

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

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE XENOBIÓTICOS (NANOTUBO DE CARBONO, CARBOFURANO E MERCÚRIO) SOBRE LAMBARI (*Astyanax* sp.) E *Poecilia vivipara*.



Alessandra Maria Tegon Ferrarini

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

Janeiro – 2015

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

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE XENOBIÓTICOS (NANOTUBO DE CARBONO, CARBOFURANO E MERCÚRIO) SOBRE LAMBARI (*Astyanax* sp.) E *Poecilia vivipara*.

Alessandra Maria Tegon Ferrarini

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

Janeiro - 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

F375 Ferrarini, Alessandra Maria Tegon
Efeitos ecotoxicológicos de xenobióticos (nanotubo de carbono, carbofurano e mercúrio) sobre lambari (*Astyanax sp.*) e *Poecilia vivipara* / Alessandra Maria Tegon Ferrarini – São Paulo, 2015.
Vi, 71f. ; il ; gráf. ; tab.
Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – Secretaria de Agricultura e Abastecimento.
Orientador: Edison Barbieri

1. Efeito ecotoxicológico. 2 Nanotubos de carbono de paredes múltiplas . 3. Carbofurano.
4. Nanotoxicologia. I. Barbieri, Edison. II. Título.

CDD 639.3

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor



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 ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOTUBO DE CARBONO E
CARBOFURANOS SOBRE LAMBARI (*Astyanax* sp.)”

AUTOR: Alessandra Maria Tegen Ferrarini

ORIENTADOR: Edison Barbieri

Aprovado 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

Profa. Dra. SUELI IVONE BORRELY

Prof. Dr. DIEGO STEFANI MARTINEZ

Data da realização: 27 de fevereiro de 2015

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Edison Barbieri

Agradecimentos

Ao pesquisador Dr. Edison Barbieri pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalho. Agradeço a confiança que permitiram um crescimento profissional e pessoal nestes mais de dois anos de convívio.

Ao Instituto de Pesca pela oportunidade de aprimoramento da minha formação acadêmica.

Ao Governo do Estado de São Paulo – Secretaria de Estado da Educação pela concessão da bolsa mestrado.

Aos professores e funcionários do Programa de pós-graduação do Instituto de Pesca pelos conhecimentos construídos, pela disponibilidade e informações prestadas, permitindo a realização desta pesquisa.

À minha família com seu apoio e carinho sempre presentes e que me permitiram chegar à conclusão deste trabalho.

À Comissão Regional do Programa Bolsa Mestrado e Doutorado supervisoras Carla e Lolita pelo apoio e participação ao Programa.

Aos colegas do Núcleo Pedagógico pelo incentivo para o desenvolvimento do trabalho. Em especial aos colegas Osmar, Amanda e Elisabete.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais “in memoriam”, a minha, mãe Maria Aparecida Nascimento Tegon e ao meu pai, Juvenal Tegon, por todos ensinamentos de vida.

Sumário

Agradecimentos.....	i
Dedicatória.....	ii
Sumário.....	iv
Índice de Tabelas e Figurasv	
RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
Objetivos	6
Apresentação da Dissertação	6
Referências Bibliográficas	8
CAPÍTULO 1	10
EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO NANOTUBO DE CARBONO (NTCPM) E CARBOFURANO SOBRE LAMBARI (<i>Astyanax</i> sp.)	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	36

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2	42
A UTILIZAÇÃO DA CAPACIDADE DE NATAÇÃO PARA AVALIAR O EFEITO DO MERCÚRIO EM <i>POECILIA VIVIPARA</i> (POECILÍDEOS) DE ACORDO COM A SALINIDADE E TEMPERATURA.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT	44
1 - INTRODUÇÃO.....	45
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3 - RESULTADOS.....	49
4. DISCUSSÃO	58
5 . CONCLUSÃO.....	64
6 . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO 1 – ESTATÍSTICA.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 2 – FOTO LAMBARI	71
ANEXO 3- FOTO POECILIA	72

Índice de Tabelas e Figuras

Figura 1 - Consumo específico de oxigênio ($\text{mlO}_2/\text{g/L}$) em relação a concentração de Carbofurano (mg/L). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Figura 2 – Consumo específico de oxigênio ($\text{mlO}_2/\text{g/L}$) em relação a concentração de nanotubos de carbono (mg/L). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Figura 3 – Consumo específico de oxigênio ($\text{mlO}_2/\text{g/L}$) em relação a concentração de carbofurano + 0,5 mg de nanotubos de carbono (mg/l). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Figura 4 – Excreção específica de amônia ($\text{mlO}_2/\text{g/L}$) em relação a concentração de carbofurano (mg/L). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Figura 5 – Excreção específica de amônia ($\text{mlO}_2/\text{g/L}$) em relação a concentração de nanotubos de carbono (mg/l) * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Figura 6 – Excreção específica de amônia ($\text{mlO}_2/\text{g/L}$) em relação a concentração de carbofurano (mg/L) + 0.5mg/L de nanotubos de carbono. * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Figura 7 - Câmara de natação construído e usado no laboratório do Instituto de Pesca – APTA-SAA - Cananéia/SP, com base em Brett (1964).

Tabela 1 - PH e concentração de oxigênio dissolvido na solução teste em cada concentração de mercúrio.

Tabela 2 - Tempo de natação até o cansaço para *Poecilia vivipara* na velocidade de natação de 8,0 cm/s, submetido a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), na salinidade de 5. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem da diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (5 peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Tabela 3 - Tempo de natação até o cansaço para *Poecilia vivipara* na velocidade de natação de 8,0 cm/s, submetido a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), na salinidade de 20. Entre

parênteses, o desvio padrão; % Percentagem da diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (5 peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Tabela 4 - Tempo de natação até o cansaço para *Poecilia vivipara* na velocidade de natação de 8,0 cm/s, submetido a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), na salinidade de 35. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem da diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (5 peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Tabela 5 – Tempo de natação até o cansaço de *Poecilia vivipara* (velocidade de natação de 8,0 cm/s), aclimatados a 25°C , submetidos a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes salinidades. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem de tempo de natação até o cansaço diminuindo em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Tabela 6 – Tempo de natação até o cansaço de *Poecilia vivipara* (velocidade de natação de 8,0 cm/s), aclimatados a 20°C , submetidos a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes salinidades. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem de tempo de natação até o cansaço diminuindo em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Tabela 7 – Tempo de natação até o cansaço de *Poecilia vivipara* (velocidade de natação de 8,0 cm/s), aclimatados a 15°C , submetidos a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes salinidades. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem de tempo de natação até o cansaço diminuindo em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

RESUMO GERAL

A contaminação dos ambientes aquáticos é uma das consequências da pressão das atividades antrópicas sobre os recursos naturais e está comumente relacionada à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas. Peixes são sensíveis a essas mudanças no ambiente e efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em nível celular e tecidual. Uma das classes de inseticidas mais comumente utilizados no Brasil são os carbamatos, e entre eles, o carbofurano merece destaque, sendo altamente tóxico para peixes, pássaros e humanos. No ambiente natural a toxicidade ocorre através da mistura de diversos contaminantes que podem interagir sob diversas formas, inclusive com o aumento de toxicidade. Além de agrotóxicos, nanopartículas manufaturadas estão entre as substâncias as quais os organismos aquáticos estão expostos. A grande área de superfície dos nanotubos de carbono e sua alta reatividade, podem levar outras moléculas a aderirem e potencialmente transportar poluentes pelo meio ambiente, além de serem biologicamente ativas por apresentarem maior área de superfície por unidade quando comparadas com partículas maiores. Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos toxicológicos dos nanotubos de carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como marcador biológico o consumo de oxigênio, a excreção de amônia em *Astyanax* sp. e estudar o efeito do mercúrio na capacidade de natação de *Poecilia vivipara* utilizando o tempo de natação até o cansaço variando a salinidade e a temperatura.

Palavras chave: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; Carbofurano; Nanotoxicologia; capacidade de natação; poluentes.

GENERAL ABSTRACT

The contamination of aquatic environments is one consequence of the pressure of human activities on natural resources and is commonly related to the discharge of domestic, industrial and agricultural effluents. Fish are sensitive to these changes in the environment and toxic effects of pollutants may be evident in cellular and tissue level. One of the classes of insecticides most commonly used in Brazil are carbamates, and among them, carbofuran should be highlighted and is highly toxic to fish, birds and humans. In the natural environment toxicity occurs by mixing various contaminants that may interact envelopes various ways, including increased toxicity. In addition to pesticides, manufactured nanoparticles are among the substances which aquatic organisms are exposed. The large surface area of carbon nanotubes and their high reactivity, can lead other molecules adhering and potentially carry pollutants from the environment, and are biologically active due to their larger surface area per unit when compared to larger particles. Thus, this study aimed to evaluate the toxicological effects of carbon nanotubes, of carbofuran and carbon nanotubes and carbofuran using as biomarker oxygen consumption, ammonia excretion in *Astyanax* sp. and study the effect of mercury in *Poecilia vivipara* swimming ability using the swimming time to exhaustion varying salinity and temperature.

Keywords: Carbon nanotubes multi-walled; carbofuran; toxicology; swimming ability; pollutants.

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento das cidades nas últimas décadas tem sido responsável pelo aumento da pressão das atividades antrópicas sobre os recursos naturais. Em todo o planeta, praticamente não existe um ecossistema que não tenha sofrido influência direta e/ou indireta do homem, como por exemplo, contaminação dos ambientes aquáticos (GOULART e CALLISTO, 2003).

A poluição aquática está comumente relacionada à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Em áreas agrícolas, a lixiviação de águas superficiais e a infiltração da água intersticial em rios e lagos podem introduzir agrotóxicos em quantidades substanciais nesses corpos d'água (ARIAS *et al.*, 2007, BARBIERI e FERREIRA, 2011).

Peixes são sensíveis a mudanças no ambiente e efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em nível celular e tecidual, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (VAN DYK, 2005).

O emprego de pesticidas orgânicos na agricultura desde 1940 promoveu, além de colheitas com qualidade, um aumento na produtividade possibilitando o atendimento da demanda alimentícia na maioria dos países (Brasco, 1988). No entanto, BULL e HATHAWAY (1986) relatam que, na medida em que são aplicados em excesso, ou de maneira errônea, os agrotóxicos acentuam demasiadamente os problemas do meio ambiente.

Uma das classes de inseticidas mais comumente utilizados no Brasil são os carbamatos, muito eficientes no controle de uma ampla gama de pragas agrícolas e que atua por contato ou após ingestão (FMC, 1977). O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato), um dos principais representantes do grupo dos carbamatos, é altamente tóxico para peixes, pássaros e humanos, sendo a sua ingestão diária aceitável entre 0 a

0,002mg/Kg/dia, o que estabelece seu limite para $7\mu\text{gL}^{-1}$ (World Health Organization, 1996). Embora possa ser facilmente degradado, pode induzir efeitos deletérios a espécies não-alvo, antes que ocorra uma dissipação ambiental (MOREIRA *et al.*, 2004).

A meia vida do carbofurano em água a 22°C é altamente dependente do pH podendo ser de 1 ano a pH4,0 até 31 horas a pH9,0. Em pH 7,0 a meia vida é em torno de 121 dias (TOMLIN, 2000). O pH é portanto um parâmetro importante a ser considerado quando se avalia a permanência de resíduos de carbofurano em águas superficiais (MOREIRA *et al.*, 2004).

Por apresentar efeitos nocivos a espécies não-alvo, o carbofurano foi banido nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006). Entretanto, no Brasil ainda é comercializado nas formas líquida e granulada, com respectivo consumo anual de 4.000L e 60.000 Kg no estado de São Paulo (ALVES, 2001).

