposição dos camarões as concentrações de nanotubos de carbono de paredes múltiplas apresentou um aumento do consumo específico de oxigênio em todas as concentrações empregadas. Na concentração de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, houve o maior valor do consumo de oxigênio em relação ao controle (Figura 1). Todas as concentrações de nanotubos de carbonos de paredes múltiplas estudadas apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle no consumo específico de oxigênio (Figura 1).

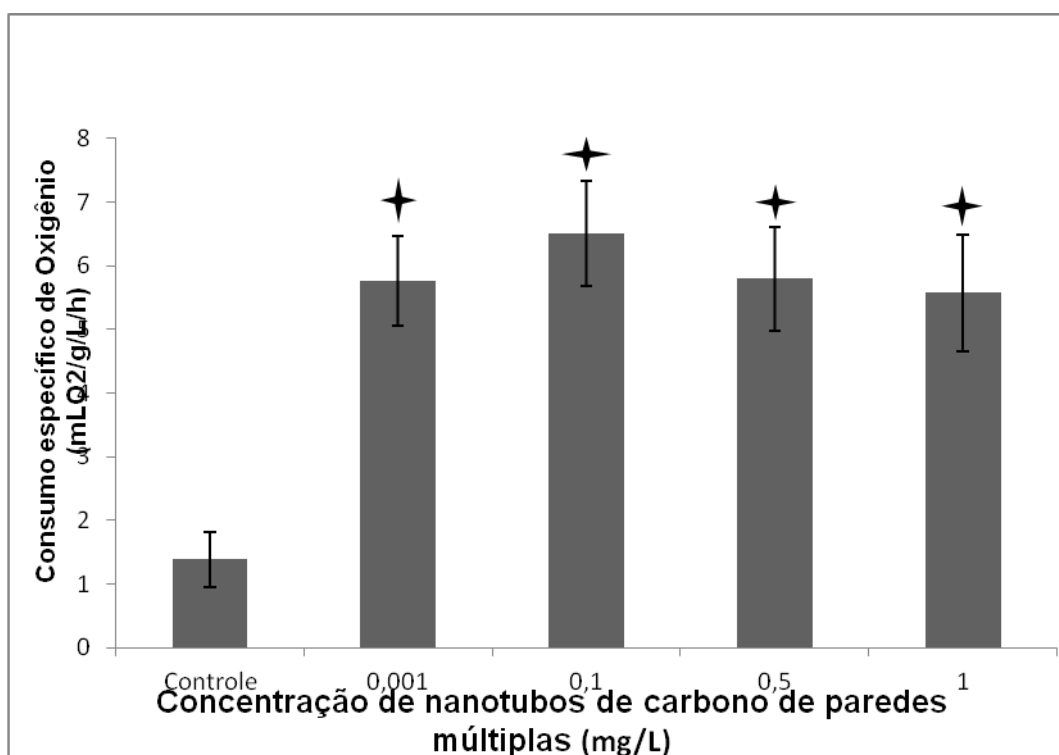


Figura 1: Consumo específico de oxigênio (mL O₂/g/L/h) do camarão *Palaemon pandaliformis*, em relação à concentração de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. As colunas

representam as médias ($n=5$) e as barras são os respectivos desvios padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle.

Os Camarões expostos a todas as concentrações empregadas de carbofurano apresentaram aumento do consumo específico de oxigênio. Todas as concentrações analisadas apresentaram diferença estatística significativa, quando comparados ao grupo controle. (Figura 2).