Além de agrotóxicos, nanopartículas manufaturadas estão entre as substâncias as quais os organismos aquáticos estão expostos (PASCHOALINO, 2010).

Nanopartículas existem naturalmente desde o início da história da Terra (HANDY *et al.*, 2008; HANDY *et al.*, 2008b) e há vários mecanismos geológicos ou biológicos que criam nanopartículas no meio ambiente (HANDY *et al.*, 2011). No entanto, isso não significa que os organismos são adaptados ou tolerantes a nanomateriais manufaturados, que podem ter reatividade química e propriedades físicas distintas dos nanomateriais que ocorrem naturalmente (HANDY *et al.*, 2011). Além disso, o crescente uso das nanopartículas manufaturadas em produtos deve aumentar sua presença ao meio ambiente de maneira dramática (HELLAND *et al.*, 2007)

Os nanotubos de carbono apresentam propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas muito interessantes (DRESSELHAUS *et al.*, 2001). Desta forma, esses materiais têm sido usados na confecção de diferentes tipos de dispositivos, como emissores de elétrons para mostradores, sensores de gases

e sensores biológicos, pontas para microscópio de força atômica (AFM) e, quando combinados a outros materiais, como polímeros e fibras, servem como elementos de reforço formando compósitos com excelentes propriedades mecânicas (DAI, 2002).

Pesquisas tem mostrado que nanopartículas podem entrar no corpo humano com maior facilidade e serem mais biologicamente ativas por apresentarem maior área de superfície por unidade quando comparadas a partículas maiores (OBERDORSTER *et al.*, 2005). Além disso, a grande área de superfície dos nanotubos de carbono podem levar outras moléculas se aderirem e potencialmente transportar poluentes pelo meio ambiente (KLEINER e HOGAN, 2003).

Os estudos sobre efeito de dose sub letais de xenobióticos possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas, além de avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (BERTOLETTI, 1990).

A capacidade de natação é um parâmetro que está relacionado com a resistência do peixe em manter-se nadando frente a um fluxo de água (WICKS *et al.*, 2002) ou a sua capacidade física para continuar a nadar contra uma corrente (HOWARD, 1975).

RAND (1984) classificou uma série de características de comportamento dos peixes que são utilizados como indicadores de toxicidade. Entre eles, a atividade de natação é considerada um bom indicador para os efeitos da poluição, mesmo quando as substâncias são encontradas em níveis sub letais podem alterar a capacidade de natação.

Devido à grande importância de se determinar os efeitos deletérios do carbofurano e de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, e da interação existente entre eles, utilizando como modelo biológico de estudo, o lambari; assim como o efeito do mercúrio sobre a capacidade de natação de *Poecilia vivípara*, sob diferentes salinidades e temperatura, foram elaborados dois

artigos, no qual o primeiro intitula-se: Efeitos ecotoxicológicos do nanotubo de carbono (NTCPM) e carbofurano sobre lambari (*Astyanx* sp.), e o segundo: A utilização da capacidade de natação para avaliar o efeito do mercúrio em *Poecilia vivípara* (Poecilídeos) de acordo com a salinidade e temperatura.

Objetivos

O primeiro objetivo desse trabalho foi: avaliar os efeitos dos nanotubos de carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como biomarcador fisiológico o consumo de oxigênio e a excreção de amônia sobre o modelo biológico selecionado, o lambari (*Astyanax* sp.).

O segundo foi estudar o efeito do mercúrio sobre a capacidade de natação utilizando-se o tempo de natação até o cansaço em *Poecilia vivípara* variando a temperatura e a salinidade.

Apresentação da Dissertação

Os resultados dos trabalhos que culminaram na dissertação são apresentados sob a forma de dois artigos científicos. No primeiro artigo utilizou-se como biomarcador fisiológico o consumo de oxigênio, a excreção de amônia em *Astyanas* sp., para avaliação dos efeitos do carbofurano e dos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e dos dois reagentes em conjunto. No segundo artigo utilizou-se o tempo de natação até o cansaço como indicador do efeito do Hg em *Poecilia vivípara*, de acordo com a salinidade e temperatura.

Capítulo 1: Efeitos ecotoxicológicos do nanotubo de carbono (NTCPM) e carbofurano sobre lambari (*Astyanx* sp.).

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos dos nanotubos de

carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como biomarcador fisiológico o consumo de oxigênio e a excreção de amônia sobre lambari (*Astyanax* sp.). Este artigo seguiu as normas da revista "Water Environment Research".

Capítulo 2: A utilização da capacidade de natação para avaliar o efeito do mercúrio em *Poecilia vivipara* (Poecilídeos) de acordo com a salinidade e temperatura.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do mercúrio sobre a capacidade de natação utilizando-se o tempo de natação até o cansaço em *Poecilia vivipara* de acordo com a salinidade e temperatura. Este artigo seguiu as normas da revista "Water Environment Research".

Referências bibliográficas

ALVES, G.G. 2001 Agrotóxicos no Vale do Ribeira Coordenadoria de defesa agropecuária (CDA) – Escritório de defesa agropecuária de Registro.

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAL, R.; BAPTISTA, D.F. 2007 Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 12 (1): 61 – 72.

BARBIERI, E.; FERREIRA, L.A.A. 2011 Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 on the feshwater fish, nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pest. And physiology* 99:209-214.

BERTOLETTI, E. 1990 Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. São Paulo: Cetesb.

BRASCO, S.M. 1988 O Meio Ambiente em Debate. Ed. Moderna: São Paulo.

BULL, D. e HATHAWAY, D. 1986 Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. Vozes, Petrópolis, 236.

DAI, H.J. 2002. *Surf. Sci.*, 500: 218.

DRESSELHAUS, M.S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P. 2001 Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications Topics in Applied Physics. Springer-Verlag: Nova Iorque, vol.80.

FMC, 1977 Carbofuran data summary. Philadelphia: FMC Corporation: 97.

GOULART, M. e CALLISTO, M, 2003 Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Revista da FAPAM, ano 2, nº 1.

HANDY, R.D.; OWEN, R.; JONES, E.V. 2008 The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges and future needs. *Ecotoxicology* 17: 315 – 325.

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: 821 – 853.

HELLAND, A.; WICK, P.; KOEHLER, A.; SCHMID, K.; SOM, C.; 2007 Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environmental Health Perspectives* 115: 1125 – 1131.

KLEINER, K. e HOGAN, J. 2003 How safe is nanotech? *New Scientist* 177: 14- 115.

MARTINEZ, C.B.R. e 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, O.A.; PIMENTA, J.A.; A bacia do Rio Tibagi. Londrina: MC Gráfica: 551 – 577.

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. *Arquivo Instituto Biológico* 71(2): 221 – 226.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J.; 2005 Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 133: 823 – 839.

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S; JARDIM, W.F. 2010 Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova* 33: 421 – 430.

RAND, G. M; PETROCEL, I S. R. 1984 *Fundamentals of Aquatic Toxicology* 335 – 373.

TOMLIN, C.D.S. 2000 *The pesticide manual*. 12 ed. Farnham: The British Crop Protection Council.

USEPA, 2006 Interim Reregistration Eligibility Decision – Carbofuran. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA- 738-R-706-031.

VAN DYK, J.C. 2005 Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminar investigation. Tese Mestrado – University of Johannesburg, Johannesburg.

WORD HEALTH ORGANIZATION, 1996 *Guidelines for drinking-water quality*. 2ed. Geneva 2. Health criteria and other supporting information: 940 – 946.

CAPÍTULO 1

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (NTCPM) E CARBOFURANO SOBRE LAMBARI (*Astyanax* sp.).

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (NTCPM) E CARBOFURANO SOBRE LAMBARI (*Astyanax* sp).

A. M.Tegon Ferrarini^a, E. Barbieri^b,

^aAlessandra Maria Tegon Ferrarini - Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA – SAA/SP e-mail: aletegon@iq.com.br

^bEdison Barieri - Instituto de Pesca – APTA - SAA/SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, 11990-000, Brasil. (13) 97486496. e-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

RESUMO

O estudo do efeito tóxico do carbofurano e de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM), assim como a interação entre esses dois compostos sobre lambari (*Astyanax* sp.) apresenta relevância para o ambiente, isso devido ao crescente uso deste pesticida na agricultura e de nanotubos na indústria de materiais, apresentando assim influencia sobre a saúde ambiental. Neste estudo objetivou-se obter dados sobre o efeito tóxico do carbofurano, do nanotubos de carbono e da combinação desses compostos sobre *Astyanax* sp., por meio do consumo específico de oxigênio e da excreção de amônia. Para se avaliar o consumo de oxigênio e excreção de amônia foram utilizados um total de 65 peixes submetidos a quatro diferentes concentrações de carbofurano: 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mg/L, além do controle, para nanotubos foram utilizadas as concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 mg/L e na combinação de carbofurano e nanotubos, fixamos 0,5 mg/L de nanotubos por ser considerada letal para organismos e 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mg/L para

carbofurano. Os resultados revelaram diminuição do consumo específico de oxigênio na maior concentração de nanotubos, uma diminuição acentuada para carbofurano e para a modulação entre nanotubos e carbofurano. O consumo de oxigênio em peixes expostos a interação de carbofurano e nanotubos de carbono apresentou variação metabólica em todos os testes realizados. Em relação a excreção de amônia, houve significativo aumento da excreção para nanotubos, uma alternância dos valores para carbofurano e uma progressiva queda para a interação entre carbofurano e nanotubos de carbono. Os resultados permitem inferir que ocorreram alterações na taxa metabólica dos organismos expostos a combinação do carbofurano com nanotubos de carbono, evidenciado na concentração 0,5mg/L + 0,5mg/L, ocorrendo uma diminuição do consumo de oxigênio em aproximadamente 94% em relação ao controle. Já para a excreção de amônia na mesma combinação, houve uma redução de aproximadamente 80% na maior concentração empregada que foi de 0,5mg em relação ao controle. A queda na taxa de consumo de oxigênio e na excreção de amônia ocorreu possivelmente para manter a homeostase do organismo a altas concentrações do xenobiótico.

Palavras-chave: nanopartículas; ambiente; nanotubos de carbono; ecotoxicologia aquática, amônia.

ABSTRACT

The study of the toxic effect of carbofuran and multi-walled carbon nanotubes (NTCPM) as well as the interaction between these two compounds on tetra (Astyanax sp.) Are relevant to the environment, this is due to the increasing use of this pesticide in agriculture and nanotubes in materials industry, with so influence on environmental health. This study aimed to obtain data on the toxicity of carbofuran, carbon nanotubes and the combination of these products

on *Astyanax* sp., through the specific consumption of dissolved oxygen and ammonia excretion. To evaluate the oxygen consumption and ammonia excretion were used a total of 65 fish submitted to four different concentrations of carbofuran: 0.01; 0.05; 0.1 and 0.5 mg/L; for nanotube concentrations were used: 0.1; 0.25; 0.5; 1.0 mg/L and the combination of carbofuran and nanotubes, fixed, 0.5 mg/L nanotubes considered to be lethal to organisms and 0.01; 0.05; 0.1 and 0.5 mg/L for carbofuran. The results showed a decrease of the specific consumption of oxygen in a higher concentration of nanotubes, a marked decrease to carbofuran and modulation between nanotubes and carbofuran. Oxygen consumption in fish exposed to interaction carbofuran and carbon nanotubes had an effect on routine metabolism in all tests. Regarding the excretion of ammonia, there was significant increase in the excretion into nanotubes, an alternation of values for carbofuran and a progressive fall for interaction between carbofuran and carbon nanotubes. Results show that there were changes in the metabolic rate of the organisms exposed to the combination of carbofuran with carbon nanotubes, evidenced in the concentration 0.5 mg/L + 0.5 mg/L, causing a decrease in oxygen consumption by approximately 94% compared the control. As for the excretion of ammonia in the same combination, there was a reduction of approximately 80% at the highest concentration used was 0.5 mg compared to control. The drop in oxygen consumption rate and ammonia excretion possibly occurred to maintain homeostasis of the organism to high xenobiotic concentrations.

Keywords: nanomaterials; environment; carbon; nanotubes; aquatic ecotoxicology, ammonia.

1. INTRODUÇÃO

As respostas fisiológicas apresentam três importantes aspectos que podem ser utilizados como indicadores para avaliar da qualidade do meio ambiente: representam a integração de vários processos bioquímicos celulares

que podem ser alterados frente às variações ambientais; representam respostas não específicas dos organismos à soma de vários fatores externos; e são, ainda, capazes de refletir a deterioração do meio antes que esta atinja níveis populacionais ou de comunidades (ADAMS, 1990).

Diversos tipos de respostas fisiológicas podem ser utilizadas para esse fim (ADAMS, 1990), como por exemplo o metabolismo em peixes avaliado por meio do consumo de oxigênio e excreção de amônia. Estes dois parâmetros, por serem resultantes da interação de vários processos, refletem o estado físico geral do animal, e constituem-se em indicadores sensíveis para detectar alterações do meio circundante (BARIERI, 2007).

A taxa respiratória é uma medida útil e sensível de seu dispêndio diário de energia (BARBIERI e PAES, 2011). Deste modo, em animais aeróbicos, a quantificação da taxa de consumo de oxigênio estará diretamente associada à quantidade de energia liberada a partir da oxidação do substrato alimentar. Através da quantidade de oxigênio consumido, por um determinado período, por um animal, pode-se estimar a energia despendida, durante o mesmo período para a manutenção de seus processos vitais (CARVALHO, 1992).

Segundo BARBIERI (2007), o metabolismo de peixes inclui três níveis bem diferenciados: metabolismo basal, metabolismo de rotina e metabolismo ativo. O metabolismo basal é a energia correspondente às necessidades mínimas para o peixe manter-se vivo, associado a um estado de repouso e não alimentado. O metabolismo de rotina é a fração de energia utilizada por peixes, quando não alimentados, com movimento de natação espontânea, ou atividade rotineira. Já o metabolismo ativo representa a taxa metabólica no nível máximo de atividade, como por exemplo, a natação para captura de presa.

A diferença entre metabolismo ativo (máximo) e metabolismo basal (mínimo) é denominada por FRY (1971), como “disponibilidade energética para a atividade” ou a quantidade de energia disponível para processos diferentes da manutenção de funções essenciais, tais como natação, reprodução,

crescimento, etc. Esta “disponibilidade energética para a atividade” reflete o estado fisiológico do animal que por sua vez é ligado às condições ambientais.

Em todos os níveis da escala filogenética animal encontram-se vários exemplos de ataque, defesa e outros comportamentos que dependem de substâncias repelentes, paralisantes ou de outras ações farmacológicas. Durante os milhões de anos de evolução os organismos desenvolveram um refinamento dessas substâncias para diversas funções, a captura de presas e as defesas químicas em geral (FREITAS, 1990).

Agente tóxico é qualquer substância química (ou agente físico, para alguns cientistas) que, interagindo com um organismo vivo, é capaz de produzir um efeito tóxico seja este uma alteração funcional ou a morte. (LEITE e AMORIM, 2006). Assim, intimamente relacionado ao conceito de agente tóxico, existem dois outros conceitos muito importantes: o de Toxicidade e o de Risco.

A maioria das substâncias químicas consideradas como agentes tóxicos, são substâncias exógenas aos organismos, conhecidas como xenobióticos. O termo xenobiótico, derivado do grego “*xeno*” que significa estranho, é usado para indicar uma substância estranha ao organismo.

Agentes Tóxicos são substâncias químicas capazes de causar danos a um sistema biológico, alterando uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição. Uma substância muito tóxica causará dano a um organismo se for administrada em quantidades muito pequenas, enquanto que uma substância de baixa toxicidade somente produzirá efeito quando a quantidade administrada for muito grande. (OGA, 2003).

Segundo DAGNINO e JUNIOR (2007), os conceitos de risco têm sido utilizados em diversas ciências e ramos do conhecimento e adaptados segundo os casos em questão. Nessas situações, frequentemente, o termo riscos é substituído ou associa-se a potencial, susceptibilidade, vulnerabilidade, sensibilidade ou danos potenciais.

De acordo com a conceituação de VEYRET e MESCHINET de RICHEMOND (2007), os riscos ambientais “*resultam da associação entre os riscos naturais e os riscos decorrentes de processos naturais agravados pela atividade humana e pela ocupação do território.*”

Em toxicologia, risco baseia-se no estudo interativo das ciências exatas (matemática/estatística), ciências biológicas e sociais, de modo a reduzir o empirismo, as incertezas e falhas na avaliação de toxicidade de agentes químicos. A toxicologia ambiental, por sua vez, estuda as interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos. (CALDAS e BRILHANTE, 1999).

Segundo CALDAS (1999), o risco potencial em toxicologia ambiental trata do estudo da probabilidade de fontes perigosas para a saúde e o meio ambiente, capazes de provocar dano, doença ou morte para os seres vivos quando em concentrações superiores àquelas que estes possam assimilar em condições normais, isto é, absorver, distribuir, metabolizar e eliminar do organismo.

No contexto de estudos ambientais e de monitoramento biológico, tanto “disponibilidade energética para atividade” como o “metabolismo de rotina” são utilizados (MAKI, 1979; SMITH and HARGREVES, 1984; SCHERECH, 1990; BARBIERI *et al.* 2002) e constituem ferramentas eficientes para se medir o efeito tóxico de uma substância química em um dado organismo.

A Nanotecnologia é uma ciência que está relacionada à manipulação da matéria ao nível molecular, visando à criação de novos materiais, substâncias e produtos, aplicada em processos biológicos. Hoje são fabricados através desse processo: Filtros com nanotubos de carbono, nanocatalisadores para reduzir a poluição atmosférica, nanosensores para detectar materiais tóxicos, dispositivo para sequenciar moléculas simples de ácido nucléico via nanoporos, nanomembranas e argilas, nanosensores para a detecção de patógenos e contaminantes, reciclagem de água via polímeros nanoporosos, partículas magnéticas, etc (LUZ *et al.*, 2011).

Os subprodutos da nanotecnologia são cada vez mais produzidos e tornando-se possíveis contaminantes ambientais (LUZ *et al.*, 2011).

No entanto, há tempos têm-se perguntado de como se dá a interações dos nanomateriais com o meio ambiente e possíveis riscos a este meio e ao ser humano. Por esse motivo muitas perguntas ainda estão para ser respondidas como: Através de qual meio estes materiais penetram no ambiente? Quais são os modos de dispersão destes materiais no ambiente? Estes materiais são transformados no ambiente? Qual é a estabilidade da nanoestrutura? Ela se decompõe ou se aglomera? São solúveis em água? São degradadas? Quais são os sub-produtos gerados da degradação destas estruturas? Qual é a toxicidade destes materiais? Estas matérias sinergem ou antagonizam com outros contaminantes? (MARTINEZ e ALVES, 2013)

De acordo com MARTINEZ e ALVES (2013,) é importante levar em consideração que os nanomateriais podem tornar-se contaminantes ambientais emergentes, em um futuro não muito distante, uma vez que há um crescente interesse por esses tipos de materiais.

Contaminantes ou poluentes emergentes são substâncias potencialmente tóxicas das quais os efeitos ou a presença no ambiente são ainda pouco conhecidos. Ou seja, engloba tanto substâncias que já vêm sendo utilizadas a tempos, como também novas substâncias decorrentes dos avanços tecnológicos. Como exemplo dessas substâncias pode-se destacar vários pesticidas, compostos polihalogenados, medicamentos, cosméticos, entre outros (MOREIRA e GONÇALVES, 2013), assim como as nanopartículas.

Segundo MOREIRA e GONÇALVES (2013), estas substâncias têm sido introduzidas no ambiente em larga escala e, devido às suas propriedades físico-químicas, como persistência, volatilidade, lipofilicidade, etc. são amplamente distribuídas no ambiente e podem impactar a saúde ambiental por um período de tempo relativamente longo.

As nanopartículas podem ser tóxicas pela sua composição, pelo seu tamanho e pela sua forma. (RENWICK *et al.*, 2004). Partículas menores são mais reativas e, em geral, mais tóxicas.

Os nanotubos de carbono apresentam propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas muito interessantes (DRESSELHAUS *et al.*, 2001). Desta forma, esses materiais têm sido usados na confecção de diferentes tipos de dispositivos, como emissores de elétrons para mostradores, sensores de gases e sensores biológicos, pontas para microscópio de força atômica (AFM) e, quando combinados a outros materiais, como polímeros e fibras, servem como elementos de reforço formando compósitos com excelentes propriedades mecânicas (DAI, 2002).

Uma das classes de inseticidas mais comumente utilizados no Brasil, são os carbamatos, muito eficientes no controle de uma ampla gama de pragas agrícolas e que atua por contato ou após ingestão (FMC, 1977). O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato), um dos principais representantes do grupo dos carbamatos, é altamente tóxico para peixes, pássaros e humanos, sendo a sua ingestão diária aceitável de 0,0mg/Kg/dia a 0,002mg/Kg/dia, o que estabelece seu limite para $7\mu\text{gL}^{-1}$ (WORD HEALTH ORGANIZATION, 1996). Embora possa ser facilmente degradado, pode induzir efeitos deletérios a espécies não-alvo, antes que ocorra uma dissipação ambiental (MOREIRA *et al.*, 2004).

Similar a outros inseticidas carbamatos e organofosfatos, o modo de ação do carbofurano se baseia na inibição da atividade da acetilcolinesterase nas junções sinápticas e neuromusculares (JASH e BHATTACHARAYA, 1983), e peixes expostos a concentrações subletais desses pesticidas tem apresentado diversos comportamentos de toxicidade relatados em alguns estudos, incluindo efeitos neuromotores na atividade natatória (LITTLE e FINGER, 1990; BARBIERI e FERREIRA, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos nanotubos de carbono, carbofurano e a combinação de nanotubos de carbono com o carbofurano, sobre o metabolismo de Lambari, (*Astyanax* sp.), através do consumo de oxigênio e excreção de amônia. A hipótese deste trabalho é que com a presença dos xenobióticos no meio aquático, haverá aumento ou diminuição, no consumo de oxigênio e excreção de amônia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Reagentes químicos

Foram utilizadas duas substâncias como reagentes: o carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) (99,5%, Sigma), pesticida químico conhecido popularmente como carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTPCM) .

Utilizou-se nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) [Ctube 100, CNT Co. Ltd., Incheon – South Korea] oxidados em ácido nítrico com o intento de gerar grupos oxigenados na superfície dos nanotubos e melhorar sua dispersão em água, como descrito em Martinez et al. (2013). Os nanotubos de carbono utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os nanotubos de carbono no volume de 250 ml, na concentração de 200 mg/L foram sonificados por 30 minutos em banho ultrasônico (Coleparmer 8891), com o objetivo de suspender os nanotubos. Já o carbofurano foi diluído em uma solução estoque de 1mg:1ml com água ultra pura.

2.2. Peixe

Os peixes utilizados nos experimentos foram retirados dos tanques de piscicultura da APTA - Pólo Regional Vale do Ribeira – Pariquera-Açu (24°36'38.24"S – 47°53'02.80"W). A espécie *Astyanax* sp. foi introduzida nos tanques para a reprodução a partir de exemplares coletados no Rio Ribeira de Iguape, tratando-se de uma espécie diferente do *Astyanax altiparanae*.