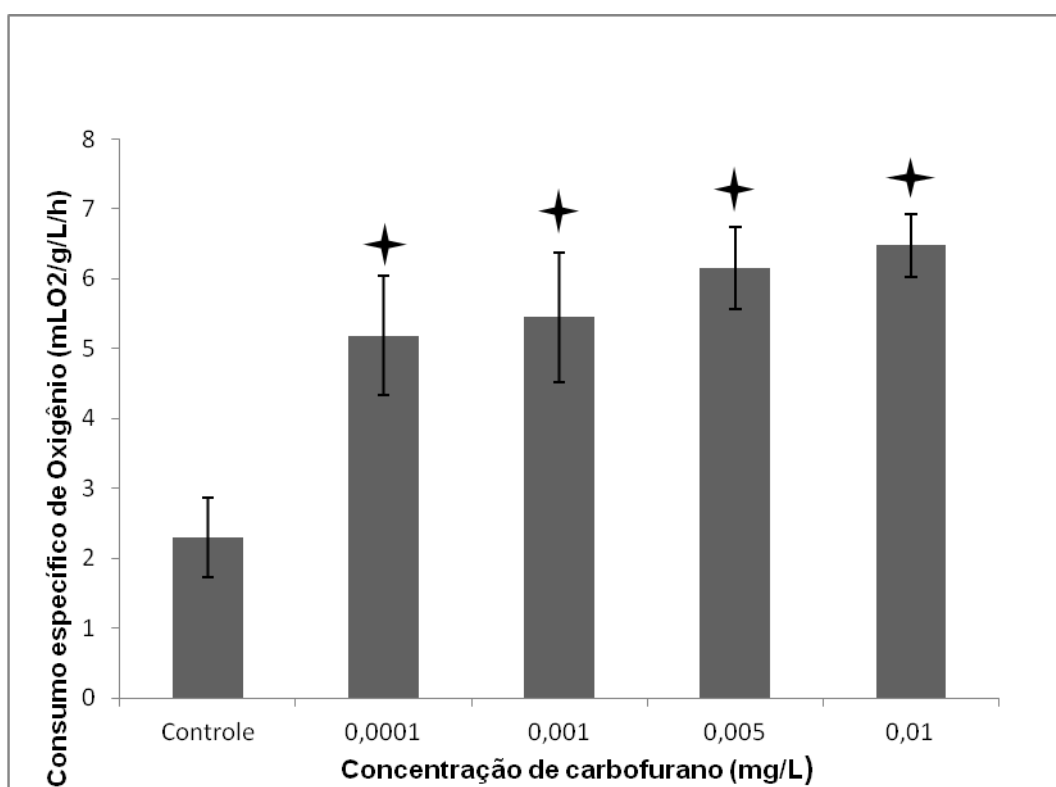


Figura 2: Consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) do camarão *Palaemon pandaliformis*, em relação a concentração de carbofurano. As colunas representam as médias ($n=5$) e as barras são os desvios padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle.

Na comparação da exposição simples de carbofurano (0,0001; 0,001; 0,005 e 0,01 mg/L) com a exposição das mesmas concentrações de carbofurano acrescidas de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, observou-se que em relação ao consumo específico de oxigênio houve uma potencialização nos efeitos quando o carbofurano interagiu com os nanotubos de carbono de paredes múltiplas, aumentando o consumo de oxigênio em todas as concentrações. (Figura 3).

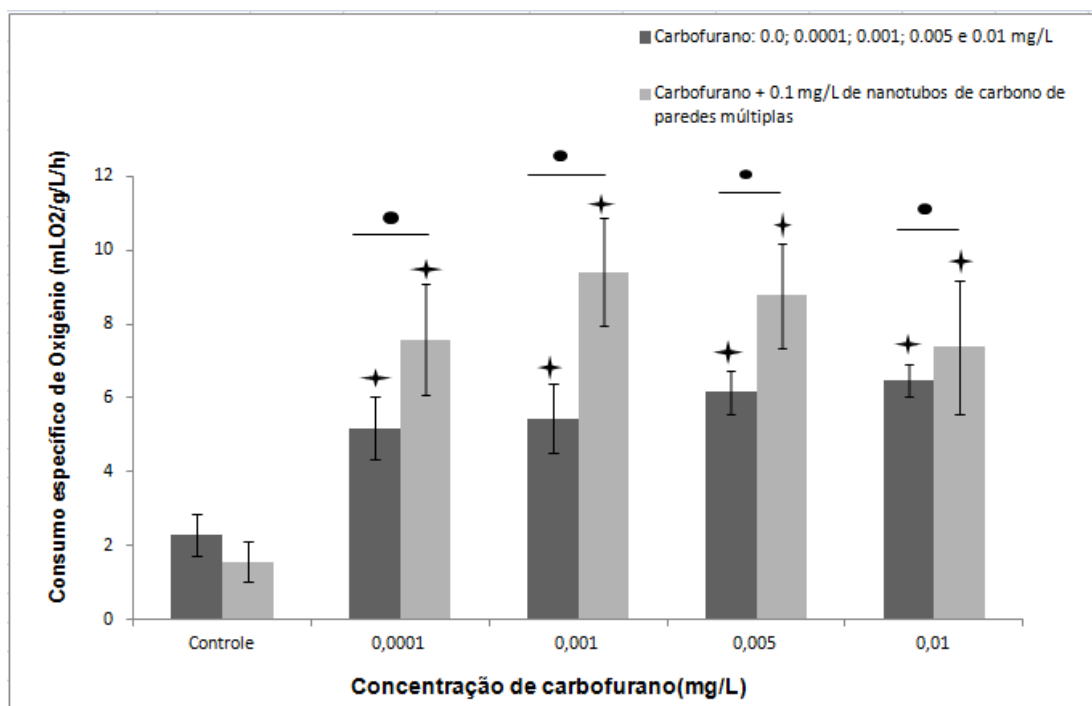


Figura 3: Consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) do camarão *Palaemon pandaliformis*, em relação a concentração de carbofurano e carbofurano + 0.1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. As colunas representam as médias e as barras são os respectivos desvios padrões (n=5). O asterisco indica os grupos que apresentam diferença estatística significativas em relação ao controle. O símbolo ● indica diferença entre a exposição simples e combinada em uma determinada concentração.

Excreção de amônia

A excreção específica de amônia dos camarões expostos a nanotubos de carbono de parede múltiplas apresentou aumento em todas as concentrações empregadas, sendo todas diferentes estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Observou-se um maior valor nas concentrações iniciais (0,001 e 0,1 mg/L), mas menores valores nas maiores concentrações (0,5 e 1 mg/L) (Figura 4).

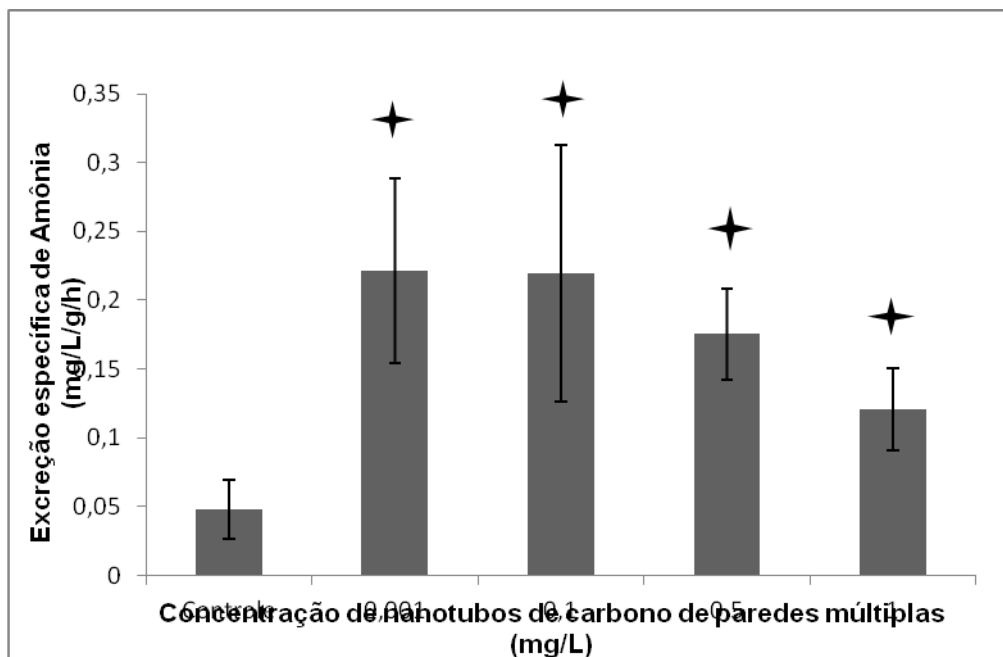


Figura 4: Excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em relação a concentração de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle.

A excreção específica de Amônia de camarões expostos ao carbofurano apresentou aumento em todas as concentrações empregadas, quando comparadas com o grupo controle.

Observou-se que a maior excreção de amônia ocorreu com a concentração de carbofurano de 0,01 mg/L. Os resultados observados para todas as concentrações apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle (Figura 5).

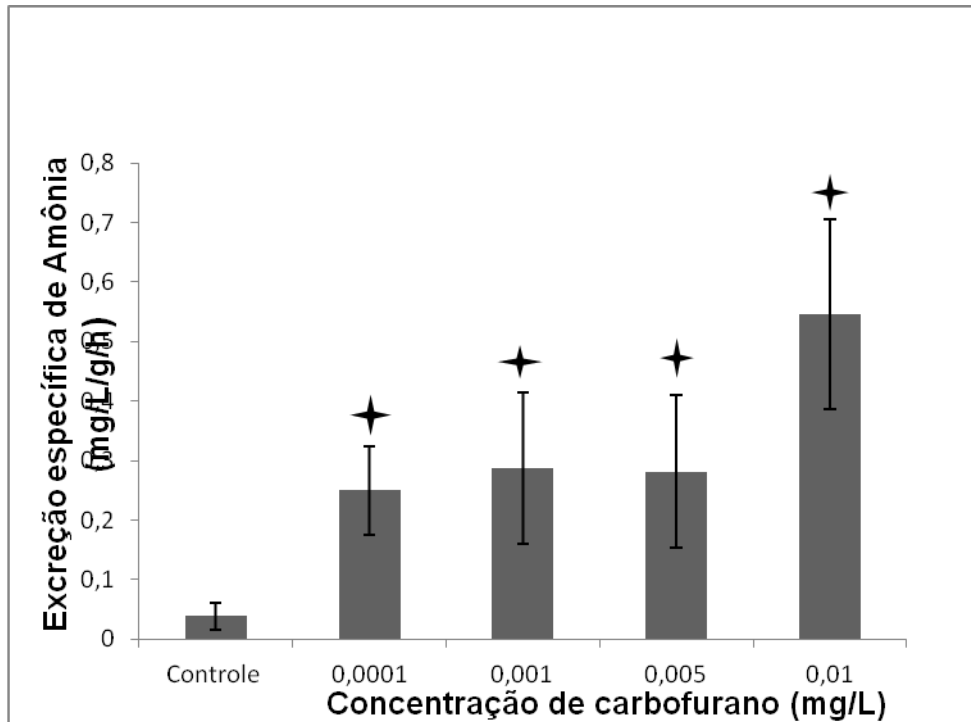


Figura 5: Excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em relação a concentração de carbofurano. As colunas representam as (n=5) e as barras são os respectivos desvios padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle.