Peixes do gênero *Astyanax* são bastantes comuns na região do Vale do Ribeira, sendo comum sua presença no rio Ribeira de Iguape. De acordo com

CORT e GHISI (2014), peixes do gênero *Astyanax*, popularmente conhecidos como lambaris, tem potencial como bioindicador, pois são espécimes bastante comuns, de pequeno porte, onívoros e com um valor econômico considerável e sendo usados em vários estudos de biomonitoramento e bioensaio.

2.3. Experimento

Foram utilizados para esse estudo um total de 65 lambaris (*Astyanax sp.*) oriundos da estação de piscicultura da APTA Pariquera-Açu. Os testes com toxicidade aguda foram realizados no Instituto de Pesca de Cananéia-APTA/SAA/SP.

Os peixes foram pesados em balança analítica em gramas (g) e medidos em centímetro (cm) com auxílio de um ectiômetro.

O delineamento experimental constitui de 65 exemplares com peso médio de 4,5g e 6,0cm de comprimento para cada um dos estudos de toxicidade, ou seja, 65 exemplares para consumo de oxigênio e 65 exemplares para excreção de amônia. Os peixes foram estocados individualmente em aquários de capacidade máxima de volume de água de 50L, entretanto, para evitar que os peixes pulassem do aquário, utilizamos 20% da capacidade do mesmo. Durante todo o experimento a temperatura foi mantida a 20 graus C.

Para se avaliar o efeito da exposição ao carbofurano, ao nanotubos de carbono e a combinação de ambos, para os estudos de consumo de oxigênio e excreção de amônia, dividimos os indivíduos em 4 tratamentos para cada substância contendo 5 indivíduos para cada tratamento, nas seguintes concentrações:

TC = Tratamento controle.

TCA = Tratamento com carbofurano: TCA1 0,01 mg; TCA2: 0,05 mg; TCA3: 0,1 mg e TCA4: 0,5 mg.

TNC = Tratamento com nanotubos de carbono: TNC1: 0,1 mg; TNC2: 0,25 mg; TNC3: 0,5 mg; TNC4: 1,0 mg.

TCA+TNC = Tratamento contendo a combinação de carbofurano e nanotubos de carbono nas seguintes concentrações: TCA1: 0,01mg; TCA2: 0,05mg; TCA3: 0,1mg e TCA4: 0,5mg de carbofurano e tratamento com nanotubos de carbono fixado a concentração de 0,5mg. Totalizando 12

tratamentos e um controle. Um segundo grupo controle também foi mantido com o objetivo de substituir algum indivíduo caso ocorresse morte de um peixe.

Em síntese, os 12 grupos foram expostos às seguintes concentrações de carbofurano: 0,01mg/L; 0,05mg/L; 0,1mg/L; e 0,5mg/L; nanotubos de carbono nas seguintes concentrações: 0,1mg/L; 0,25mg/L; 0,5mg/L e 1,0mg/L e na combinação carbofurano e nanotubos as concentrações: 0,01mg/L; 0,05mg/L; 0,1; e 0,5mg/L acrescidos de 0,5mg/l de nanotubos de carbono, além do grupo controle.

2.3. Consumo específico de oxigênio (mg/g/L)

Neste experimento, para avaliação do metabolismo de rotina, foram utilizado um total de 25 peixes com peso médio de 4,5 g e comprimento médio de 6,0 cm, distribuídos igualmente em 5 aquários, sendo 1 deles o controle. Foram utilizados 25 peixes para os tratamentos com carbofurano, sendo 5 para o controle e 5 para cada concentração; 20 peixes para os tratamentos com nanotubos de carbono e mais 20 peixes para os tratamentos combinados entre carbofurano e nanotubos de carbono. Os indivíduos permaneceram por 1 hora em um tanque com oxigenação por bombas de ar, esse tanque possui volume total de 500 litros para adaptação no mesmo meio onde foram transportados; em seguida foram retirados da embalagem de transporte e alimentados ainda dentro do tanque, onde permaneceram por 24 horas. Posteriormente os peixes foram transferidos para os aquários de 50L, também com oxigenação por bombas de ar, sendo colocados cinco indivíduos em cada aquário, permanecendo por mais 1 hora para aclimação.

Após o processo de aclimação, um indivíduo de cada aquário foi retirado e introduzido em um recipiente cilíndrico de acrílico, com circulação contínua de água, chamado de respirômetro. Foram utilizados 5 respirômetros, apenas um indivíduo foi colocado no respirômetro, sendo um peixe para cada respirômetro, onde permaneceu por mais 1 hora para novo processo de aclimação. Essa aclimação faz-se necessária para diminuir o estresse causado pelo manejo do peixe de um local para outro. Esses respirômetros

foram acondicionados em um recipiente contendo água, de aproximadamente 50 litros, chamados de *sistema*.

Posteriormente o fluxo de água foi interrompido e com o auxílio de uma micropipeta, os volumes já calculados das substâncias tóxicas foram inseridos no interior dos *respirômetros*, que em seguida foram cuidadosamente fechados evitando-se a presença de bolhas de ar no seu interior, objetivando obter dados para a avaliação do consumo de oxigênio em um volume específico de água. Os peixes foram submetidos a presença das substâncias tóxicas por 1 hora.

A medida do consumo específico de oxigênio resultou da diferença entre as taxas de oxigênio medidas no início e ao final do confinamento nos respirômetros. Para o cálculo do consumo específico de oxigênio (ml/g/h) durante o período, considerou-se o volume do respirômetro e o peso do animal. O oxigênio dissolvido foi determinado segundo o método de Winkler (WINKLER, 1888).

Para obtenção da quantidade (ml) desejada de carbofurano e de nanotubos de carbono a serem colocados nos respirômetros, determinou-se a “solução mãe” de: 1,0 mg/carbofurano/ml e 1,0 mg / nanotubos de carbono/ml e a partir desta os volumes foram determinados.

Nenhum indivíduo foi usado mais que uma vez. Não houve mortalidade dos indivíduos utilizados.

2.4. *Excreção de amônia*

Para a realização deste experimento de tomada de excreção de amônia, foram utilizados 25 indivíduos.

Antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos no tanque de aclimação com oxigenação pelo período mínimo de 1 hora para atenuar o estresse causado pelo manuseio. Foi adicionado tiosulfato de sódio na água do tanque, para neutralizar o cloro.

Após o período de 1 hora para a adaptação dos peixes, as quantidades definidas de carbofurano, nanotubos de carbono e a combinação de ambos, foram adicionadas ao respirômetro. Para obtenção da concentração desejada de carbofurano e de nanotubos de carbono, o volume necessário das substâncias foi calculado para cada respirômetro e adicionado a ele com auxílio de micropipeta ao final da aclimatação dos peixes. Assim que as substâncias foram adicionadas, o orifício do respirômetro foi selado. Imediatamente após cada experimento, o peso dos peixes foi mensurado.

A excreção de amônia foi calculada pelo método Nessler.

As médias do consumo específico de oxigênio e da excreção de amônia dos peixes estudados foram avaliadas, primeiro quanto a sua normalidade, através do teste Shapiro-Wilk. Após esse procedimento como a distribuição foi normal, utilizou-se análise de Variância (ANOVA) seguida de testes de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0.01$).

3. RESULTADOS

3.1. *Consumo específico de oxigênio*

3.1.1. *Carbofurano*

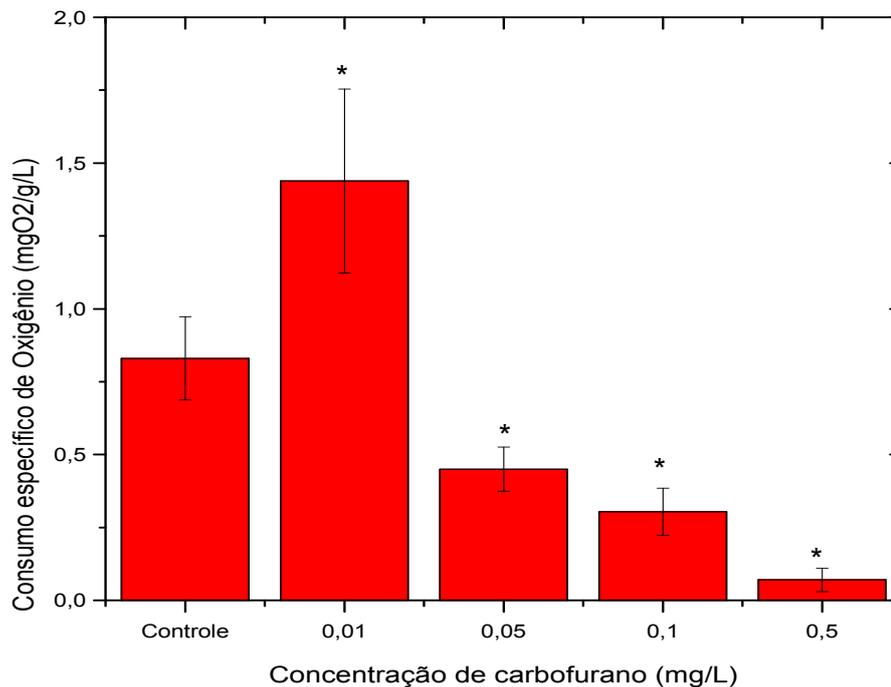


Figura 1 - Consumo específico de oxigênio (mlO₂/g/L) em relação a concentração de Carbofurano (mg/L). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

O consumo específico de oxigênio em indivíduos expostos ao carbofurano aumentou consideravelmente na concentração 0,01 mg/L, sendo este aumento correspondente a aproximadamente 42% em relação ao controle (Figura 1). A partir da concentração 0,05 mg/L até a maior concentração empregada (0,5mg/L) houve uma queda no consumo específico de aproximadamente 80% em relação ao controle. Houve diferença estatística em todas as concentrações empregadas ao serem comparadas ao controle (ANOVA, Tukey, $P < 0.001$).

3.1.2. Nanotubos de carbono

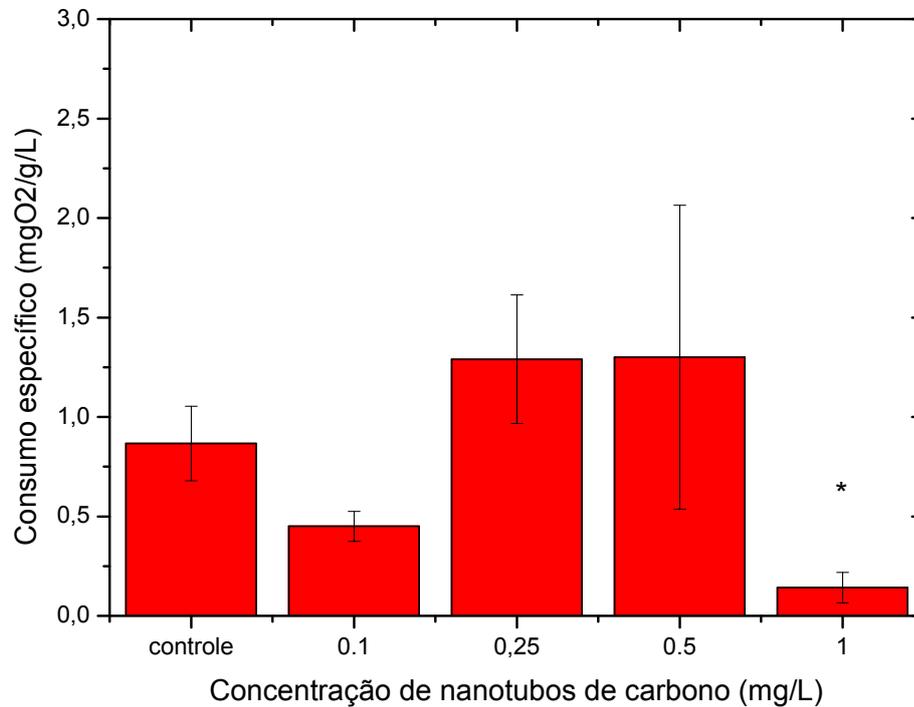


Figura 2 – Consumo específico de oxigênio (mlO₂/g/l) em relação a concentração de nanotubos de carbono (mg/l). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

O consumo específico de oxigênio variou significativamente somente para os organismos expostos a concentrações de 1,0 mg/l, houve inicialmente uma queda na menor concentração em relação ao controle seguido de um aumento e uma queda de aproximadamente de 80% na concentração maior (1,0 mg/l).