A exposição do camarão às concentrações simples do carbofurano (0,0001; 0,001; 0,005 e 0,01 mg/L) comparado às mesmas concentrações acrescidas de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, observamos que não houve diferença significativa na taxa de excreção específica de amônia entre as comparações. (Figura 6).

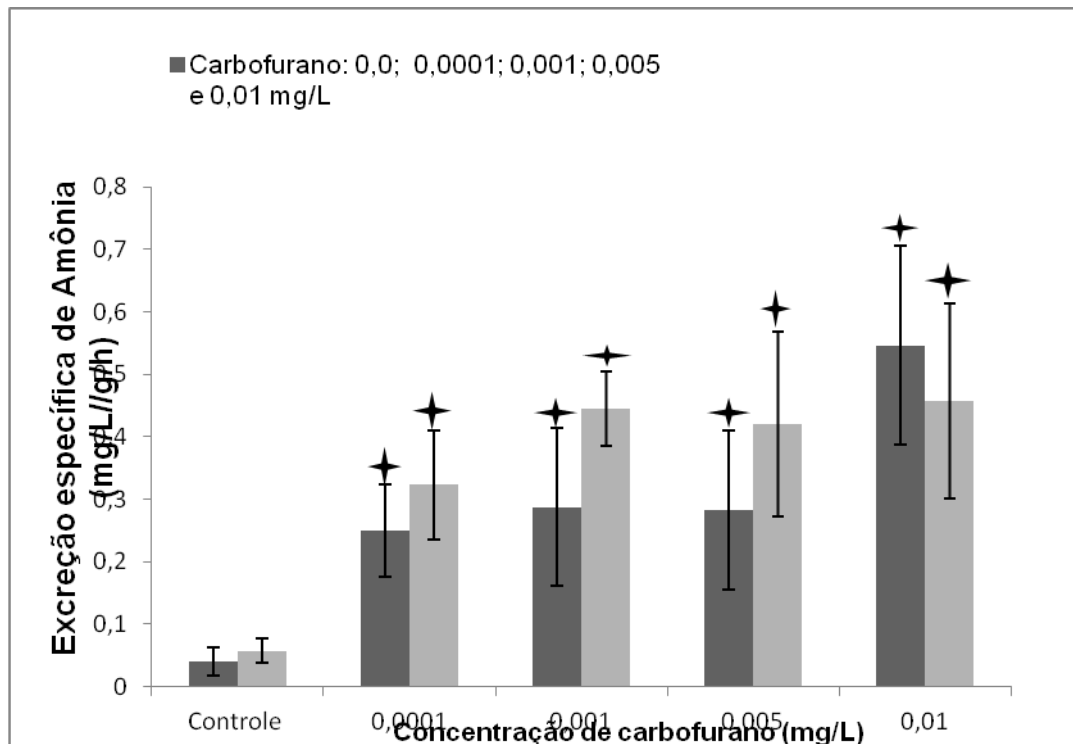


Figura 6: Excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em relação a concentração de carbofurano e carbofurano + 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. As colunas representam as médias (n=5.) e as barras são os respectivos desvios padrão. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle. Não houve diferenças estatísticas entre a concentração simples e a concentração combinada.

DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se os efeitos causados pelos xenobióticos, através do metabolismo de rotina do camarão *P. pandaliformis*, analisando a sua taxa respiratória, pois a mesma está relacionada com a energia liberada da oxidação do substrato alimentar e estresses externos, sendo assim possível mensurar o dispêndio de energia para a manutenção de processos vitais, e para manter o seu equilíbrio homeostase (Barbieri 2007). Analisou-se também no presente estudo a excreção específica de amônia, pois a mesma está relacionada ao estado fisiológico do animal, frente às diversas condições ambientais e estressores externos, sendo possível mensurar a taxa de excreção para manutenção do equilíbrio homeostático (Randall e Wright, 1987).

Os resultados obtidos no presente estudo com a espécie de camarão de água doce, *Palaemon pandaliformis*, avaliando o metabolismo de rotina, observando os biomarcadores, consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia, indicaram que os camarões foram sensíveis a exposições de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e de carbofurano, corroborando com estudos anteriores, os quais avaliaram a toxicidade de nanotubos de carbono e de carbofurano em outras espécies de invertebrados e vertebrados aquáticos (Bretaud *et al.*, 2000; Nakagome *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Baun *et al.*, 2008; Moser e Marques, 2008; Azizullah *et al.*, 2011; Handy *et al.*, 2011; Bourdiol *et al.*, 2012; Barbieri *et al.*, 2017).

Os efeitos deletérios do nanotubos de carbono de paredes múltiplas no consumo específico de oxigênio do camarão *P. palaemon* foi verificado através do aumento do consumo específico de oxigênio em todas as concentrações empregadas em 24 horas de exposição comparado ao grupo controle sem nanotubos de carbono de paredes múltiplas, porem seguidos de uma variação e tendência de diminuição do metabolismo nas mais altas concentrações, refletindo a dificuldades do camarão para manter a homeostase.

A variação observada no consumo específico de oxigênio, nas maiores concentrações empregadas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas pode ser esclarecida pela capacidade e facilidade das lamelas secundarias terem de se remodelar frente a um xenobiótico estressor, a fim de obterem proteção da área de contato das brânquias ao ambiente externo, prevenindo de possíveis lesões. Esse reajuste de redução de área de contato reflete diretamente na taxa respiratório dos organismos aquáticos, conseqüentemente podendo reduzir também o seu consumo específico de oxigênio, e essa manutenção fisiológica para proteção das lamelas secundarias, são realizadas a fim de manter o equilíbrio homeostático do organismo aquático (Yang *et al.*, 2000; Handy *et al.*, 2008^a; Nilsson *et al.*, 2012).

Entretanto, em outros trabalhos com espécies diferentes de camarões e peixes, expostos a nanotubos de carbono e grafeno, não foram observados aumento do consumo específico de oxigênio (Smith *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2015).

Avaliando-se os efeitos do carbofurano no consumo específico de oxigênio do metabolismo de rotina do camarão, *Palaemon pandaliformis*, observamos um grande aumento da taxa de consumo em relação ao grupo controle, indicando estresse ocasionado por esse xenobiótico, o que reflete na demanda de energia para manter a homeostase. Entretanto, Barbieri *et al.* (2016) ao avaliarem o consumo específico de

oxigênio do Camarão *Macrobrachium olfersii*, em três temperaturas com concentrações diferentes de carbofurano, observaram diminuição da taxa de consumo em todas as concentrações nas temperaturas empregadas.

Vargas *et al.* (1991) salientaram que os xenobiontes afetam os processos de respiração de invertebrados e vertebrados, acelerando ou diminuindo, o que pode induzir o uso de outras fontes de energia para reações de desintoxicação e estabilização de padrões metabólicos. Isto pode explicar o aumento do consumo específico de oxigênio, à medida que a concentração de carbofurano foi elevada no presente estudo.

Na avaliação dos efeitos dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas do presente estudo observou-se que a taxa de excreção específica de amônia do *P. pandaliformis*, aumento em todas as concentrações, porem as taxas de excreções foram maiores nas duas primeiras concentrações empregadas, seguidas de uma tendência de diminuição nas maiores concentrações. Entretanto, Duran *et al.* (2015) ao exporem o camarão *Palaemon pandaliformis* em concentrações de nanopartículas de grafeno, não observaram alterações na excreção de amônia em 24 horas de exposição.

Assim esses estudos indicam os diferentes efeitos dos nanomateriais nos organismos aquáticos, pois o aumento ou diminuição da taxa de excreção específica reflete a condição do animal frente ao contaminante estressor, pois o aumento da excreção gera aumento do catabolismo dos aminoácidos, como também na tentativa de eliminar o agente agressor do organismo, já o decréscimo na taxa de excreção de amônia reflete o estresse do organismo-teste aos danos causados dos xenobióticos no órgão excretor, perda de habilidade de excreção e o possível dano nas células envolvidas nas atividades excretoras, em reação a exposição (Adams *et al.*, 1989; Deplege *et al.*, 1995; Vijayavel e Balasubramanian, 2006; Damato e Barbieri 2012; Barbieri *et al.*, 2013).

Na avaliação dos efeitos do carbofurano do presente estudo, observando a taxa de excreção específica de amônia do *P. pandaliformis*, observou-se aumento de excreção específica de amônia em todas as concentrações trabalhadas, corroborando os resultados do presente estudo com estudos anteriores, como, por exemplo, o trabalho de Barbieri *et al.* (2016) que observaram que o carbofurano apresentou efeito deletérios nos camarões da espécie, *Macrobrachium olfersii*, pois em seus resultados obtiveram taxas elevadas de excreção específica de amônia em todas as temperaturas e concentrações empregadas de carbofurano.

Esses estudos reforçam os efeitos ecotoxicológicos ocasionados pelo carbofurano em diferentes organismos.

Na avaliação do consumo específico de oxigênio do *Palaemon pandaliformis* expostos a concentrações de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas acrescidas de carbofurano do presente estudo, observou-se que houve potencialização do efeito da concentração de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas ao se associar com as três primeiras concentrações de carbofurano empregadas, tendo um aumento de taxa de consumo específico de oxigênio ao comparar com a exposição simples de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Foi observado também no presente estudo que a exposição combinada de carbofurano acrescida de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, aumentou os efeitos do carbofurano em todas as concentrações empregadas de 0,0001; 0,001; 0,001 e 0,005 mg/L acrescidos de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, pois a taxa de consumo específico de oxigênio, foi maior no carbofurano interagindo com o nanotubos de carbono de paredes múltiplas do que a apenas a exposição simples do carbofurano. Entretanto em estudos anteriores com organismos aquáticos diferentes como, por exemplo, a analisada por Campos-Garcia *et al.* (2015) que ao avaliarem a associação de nanotubos de carbono e carbofurano no metabolismo do *O. niloticus*, observaram uma diminuição da taxa de consumo de oxigênio em todas as concentrações trabalhadas, sendo menor ao controle até 9,5 vezes na maior concentração empregada da interação.