3.1.3. Nanotubos de carbono e carbofurano

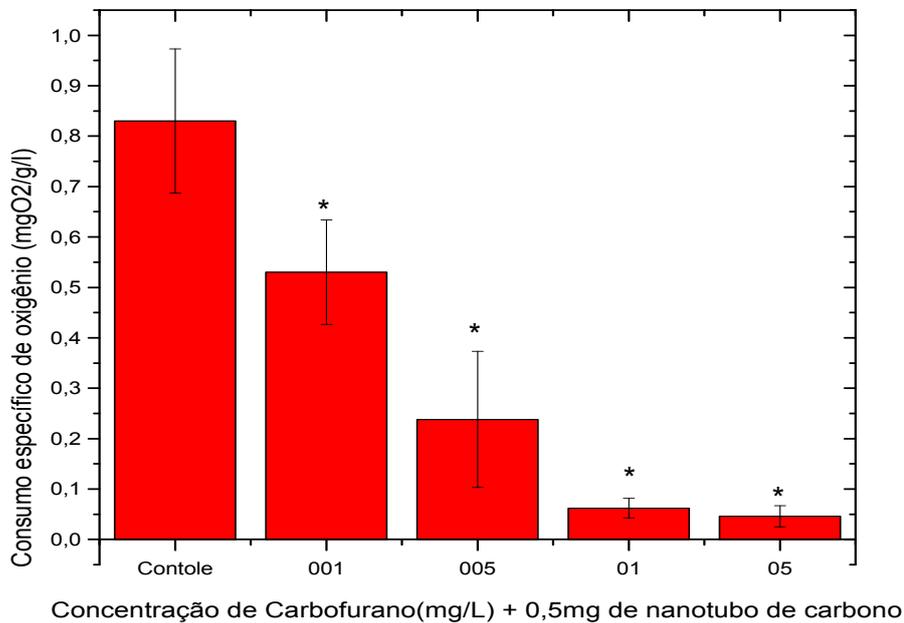


Figura 3 – Consumo específico de oxigênio (mlO₂/g/l) em relação a concentração de carbofurano + 0,5 mg de nanotubos de carbono (mg/l). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Para peixes expostos a combinação entre carbofurano e nanotubos de carbono registrou-se uma diminuição dose dependente no consumo específico de oxigênio em relação ao controle. Aplicando o teste estatístico (ANOVA, Tukey) constatou-se que em todas as concentrações empregadas houve diferença estatística (Figura3).

3.2. Excreção de amônia

3.2.1. Carbofurano

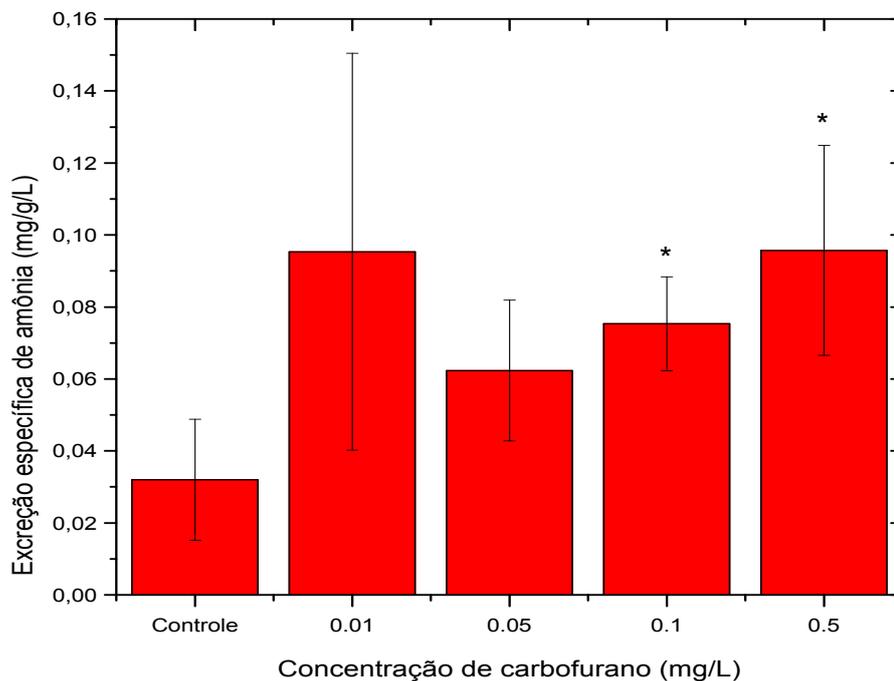


Figura 4 – Excreção específica de amônia (mg/g/l) em relação a concentração de carbofurano (mg/l). * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Os resultados obtidos para a excreção específica de amônia em relação ao aumento das concentrações de carbofurano foi evidenciado por uma tendência de elevação das taxas de excreção em relação ao controle. Entretanto, ao empregar o teste estatístico a ANOVA, seguido de múltiplas comparações (Tukey), somente as concentrações de 0,1mg/l e 0,5mg/l foram diferentes em relação ao controle (Figura 4).

3.2.2. Nanotubos de carbono

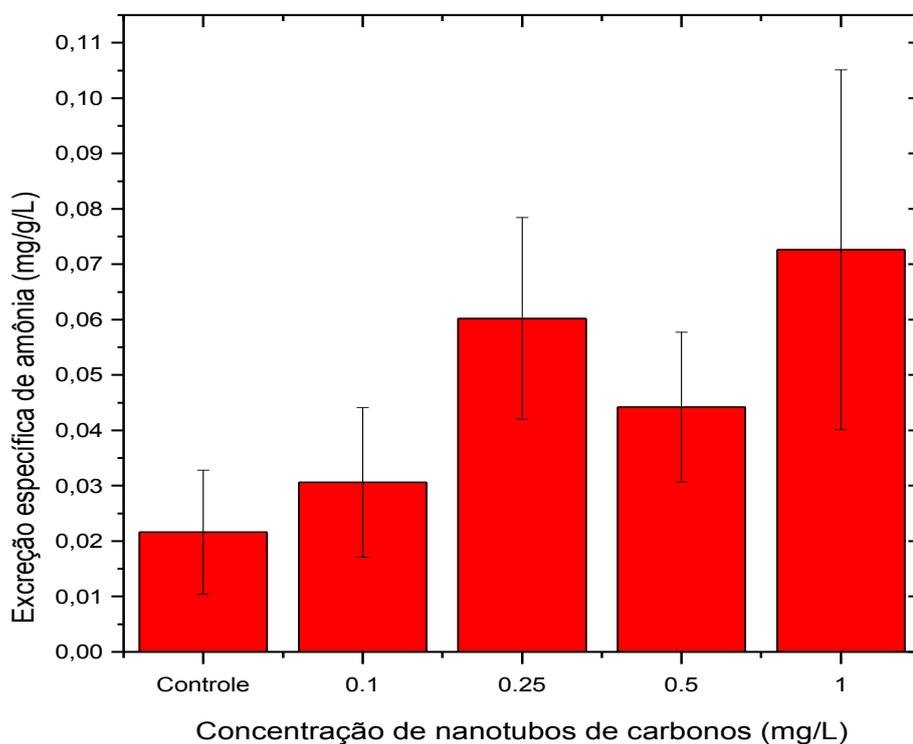


Figura 5 – Excreção específica de amônia (mg/g/l) em relação a concentração de nanotubos de carbono (mg/l) * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

A excreção específica de amônia mostrou uma tendência de aumento nos valores a medida que as concentrações de nanotubos de carbono aumentaram. Entretanto, quando aplicado o método estatístico (ANOVA) não houve diferença estatística em relação ao controle (Figura 5)

3.2.3. Nanotubos de carbono e carbofurano

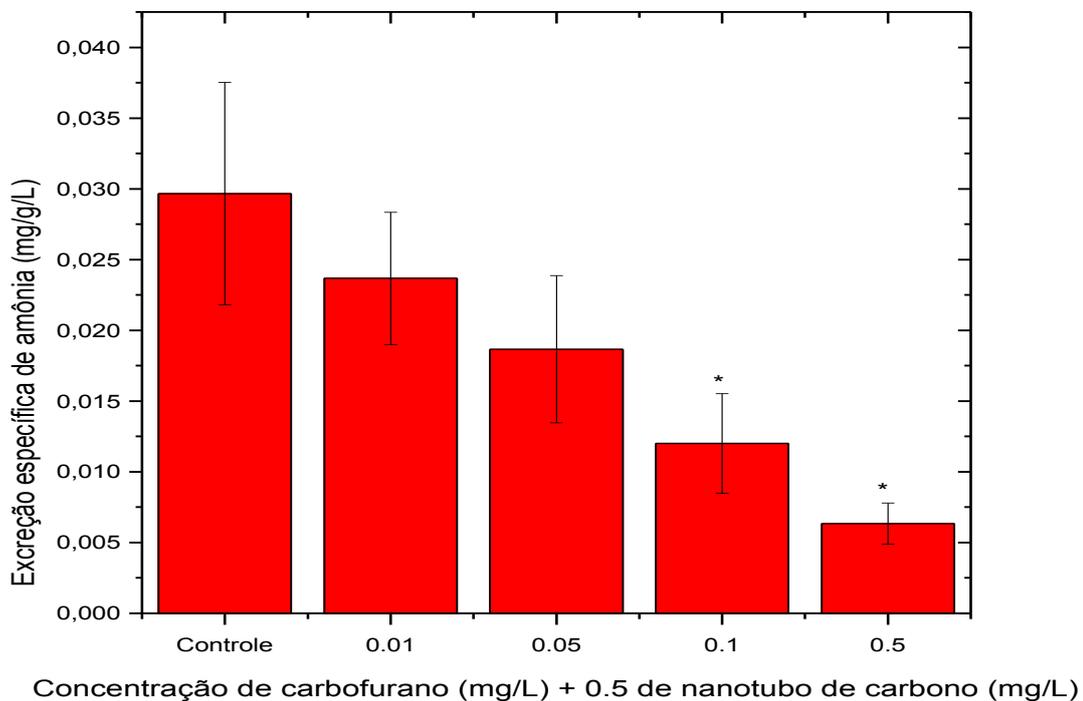


Figura 6 – Excreção específica de amônia (mg/g/l) em relação a concentração de carbofurano (mg/l) + 0.5mg/l de nanotubos de carbono. * apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Avaliando-se a combinação de nanotubos de carbono e carbofurano constatou-se que não houve diferença estatística para as concentrações 0,01mg e 0,05mg na excreção específica de amônia. Entretanto nas concentração de 0,1mg e 0,5mg acrescida de 0,5 de nanotubo de carbono foi estatisticamente diferente em relação ao controle. (Figura 6).

3. DISCUSSÃO

Segundo ARIAS, *et al.* (2007), nos últimos anos a biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas, que são lançadas diariamente em ambientes abertos e sem o devido tratamento, a partir de diversas fontes de emissão. Esses poluentes podem provocar alterações no metabolismo dos peixes como observado nos resultados obtidos com testes realizados em *Astyanax* sp., representados no consumo específico de oxigênio e excreção de amônia.

Na aquicultura, a piscicultura pode ser um alvo dessa contaminação por substâncias tóxicas, uma vez que muitas estações de cultivo captam água de rios próximos, e estes por sua vez, podem conter a presença desses xenobióticos, como por exemplo o carbofurano. O presente estudo mostra a ação do carbofurano como agente potencialmente tóxico para as funções metabólicas de peixes, destacando como biomarcadores o consumo de oxigênio e a excreção de amônia.

É frequente que áreas de cultivo de peixes e outros organismos aquáticos estejam sujeitos a receberem água contaminada por pesticidas por estarem próximos a campos de cultivo de vegetais tratados com essas substâncias (HERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2011; BARBIERI *et al.*, 2013).

Sabe-se que grande parte dos agrotóxicos, quando mal utilizados, podem atingir não só a espécie alvo, mas também destruir os recursos naturais em áreas maiores, contaminar a fauna e a flora da região onde são aplicados. (GUIVANT, 1992).

A contaminação pode acontecer de forma direta ou indireta. Diretamente, por escoamento e esgoto e por contaminantes industriais, ou indiretamente pelo acúmulo de substâncias no solo, que podem chegar até os recursos hídricos (RIVERO, 2007). O carbofurano, pesticida pertencente ao grupo dos carbamatos, é amplamente utilizado na agricultura. Nos testes

realizados com lambari esse agente tóxico, quando usado isoladamente demonstrou efeito significativo na redução do consumo específico de oxigênio para altas concentrações e aumento na excreção de amônia. Já na combinação com nanotubos de carbono, o efeito resultou em diminuição em ambos biomarcadores para todas as concentrações empregadas, indicando redução na eficiência respiratória e nos produtos metabólicos.

MARTINEZ *et al.* (2013), nos estudos realizados com juvenis de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), encontraram efeito sinérgico pesquisando nanotubos de carbono interagindo com Pb (chumbo), o que resultou, entre outros dados, toxicidade superior na modulação Pb + nanotubos de carbono em relação ao controle, comparado ao Pb isoladamente, e diminuição no consumo de oxigênio em mais de 20% em relação às duas substâncias separadamente.

Essa resposta também encontra se presente nos testes realizados com a combinação de nanotubos de carbono e carbofurano para o lambari, reforçando a hipótese de que o consumo de oxigênio pode ser alterado quando xenobióticos então presentes no meio aquático, sendo ainda seu efeito potencializado quando combinados.

Com a crescente contaminação do ambiente aquático, o potencial de interação de carbofurano com nanomateriais precisa ser considerado. A indústria de nanotubos de carbono está crescendo muito rápido e a produção industrial já alcançou várias toneladas por ano. Portanto, a investigação da interação dos poluentes clássicos com nanotubos de carbono é uma questão importante e requer mais atenção. (UMBEZEIO *et al.*, 2011).

O carbofurano é um pesticida muito utilizado na agricultura, principalmente nos cultivos de bananais na região do Vale do Ribeira-SP. Avaliando por um ano a qualidade da água em localidades de suprimento para 10 cidades do Ribeira do Iguape, São Paulo, NOGUEIRA MARQUES *et al.* (2002) encontraram 20% das amostras de água superficial com resíduos de pesticidas, dentre os quais o carbofurano representou 50%.

O presente estudo mostrou que a interação desse clássico pesticida com nanotubos de carbono atua diretamente no metabolismo do lambari, o que reforça a ideia de que a combinação de pesticidas com nanotubos de carbono, podem se tornar um potencial poluente para o ambiente, atingindo fisiologicamente as comunidades de peixes onde esses poluentes são encontrados.

GARCIA *et al.* (2013), em estudos realizados com Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) obteve aumento no consumo específico de oxigênio nos indivíduos submetidos a altas doses de carbofurano, o que resultou em aumento das taxas metabólicas do peixe.

Segundo RAND e PETROCELLI (1984), peixes podem absorver pesticidas diretamente da água, sendo as brânquias o principal órgão de absorção. A diminuição do consumo específico de oxigênio está intimamente associada à diminuição do metabolismo, visualmente observado durante os experimentos através da baixa mobilidade dos indivíduos expostos a concentrações maiores de carbofurano e nanotubos de carbono.

No estudo com *Astyanax* sp., os resultados mostraram que nos testes com carbofurano isoladamente, pode-se inferir que houve uma resposta metabólica à presença do agente tóxico, ficando evidenciado pela elevação do consumo de oxigênio na menor concentração e posteriormente uma diminuição significativa do consumo nas maiores concentrações empregadas. Essa reação fisiológica em resposta a presença de xenobióticos está diretamente associada a alterações no metabolismo e ocorre em decorrência da tentativa do animal em manter a homeostase.

Segundo VARGAS *et al.* (1991), xenobióticos afetam os processos de respiração dos organismos induzindo-os a usar outras fontes de energia, que pode ser empregada para as reações de desintoxicação e estabilização de padrões metabólicos, o que pode explicar a modificação no consumo específico de oxigênio em relação ao controle no presente trabalho. A medida em que a concentração de carbofurano e nanotubos de carbono e da combinação de ambas substâncias foram elevadas ocorreu uma alteração nos

valores de consumo de oxigênio. Os testes aplicados foram sensíveis ao efeito tóxico dos nanotubos de carbono, para o consumo específico de oxigênio assim como para a excreção específica de amônia.

Nos testes para excreção de amônia realizados com lambari, houve um aumento estatisticamente significativo em relação ao controle quando submetidos a presença de carbofurano nas maiores concentrações. Já na combinação entre carbofurano e nanotubos de carbono houve diferença estatística em relação ao controle, evidenciado pela diminuição da excreção.

Barbieri *et al.* (2011) identificaram modificações na excreção de amônia nos estudos de toxicidade realizados em *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes concentrações de Folidol 600. Neste estudo houve aumento na excreção de amônia em até em até 200% em relação ao controle.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a exposição de 6 horas a baixas concentrações de Folidol 600 (0,5-1,0 mg L⁻¹) promoveram respostas hematológicas em *Oreochromis niloticus*, semelhantes aos observados em outros peixes expostos a pesticidas organofosforados como: Carbofuran e Molinato (HEATH *et al.*, 1993) e Folidol 600 (AGUIAR *et al.*, 2004).

HEATH *et al.* (1993) e AREECHON e PLUMB (1990) propõem que esta resposta provavelmente ocorre devido a uma possível lesão no tecido branquial, resultando em hipoxia interna e uma estimulação da eritropoiese. Lesões no tecido sanguíneo sem respostas biológicas significativas dos tecidos, sugerem uma perda da capacidade de manter a homeostase.

Em testes de toxicidade de amônia – N, realizados por DOI *et al.* (2012) com juvenis de Cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766), espécie de peixe marinho popularmente conhecido como Bijupirá, os resultados apresentaram predominância na diminuição do consumo específico de oxigênio. A excreção de amônia diminuiu à medida que a concentração de amônia-N aumentou para os indivíduos aclimatados a 25°C e expostos

diferentes salinidades. Esses resultados representam uma diminuição no nível metabólico desses animais.

O presente estudo também indicou que a excreção de amônia diminuiu em juvenis de Cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) expostos a ambiente contendo amônia-N na concentração 5-40 mg/l. Devido ao aumento da dificuldade de excretar amônia, a primeira reação de um animal aquático pode ser uma redução ou paralisação da atividade de alimentação para minimizar gastos metabólicos. Portanto, um dos efeitos sub letais deste composto é a diminuição na excreção, podendo diminuir a taxa de crescimento (ARANA, 2000).

Em peixes de água doce os resíduos finais do metabolismo proteico são excretados principalmente na forma de amônia e os mecanismos dessa excreção são por meio de brânquias e rins e em algumas espécies de peixes, a pele pode exercer essa função. (BOMBARDELI *et al.*, 2003).

Os resultados de excreção de amônia obtidos na combinação de nanotubos de carbono e carbofurano evidenciou a diminuição nas taxas de excreção, isso em peixes de água doce, demonstra uma queda no metabolismo de proteínas como mecanismo de manter o equilíbrio energético do peixe, sendo fundamental para o crescimento dos mesmos.

O decréscimo na taxa de crescimento dos peixes, quando comparados desde seus estados de desenvolvimento iniciais até juvenis, ou até mesmo animais adultos, ocorreu devido a uma redução na taxa de síntese proteica e inclusive do “turnover” (degradação proteica) corporal (FAUCONNEAU, 1995).

Segundo MOMMSEN (1998), situações atípicas podem estimular a síntese proteica que não estão diretamente relacionadas ao crescimento, como por exemplo estresse como choque térmico (quente), privação de nutrientes, distúrbios metabólicos, toxidez por metais, infecção viral e outros. (CHO *et al.*, 1997; CURRIE *et al.*, 2000; RAZO *et al.*, 2001).

Segundo HANDY (2008) há claras interações entre nanopartículas de carbono com os poluentes existentes no meio ambiente, agravando sua toxicidade. Dessa forma, o carbofurano em conjunto com nanotubos de carbono aumentou seu efeito tóxico sobre o lambari, visto a diminuição de consumo específico de oxigênio, quando as duas substâncias estavam presentes em comparação as duas separadamente, ocorrendo o mesmo para a excreção de amônia.

De acordo com BAYNE *et al.* (1985), um estresse ambiental, provocado ou não, por um poluente tóxico, pode induzir variação na proporção de nitrogênio como produto de excreção.

NOGUEIRA MARQUES *et al.* (2007) constataram que o carbofurano foi um dos pesticidas que apresentou maior mobilidade disperso em água superficial e subterrânea por sua elevada meia-vida. O crescente uso de nanopartículas manufaturadas, aumenta a possibilidade dessas duas substâncias, interagirem no ambiente aquático, podendo maximizar a toxicidade do carbofurano, o que traria problemas para a biota.

Os organismos ao terem seus processos respiratórios afetados por xenobióticos, tendem a buscar outros mecanismos de energia na tentativa de desintoxicar e estabilizar seus padrões metabólicos, (VARGAS *et al.*, 1991).

Os mecanismos fisiológicos dos seres vivos tem a função de regular seu meio interno para manter uma condição estável mediante múltiplos ajustes com o objetivo de manter a homeostase. Para alguns animais a exposição a esses xenobióticos serão altamente letais.

Devido a importância econômica e ecológica de peixes de água doce e os problemas relacionados com a poluição da água (MARTINEZ *et al.*, 2013), faz-se necessário um monitoramento e controle da presença desses contaminantes no ambiente.

BULL e HATHAWAY (1986) relataram que, na medida em que são aplicados em excesso, ou de maneira errônea, os agrotóxicos acentuam

demasiadamente os problemas do meio ambiente.

Segundo RIVERO (2007), no monitoramento ambiental, os peixes são bons bioindicadores para comparação entre áreas poluídas e não poluídas. Recomenda-se a utilização desses organismos, pois peixes podem ser encontrados virtualmente em qualquer local no ambiente aquático e desempenham um papel ecológico importante nas cadeias alimentares, levando energia dos níveis inferiores aos superiores. (CORT e GHISI, 2014).

Ainda há muito a ser elucidado acerca dos mecanismos de interação entre nanopartículas de carbono e outras substâncias presentes no ambiente aquático e a forma pela qual os organismos em contato com estes xenobióticos são afetados, assim sendo, estudos precisam ser realizados com a finalidade de compreender melhor os possíveis e potenciais riscos ambientais.

Assim sendo, medidas mitigatórias fazem-se necessárias para que os danos ao meio ambiente sejam reduzidos, minimizando as possíveis alterações ambientais provocadas pela presença de substâncias tóxicas, entre elas pesticidas e nanopartículas.

5. CONCLUSÕES

A elevação das doses de concentração de carbofurano resultou em uma diminuição das taxas metabólicas dos indivíduos estudados representados por diminuição no consumo específico de oxigênio e aumento na excreção de amônia nas concentrações mais elevadas.