Na avaliação da taxa de excreção específica do presente estudo, ao comparar a exposição simples de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com interação de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas acrescidas de carbofurano, observamos que houve potencialização do efeito do nanotubos de carbono de paredes múltiplas apenas quando foi acrescido de 0,001 mg/L de carbofurano, tendo um aumento na taxa de excreção de 15% ao se comparar com a exposição simples de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Entretanto as outras concentrações de nanotubos de carbono de paredes múltiplas acrescidos de carbofurano 0,0001; 0,005 e 0,01 mg/L não causaram diferença na taxa de excreção dos camarões quando comparadas com a exposição simples de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Ao comparar a taxa de excreção específica de amônia da exposição simples de carbofurano com a exposição combinada acrescida

de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, observamos no presente estudo que não houve potencialização pela interação.

De acordo com Handy *et al.* (2008), nanotubos de carbono conseguem adsorver com outras substâncias químicas, promovendo um efeito sinérgico desses na presença de outros xenobiontes, potencializando os seus efeitos. Em combinação com outros xenobióticos, os nanomateriais podem funcionar como "cavalos de troias" ao encontrarem a superfície das brânquias, pois liberam concentrações altas destes elementos, ou provocam uma liberação lenta e prolongada dos íons no epitélio (Boncel *et al.*, 2015). Isso explicaria os efeitos ecotoxicológicos encontrados neste estudo e em outros realizados anteriormente com nanomateriais associados a outros contaminantes como, por exemplo, os nanotubos de carbono de paredes múltiplas e carbofurano (Limbach *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

Os biomarcadores de consumo específico de oxigênio e excreção de amônia demonstraram serem bons indicadores para se avaliar o estudo das alterações no metabolismo do *Palaemon pandaliformis*, expostos ao carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas em exposição simples e combinada.

A exposição simples de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e de carbofurano aumentou a taxa de consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia dos camarões em todas as concentrações empregadas;

Ao avaliar a exposição combinada de carbofurano acrescido de 0,1 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, observou-se que, a taxa de consumo específico de oxigênio, houve um aumento dos efeitos do carbofurano nas três primeiras concentrações empregada, enquanto que na excreção específica de amônia não houve diferenciação na taxa de excreção de amônia ao se comparar com a exposição simples.

Não afirmou-se a hipótese de que a exposição combinada da concentração de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e de carbofurano se potencializariam quando expostos juntos no metabolismo dos camarões *Palaemon pandaliformis*, pois os resultados obtidos apenas demonstraram tendência de aumento de consumo de oxigênio e excreção de amônia nas concentrações iniciais e não em todas as concentrações empregadas em exposição combinadas.

Ainda são necessários estudos para melhor compreensão dos mecanismos e da interação entre os nanotubos de carbono de paredes múltiplas com outras substâncias presentes no meio aquático, elucidando os possíveis riscos ambientais e as vias pelas quais esse xenobiótico atinge a fauna. Portanto, são necessárias medidas que minimizem os danos ambientais provocados pelas substâncias tóxicas, como por exemplo, o carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

BIBLIOGRAFIA.

Ates M., Daniels J., et al., 2013. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Environmental Science; Processes & Impacts*. 15(1);225 - 233.

Adams S.M., Shepard K.L., Greeley JR, M.S., Jimenez B.D., Ryon M.G., Shugart L.R., Mccarthy J.F., Hinton D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*. 28(4);459 - 464.

Azizullah A., Richter P., Hader D.P., 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*. 20(6);1442 - 1454.

Baun A., Sorensen S.N., Rasmussen R.F., Hartmann,N.B., Koch C.B, 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquatic Toxicology*. 86(3); 379 -387.

Barbieri E., Garcia C.A.B., Alves J.P.H., 2004a, Utilização do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) na determinação da toxicidade da água de produção de petróleo caracterizada no Estado de Sergipe. *Mundo da Saúde*. 28(4); 421 - 430.

Barbieri E., 2007. The use of active metabolism and swimming activity to evaluate the toxicity of dodecyl benzene sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (Mullet) accordings to temperature and salinity. *Water Environment Research*. 79(7);707 - 719.

Barbieri E, 2007. Use of Oxygen Consumption and Ammonium Excretion to Evaluate the Sublethal Toxicity of Cadmium and Zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *Water Environment Research* 79(1); 324 - 330.

Barbieri E, 2008. Efeito dos Surfactantes DSS e LAS-C12 sobre o Camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensi*, Pérez-Farfante, 1967). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 3(1); 35 - 40.

Barbieri E., Ferreira L.A.A., 2011. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600r on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesticide Biochemistry Physiology*. 99(3); 209 - 214.

Barbieri E. e Paes E.T., 2011. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere*. 84(1); 9 - 16.

Barbieri E., Damato M., 2012. Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do Cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. *O Mundo da Saúde*. 36(4); 574 - 581.

[Barbieri E.](#), [Branco J.O.](#), Ferrão M.C., Hidalgo K.R., 2013. Effects of Cadmium and Zinc on Oxygen Consumption and ammonia excretion of the Sea-Bob shrimp, according to temperature. *Boletim do Instituto de Pesca*. 39(3); 299 - 309.

Barbieri E., Moreira P., Luchini L.A., Hidalgo K.R., Muñoz A, 2013. Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at diferente temperature levels. *Toxicology and Industrial Health*. 29(1); 1 - 8.

Barbieri E., Ruíz-Hidalgo., Rezende K.F.O., Leonardo A.F.G., Sabino F.P, 2017. Efectos Del carbofuran em juveniles de *Oreochromis niloticus* em La toxicidad, metabólica de rutina y lós parâmetros hematológicos. *Boletim do Instituto de Pesca*. 43(4); 513-526.

Becharo A. A., Puti F. C., Correa D.S., Ferreira M.D., 2013. Avaliação toxicológica de nanopartículas de prata. VII Workshop de Nanotecnologia Aplicado ao Agronegócio. São Carlos.

Boncel S., Kyziol-Komosinska J., Krzyzewska I., Czupiol J., 2015. Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems –Chemosphere. 136(1); 211 - 221.

Bond-Buckup G., Buckup L., 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). Revista Brasileira de Biologia. 49(4); 883 - 896.

Bond-Buckup G., Buckup L., 1999. Caridea (pitos, camarões de água doce e marinhos): In: Buckup L., Bond-Buckup G., (Eds.). Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Ed. UFRGS, Porto Alegre.

Bourdiol F., Mouchet F., Perrault A., Fourquaux I., Datas L., Gancet C., Bouonnet J.C., Pinelli E., Gauthier L., Flahaut E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. Carbon. 54, 175 - 191.

Bretau S., Toutant J.P., Saglio P., 2000. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 47(2); 117 - 124.

Britto R.S., Garcia, M. L., Martins D.A., Rocha A., Flores J.A., Pinheiro M.V.B., Monserrat J.M., Ferreira J.L.R., 2012. Effects of carbon nanomaterials fullerene C 60 and fullerol C 60(OH) 18-22 on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. Aquatic Toxicology. 114(1); 80 - 87.

Campos-Garcia J., Martinez D.S.T., Rezende K.F.O., Da Silva J.R.M.C., Alves O.L., Barbieri E., 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multi walled carbon nanotubes. Ecotoxicology and Environmental Safety. 133, 481 - 488.

- Campos-Garcia J., Martinez D, S., Alves ,O, L., Leonardo A, F., Barbieri E. 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. 2015. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 111, 131-137.
- Coelho P.A., 1963/1964. Distribuição dos Crustáceos Decápodos na área de Barra da Jangadas. *Trabalhos do Instituto Oceanográfico da Universidade Federal de Pernambuco*. 5.6, 159-173.
- DE Melo G.A.S., 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Editora Loyola. São Paulo.
- Depledge M.H., Agaard A., Gyorkos P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*. 31(3); 19 - 27.
- Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Avouris P., 2001. Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications. *Topics in Applied Physics*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Durán N., Martinez D.S.T., Justo G.Z., De Lima R., De Castro V.L., Umbuzeiro G.A., Barbieri E., Durán M., Melo P.S., Alves O.L., Fávaro W.J., 2015a. Interlab study on nanotoxicology of representative graphene oxide. *Journal of Physics; Conference Series*. 617(1); 12019.
- Durán N., Martinez D.S.T., Silveira C.P., Durán M., De Moraes A.C.M., Simões M.B., Alves O.L., Fávaro W.J., 2015b. Graphene oxide: a carrier for pharmaceuticals and a scaffold for cell interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 15(4); 309 - 327.
- Ferry J.L., Craig P., et al., 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology*. 4(7); 441 - 444.
- FMC, 1977. Carbofuran Data Summary. FMC. Corporation. Philadelphia. 97, 1 - 9.

Gambardella C., Costa E., Piazza V., Fabbrocini A., Magi E., Faimali M., Garaventa F., 2015. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*. 111, 41–49.

Guazzelli, M.J., Perez, J., 2009. *Nanotecnologia: a manipulação do invisível*. Rio Grande do Sul: Copyleft.

Disponível em

<http://www.boellalatinamerica.org/downloads/RevistaNanotecnologia.pdf>. Acesso em 27 de 09 de 2017.

Handy R.D., Henry T.B., Scon T.M., Johnston B.D., Tyler C.R., 2008a Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish – A mechanistic analysis. *Ecotoxicology*. 17(4); 396 - 409.

Handy R.D., Von Der Kammer F., Lead J.R., Hasselov M., Owen R., Crane M., 2008b. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*. 17(4); 287 - 314.

Handy R.D., Al-Bairuty G., Ramsden C.S., Boyle D., Shaw B.J., Henry T.B., 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: A target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*. 79(4); 821 - 853.