Nos testes realizados com nanotubos de carbono houve uma resposta de diminuição no consumo de oxigênio na maior concentração empregada e uma alternância entre aumento e diminuição para a excreção de amônia.

Na combinação entre carbofurano e nanotubos de carbono foi notadamente observado um aumento de toxicidade, levando os indivíduos à redução da taxa metabólica, reforçando as evidências de que nanopartículas, como nanotubos de carbono, podem apresentar comportamento aditivo ou até

mesmo de potenciação, quando combinadas com outras substâncias tóxicas, como o carbofurano.

Os resultados desse estudo revelaram que o lambari apresentou uma tendência dose dependente na diminuição no consumo específico de oxigênio e na excreção de amônia, evidenciado notadamente na combinação entre carbofurano e nanotubos de carbono, corroborando que a exposição à nanopartículas, reduz a eficiência respiratória em peixes.

A escassez de trabalhos científicos, com o objetivo de avaliar o potencial tóxico das nanopartículas, do carbofurano e o dos agroquímicos em geral, é um dos grandes incentivadores para a realização de trabalhos como este, que pelo mesmo motivo adquire relevante importância para nossa sociedade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.M, 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Am. Fish. Soc. Symposium 8: 1-8.

AGUIAR, L.H; MORAES, G; AVILEZ, I. ; ALTRAN, A.E; CORRÊA, C.F. 2004 Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã *Brycon cephalus*, Environ. Res. 95 (2) 224–230.

AREECHON, N; PLUMB, J.A. 1990 Sublethal effects of malathion on Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44. 435–442.

ARIAS, A.R.L; BUSS, D.F; ALBUQUERQUE, C; INÁCIO, A.F, FREIRE, M.M; EGLER, M. *et al*, 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciên Saúde Colet. 12(1):61-72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232007000100011>

ARANA, L. V. 2000 Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura. Florianópolis/SC, Ed. da UFSC, 277 p 166.

BARBIERI, E; SERRALHEIRO, P.C; ROCHA, I. O. 2002 The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the

Mugil platanus (mullet) according to the temperature and salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 277: 109-127.

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.; FERREIRA, L.A.A. 2011 Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 on the freshwater fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pest. And physiology* 99:209-214.

BARBIERI, 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 (Oxford)*. 84:9-16.

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 different temperature levels. *Toxicology and Industrial health* 29: 1 – 8.

BOMBARDELI, R.A.; MEURER, F.; SYPERRICK, A. 2003 Metabolismo proteico em peixes. *Arq. Cienc. Vet.zool. Unipar*, 7(1): 69-79.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. 1989 Fish as "biological model" for experimental studies in ecotoxicology. In: A.Boudou and F. Ribeyre (eds.), *Aquatic Ecotoxicology Fundamental Concepts and Methodologies*. vol. VIII. CRC Press Inc. Florida. 127-150pp.

BULL, D. e HATHAWAY, D. 1986 Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. *Vozes, Petrópolis*, 236.

BAYNE, B.L.; BROWN, D.A.; BURNS, K.; DIXON, D.R.; IVANOVICI, A.; LOWE, D.M, *et al*, 1985 *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. New York: Praeger Scientific; p. 65-89.

BRILHANTE, O.M. and CALDAS, L.Q.A. 1999 Coord. *Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 155 p. ISBN 85-85676-56-6. Available from SciELO Books – capítulo 3.

CARVALHO, P.M.S. 1992 *Bioenergética do camarão sete-barbas*. Dissertação de mestrado. Instituto Oceanográfico-Universidade de São Paulo. 206p.

CHO, W.; CHA, S.; DO, J. *et al*. 1997 A novel 90-kDa stress protein induced in fish cell by fish Rhabdovirus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.233,p.316-319.

CHRISTIANSEN, P.D.; BROZEK, K.; HANSEN, B.W. 1998 Energetic and behavioral responses by the common goby, *Pomatoschistus microps* (Kroyer), exposed to linear alkybenzene sulfonate. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(10): 2051-2057.

CORT, C.C.W.D. e GHISI, N.C. 2014. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax spp.* para avaliação da contaminação aquática: O Mundo da Saúde, São Paulo - 2014;38(1):31-39.

CURRIE, S; MOYES, C.D; TUFTS, B.L. 2000 The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp 70 and hsp 30 mRNA expression im rainbow trout: in vivo and in vitro comparisons . Journal of Fish Biology, v. 56. n. 2. p. 398-408.

DAGNINO, R.S. e JUNIOR, S.C. 2007 Risco Ambiental: Conceitos e Aplicações. Climatologia e Estudos da Paisagem, Rio Claro - Vol.2 - n.2 - julho/dezembro/2007, p. 50.

FAUCONEAU, B. 1985 Protein syntethesis and protein deposition in fish. In: COWEY, C.B; MACKIE,A.M.;BELL.J.G. Nutrition and Feeding in Fish. New York: Academic. Press, P.17-46.

FREITAS, J.C. 1990 Biomedical Importance of Marine Natural Products. Ciência e Cultura, 42 (1): 20-24.

FRY, F.E.J. 1971 The effect of environmental factors on the physiology of fish. In HOARR, W. S. and RANDALL, D. J. eds. Fish Physiology. New York, Academic Press. vol.6: 1-98.

GUIVANT, J.S. 1992 O uso de agrotóxicos e os problemas de sua legitimação. Um estudo de sociologia ambiental no município de Santo Amaro da Imperatriz, SC. Campinas – SP. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) - Departamento de Sociologia, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

HANDY, R.D, KAMMER, F; LEAD, J.R; HASSELLOV, M; OWEN, R; CRANE, M. 2008 The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicol.17:287–314.

HEATH, A.G; CECH, J. J; ZINKL, J.G; FINLAYSON, B; FUJIMURA, R. 1993 Sublethal effects of methyl parathion, carbofuran and molinate on larval striped bass, *Morone saxatilis*, Am. Fish. Soc. Symp. 14, 17.

HERNÁNDEZ-MORENO, D.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; SOLER, F.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. 2011 Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Study of biomarkers and behaviour alterations. *Ecotox. and Environ. Safety* 74: 1905 – 1912.

JASH, N.B.; BHATTACHARAYA, S. 1983 Delayed toxicity of carbofuran in fresh water teleost *Channa punctatus*. *Indian J. Exp. Biol.* 17: 693 – 697.

KLOTH, T.C; WOHLSCIAG, D.E. 1972 Size-related metabolic responses of the pinfish, *Lagodon rhomboides*, to salinity variations and sublethal petrochemical pollution. *Marine Science* 16: 125-137.

LEITE, E.M.T; AMORIM, L.C.A. 2006 Noções Básicas de Toxicologia. Faculdade de Farmácias, Departamento de Análises clínicas e Toxicológicas, UFMG.

LITTLE, E.E.; FINGER, S.E. 1990 Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environm. Toxicol. And Chemistry* 9: 13 – 19.

LEMAIRE, P; STURVE, J; FORLIN L; LIVINGSTONE, D.R. 1996 Studies on aromatic hydrocarbon quinone metabolism and DT-diaphorase function in liver of fish species. *Mar. Environ. Res.* 2 (1-4): 317-321.

LUZ, R.A.S.,MARTINS, M.V.A; MAGALHÃES, J.L; SIQUEIRA JR,J.R; ZUCOLOTO, V; OLIVEIRA JR, O.N; CRESPILO, F.N and SILVA, W.C. 2011 Supramolecular Architectures in Layer-by-Layer Films of Single-Walled Carbon Nanotubes, Chitosan and Cobalt (II) Phthalocyanine, *Materials Chemistry and Physics*, 130 (3), 1072-1077.

MAKI, A.W. 1979 Respiratory activity of fish as a predictor of chronic fish toxicity values for surfactants, Special Technical Publ. 667, ASTM, Philadelphia pp. 77-95.

MARTINEZ, D.S.T; ALVES, O.L; BARBIERI, E. 2013 Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics: Conference Series* 429: 1 – 8.

MARTINEZ, D.S.T; ALVES, O.L. 2013 Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação: *Ciência e Cultura*, vol.65 no.3 São Paulo July 2013.

MOMMSENT, T.P. 1998 Growth na Metabolism In: EVANS, E.H The Phisiology of Fishes – 2º ed. New York: CRC. Press LLC. p.65-100.

MORAES, B.C.R; PFEIFFER, C. W; GUIMARÃES, J. R; BORGES, A.L.N; CAMPOS, A.N. 1999 Efeito de sedimentos contaminados sobre a excreção de nitrogênio do camarão *Penaeus paulensis*. *Braz Arch Biol Technol.* 42(4).

MOREIRA, J.C; GONÇALVES, E.S; BERETA, M. 2013 Contaminantes Emergentes – Desafios e Perspectivas. CBQ N. 51 - <http://www.abq.org.br/rqi/2011/733/RQI-733-pagina8-Contaminantes>

NOGUEIRA, M.M.; COTRIM, M.E.B.; BELTRAME, O. 2002 Pesticide monitoring in Ribeira Valley, southeastern brazilian.

NOGUEIRA, M.M; COTRIM, M.E.B; PIRES, M.A.F. 2007 Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo. *Quim. Nova*, Vol. 30(5): 1171-1178.

RAND, G. M; PETROCEL, I S. R. 1984 Fundamentals of Aquatic Toxicology .335 – 373.

OGA, S. 2003 Ed. - Fundamentos de Toxicologia. 2º edição, São Paulo: Atheneu.

RAZO, L.M.D; QUINTANILLA-VEJA, B; BRAMBILA-COLOMBRES, E *et al.* 2001. Stress Protein Induced by Arsenic. Toxicology and applied Farmacology, v.177 p. 132 – 148.

RENWICK, L.C; BROWN, D; CLOUTER, A; DONALDSON, K. 2004 Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. Occup Environ Med. 61:442–447.

RIVERO, C. 2007 Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 113 p.

SCHRECK, C.B. 1990 Physiological, behavioral and performance indicators of stress. Am. Fish. Soc. Symposium. 8: 29-37.

SMITH, R.L; HARGREVES, B.R. 1984 Oxygen consumption in *Neomysis americana* (Crustacea: Mysidacea), and the effects of naphthalene exposure. Mar. Biol. 79: 109-116.

VARGAS, V. M. F; GUIDOBONO, R.R; HENRIQUES, J.A.P. 1991 Genotoxicity of plant extracts. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86: 67 – 70.

VARGAS, M; CORREA, M; CHUNG, K.S. 1991 Indicadores fisiologicos en la evaluacion de la toxicidad de hidrocarburos aromaticos. Bol Inst Oceanog Venez Univ Oriente: 30(1-2):57-64.

VEYRET, Y.; RICHEMOND, N.O.M. 2007 O riscos. In: VEYRET, Y.(Org.) Os riscos: o homem como agressor e vítima do meio ambiente. São Paulo: Contexto, p. 23-79.

WINKLER, L. 1888 Methods for measurement of dissolved oxygen. Ber Deutsch Chem Ges 21:2843-54.

WU, J.P; CHEN, H.C. 2004 Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere 57: 1591-1598.

CAPÍTULO 2

**A UTILIZAÇÃO DA CAPACIDADE DE NATAÇÃO PARA AVALIAR O
EFEITO DO MERCÚRIO EM *POECILIA VIVIPARA* (POECILÍDEOS) DE
ACORDO COM A SALINIDADE E TEMPERATURA.**

A UTILIZAÇÃO DA CAPACIDADE DE NATAÇÃO PARA AVALIAR O EFEITO DO MERCÚRIO EM *POECILIA VIVIPARA* (POECILÍDEOS) DE ACORDO COM A SALINIDADE E TEMPERATURA.