Hanna S.K., Miller R.J., et al., 2013. Accumulation and toxicity of metal oxide nanoparticles in a soft-sediment estuarine amphipod. *Aquatic Toxicology*. 15(142-143); 441 - 446. 2013.

Hamilton M.A., Russo R.C., Thurston R.V., 1977/1978. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*. 11(7); 714 - 719.

Harding L. E., 1992, Measures of marine environmental quality. *Marine Pollution Bulletin* 25(4); 1 - 4.

Iijima S., 1991. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature*. 354, 56 - 58.

Jash N.B., Bhattacharaya S., 1983. Delayed toxicity of carbofuran in fresh water teleost *Channa puncta*. *Water Air Soil Pollution*. 19, 209 - 213.

Klaper R., Arndt D., Chen J., Goetz F., 2010. Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 100(2); 211 - 217.

Kleiner K., Hogan J., 2003. How safe is nanotech; *New Scientist*. 177, 14 - 15.

Limbach L.K., Wick P., Manser P., Grass R.N., Bruinink A., Stark W.J., 2007. Exposure of Engineered Nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Science & Technology*. 41(11); 4158 - 4163.

Liu X.T., Mu X.Y., Wu X.L., Meng L.X., Guan W.B., Ma Y.Q., Sun H., Wang C.J., Li X.F., 2014. Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos. *Biomedical and Environmental Sciences*. 27(9); 676 - 683.

Martins L.C., Rosa R.D., Rivero, L. D., Nazari E.M., Muller Y.M.R., 2006. Ação de Detergente Domestico na Biologia Reprodutiva do Camarão de Água Doce (*Macrobrachium olfesi*). *Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia*. 1, 79 - 82.

Martinez D.S.T., Alves O.L., 2013. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação: *Ciência e Cultura*. 65(3); 1 - 8.

Marques M.N., Cotrim M.B., Pires M.A.F., Beltrame Filho O., 2007. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. *Química Nova*. 30(5), 1171 - 1178.

Masciangioli T., Zhang W., 2003. Environmental nanotechnology: Potential and pitfalls. *Environmental Science & Technology*. 37, 102 - 108.

Moore M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. *Environment International*. 32(8); 967 - 976.

Moreira M.R.S., Mucci J.L.N., Abakerli R.B., 2004 Monitoramento dos resíduos de carbofurano em área de produção de arroz irrigado - Taubaté, São Paulo. *Instituto Biologico*. 71(2); 221 - 226.

Nakagome F.K., Noldin J.A., Resgalla C.JR., 2006. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros (*Daphnia magna*). *Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 16, 93 - 100.

Nilsson G.E., Dymowska A., Steck A.W., 2012. New insights into the plasticity of gill structure. *Respiratory Physiology Neurobiology*. 184(3); 214 - 222.

Nogueira V., Lopes I., et al., 2015. Assessing the ecotoxicity of metal nano-oxides with potential for waste water treatment. *Environmental Science and Pollution Research* 22(17); 13212 - 13224.

Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 113(7); 823 - 830.

Park J., Kim S., et al., 2014. Effect of salinity on acute copper and zinc toxicity to *Tigriopus japonicus*: the difference between metal ions and nanoparticles. *Marine Pollution Bulletin*. 85(2); 526 - 531.

Paschoalino M.P., Marcone G.P.S, Jardim W.F., 2010. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*. 33(2); 421 - 430.

Peralta-Videa J. R., Zhao L., Lopes-moreno M., De La Rosa G., Hong J., Gardea-Torresdey J.L., 2011. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *Journal of Hazardous Materials*. 186(1), 1-15.

Pinto A.M.T.P., Hirdes L.M., Sanches Filho P.J., 2013. Determinação de metais pesados nos camarões (*Farfantepenaeus paulensis*) consumidos na cidade de Pelotas-RS. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 8(1); 129 - 134.

Randall D.J., Wright P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiology Biochemistry*. 3(3); 107- 120.

Roco M.C., 2003. Broader societal issues of nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*. 5(3), 181 - 189.

Santos D.B., Barbieri E., Bondioli A.C.V., De Melo C.B., 2014. Effects of Lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *O Mundo da Saúde* 36(4); 594 - 601.

Smith C.J., Shaw B.J., Handy R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. 82(2); 94 - 109.

Vargas V.M.F., Guidobono R.R., Henriques J.A.P., 1991. Genotoxicity of plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 86(2); 67 - 70.

Vijayavel K. e Balasubramanian M.P., 2006. Changes in oxygen consumption and respiratory enzymes as stress indicators in an estuarine edible crab *Scylla serrata* exposed to naphthalene. *Chemosphere*. 63(9); 1523 - 1531.

World Health Organization, 1996. Guidelines for drinking-water quality. Geneva 2. *Health Criteria and other Supporting Information*. 2, 940 - 946.

Yang R., Brauner C., Thurston V., Neuman J., Randall D.J., 2000. Relationship between toxicant transfer kinetic process and fish oxygen consumption. *Aquatic Toxicology*. 48(3); 95 - 108.