A. M.Tegon Ferrarini^a, E. Barbieri^b,

^aAlessandra Maria Tegon Ferrarini - Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA – SAA/SP e-mail: aletegon@iq.com.br

^bEdison Barbieri - Instituto de Pesca – APTA - SAA/SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, CEP: 11990-000, Brasil. (13) 97486496. e-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi estudar o efeito do mercúrio em *Poecilia vivipara*, um peixe tradicionalmente utilizado em ensaios ecotoxicológicos e encontrado em grande abundância no Brasil. Foram avaliados sobre a capacidade de natação de *Poecilia vivipara*, os efeitos da exposição em meio aquoso a diferentes concentrações de mercúrio (0,0 µg/l; 10 µg/l; 20 µg/l e 30 µg/l). A capacidade de natação foi estimada por meio de experimentos com doze combinações possíveis de três temperaturas (25°C, 20°C e 15°C) e três salinidades (35, 20 e 5). Os resultados mostram que a capacidade de natação diminui em relação à concentração de mercúrio (Hg) para todas as temperaturas e salinidades empregadas em relação ao controle. Na temperatura de 25° C, na maior concentração testada (30 µg/L), houve diminuição na capacidade de natação de 84,4%, 91,2% e 97,1% nas três salinidades testadas, de 35, 20 e 5. Em geral as médias foram significativamente diferentes em comparação ao controle na maior concentração e em todas as temperaturas. Na menor salinidade empregada houve um aumento correspondente na toxicidade do mercúrio e uma diminuição na capacidade de natação.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*, mercúrio, toxicidade, capacidade de natação, salinidade, temperatura.

ABSTRACT

The objective of this research was to study the effect of mercury in *Poecilia vivipara*, a fish traditionally used in ecotoxicological testing and found in great abundance in Brazil. We evaluated the swimming ability of *Poecilia viviparous*, the effects of exposure in aqueous medium at different concentrations of mercury (0.0 g / l; 10 g / l, 20 mg / l 30 mg / l). The swimming ability was estimated by experiments with twelve possible combinations of three temperatures (25°C, 20°C and 15°C) and three salinities (35, 20:05). The results show that the swimming capacity decreases over the concentration of mercury (Hg) at all temperatures and salinities employed in the control. At the temperature of 25 ° C in the highest concentration tested (30 mg / l), a reduction in the swimming ability of i 84.4%, 91.2% and 97.1% in three tested salinity, 35, 20:05 . in general, the means were significantly different compared to control at the highest concentration and in all temperatures. At low salinity employed was a corresponding increase in mercury toxicity and a decrease in swimming ability.

Keywords: *Poecilia vivipara*, mercury toxicity, swimming ability, salinity, temperature.

1 - INTRODUÇÃO

Os problemas ecológicos e de saúde pública, causados por metais pesados, há muito leva preocupação as agencias ambientais em todo o mundo. No Brasil, os metais pesados ainda não atingiram as mesmas proporções que os caracterizam como agentes poluentes da água como nos países desenvolvidos. No entanto, sempre existe a preocupação pelas autoridades de controle de qualidade ambiental em termos de poluição por metais pesados em determinados locais e também quanto à necessidade de medidas preventivas para evitar problemas futuros. Apesar dessa preocupação, o monitoramento ambiental em águas estuarinas e marinhas no Brasil é quase inexistente (BARBIERI *et al.*, 2011).

No mar, a poluição por metais pesados é introduzida através de efluentes urbanos e industriais despejados diretamente pelas cidades costeiras e indiretamente através dos rios (DOI *et al.*, 2012, MARTINEZ *et al.*, 2013). Vários estudos têm demonstrado que a presença de metais pesados podem causar sérios problemas ecológicos (BLASCO *et al.*, 1998), afetando os organismos aquáticos (GRIPPO e HEATH, 2003), incluindo peixes (YILMAZ *et al.*, 2006), de forma significativa. Peixes desempenham um importante papel ecológico nos ecossistemas em que vivem, e são também uma fonte de proteína de alta qualidade para a alimentação humana. Além disso, eles também são bons indicadores da qualidade da água, e são, portanto, amplamente usado em experiências para avaliar o impacto ambiental sobre o ambiente aquático (APHA, 1985).

Alterações no comportamento natatório, devido a exposição por poluentes sub letais podem afetar a capacidade dos peixes para se alimentar, fugir de predadores ou mesmo reproduzir (LITTLE *et al.*, 1985, BARBIERI 2007a). O comportamento de natação é frequentemente utilizado como um parâmetro para avaliar a toxicidade em peixes (LITTLE e FINGER, 1990; CHRISTIANSEN *et al.*, 1998;. BARBIERI 2007a, b). A capacidade de natação é

um parâmetro, utilizado para avaliar alterações no comportamento dos peixes, devido aos efeitos de poluentes (YILMAZ *et al.*, 2006). A capacidade de natação é um parâmetro que está relacionado com a resistência do peixe em manter-se nadando frente a um fluxo de água (WICKS *et al.*, 2002) ou a sua capacidade física para continuar a nadar contra o fluxo (HOWARD, 1975). Capacidade de natação também inclui variáveis como a frequência e duração dos movimentos (CLEVELAND *et al.*, 1986), a velocidade e a distância percorrida durante o movimento (MILLER, 1980), frequência e ângulo de natação em um fluxo (RAND, 1984), a posição na coluna de água e o tipo de comportamento de natação (BARBIERI *et al.*, 1998; BARBIERI, 2007b).

A capacidade de natação foi usada com sucesso, por exemplo, para estudar os efeitos de organofosforados (PETERSON, 1974), DDT (BESCH *et al.*, 1977), herbicidas (LITTLE *et al.*, 1989), dioxinas (MEHRLE *et al.*, 1988), alumínio (CLEVELAND *et al.*, 1986), cobre (WALWOOD e BEAMISH, 1978), detergentes (HOFER *et al.*, 1995; BARBIERI *et al.*, 1998;. 2007a) e amônia (WICKS *et al.*, 2002). O uso do tempo da capacidade de natação é um dos protocolos tradicionais para estudar os efeitos das mudanças ambientais sobre a capacidade de natação dos peixes (RAND, 1984; BARBIERI, 2007b).

O entendimento dos possíveis efeitos dos poluentes sobre a capacidade natatória de organismos aquáticos é muito útil para a gestão da qualidade ambiental. Esses efeitos são dificilmente detectáveis pela análise superficial; no entanto, eles podem influenciar drasticamente a sobrevivência e o sucesso de espécies e comunidades. A exposição a doses sub letais, mesmo que por um período relativamente curto de tempo, pode afetar a habilidade do peixe para se alimentar, fugir de predadores e se reproduzir, etc. (LITTLE *et al.*, 1985;. GRIPPO e HEALTH, 2003). Além de ajudar a compreender as relações causais entre os poluentes e processos fisiológicos, a capacidade natatória pode indicar deterioração ambiental imediata, de tal forma que poderá permitir mensurar e adequar medidas apropriadas para serem postas em prática para responder à degradação ambiental (BARBIERI *et al.*, 1998). No nível individual, os efeitos tóxicos sub letais se manifestam de várias maneiras, mas,

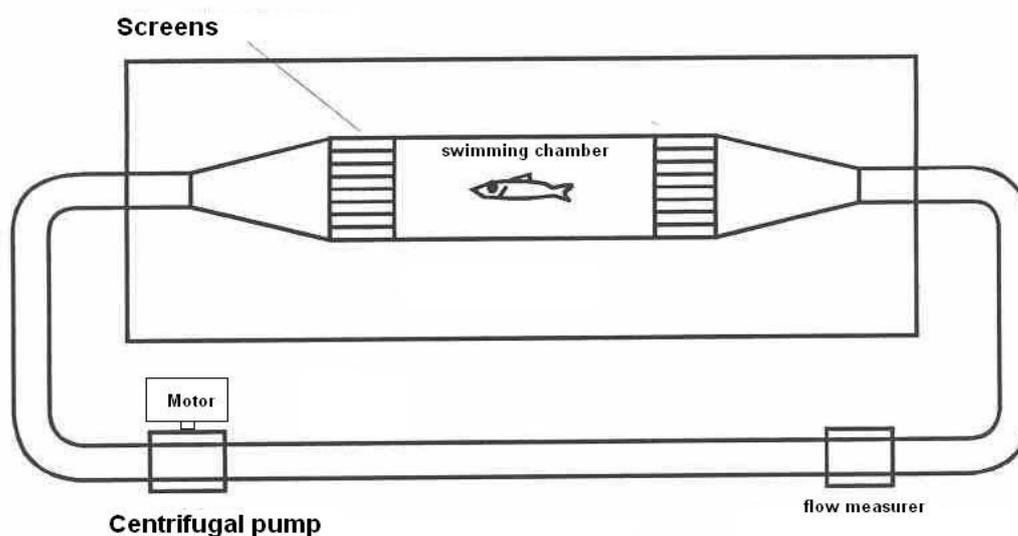
os indicadores mais sensíveis ao estresse da poluição são as alterações comportamentais.

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito na capacidade de natação em *Poecilia vivipara* expostos ao mercúrio em três salinidades (35, 20 e 5) e em três temperaturas (25°C, 20°C e 15°C). A hipótese desse trabalho é que o Hg influenciará adversamente na capacidade de natação e as variáveis ambientais influenciarão no efeito do poluente sobre o peixe.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Cento e oitenta (N=180) indivíduos de *Poecilia vivipara*, com um peso médio de 1,67 ($\pm 0,5$) gramas e comprimento de 2,1 ($\pm 0,5$) centímetros, foram utilizados para a medição da "atividade de natação", utilizando o túnel de natação (**Figura 7**).

Figura 7- Câmara de natação construído e usado no laboratório do Instituto de Pesca – APTA-SAA - Cananéia/SP, com base em Brett (1964).



(Barbieri,2000)

Os peixes foram aclimatados em cada uma das nove combinações possíveis entre três temperaturas (25°C; 20°C e 15°C) e três salinidades (35, 20 e 5) durante 5 dias. Cinco peixes para cada combinação foram submetidos à medição do "tempo de natação até ao seu cansaço", em cada uma das quatro concentrações medidas em microgramas por litro (0,0 µg/l = grupo controle, 10 µg /L, 20 µg /L, e 30 µg /L) de mercúrio (Hg).

A concentração de oxigênio dissolvido na água é um fator que afeta o consumo de oxigênio e a capacidade natatória de peixes; deve, portanto, ser estimado antes de estudar os efeitos de metais pesados. Assim, os experimentos foram realizados para verificar os efeitos do mercúrio na solução de oxigênio dissolvido na água. A concentração da solução de teste (Tabela 1) ilustra as diferentes medidas nas concentrações de mercúrio, pH e oxigênio.

Tabela 1 - pH e concentração de oxigênio dissolvido na solução teste em cada concentração de mercúrio.

Concentração de mercúrio (µg/L)	Salinidade 35		Salinidade 20		Salinidade 5	
	pH	[O ₂]	pH	[O ₂]	pH	[O ₂]
0	8.26	7.22	8.10	7.20	7.12	7.28
10	8.24	7.20	8.09	7.26	7.11	7.22
20	8.20	7.26	8.05	7.28	7.09	7.27
30	8.21	7.28	8.01	7.27	7.08	7.21

Método para estudar o efeito de mercúrio sobre o tempo de natação até o cansaço.

Para quantificar o efeito da exposição aguda ao mercúrio na capacidade de natação um túnel de natação foi construído no nosso laboratório, com base nas descrições de BRETT (1964) e modificado para peixes de pequeno porte.

O túnel de natação consiste de uma câmara de respiração colocado dentro de uma caixa, contendo água, para ajudar a manter uma temperatura

estável. Uma bomba com um "Variac", com rotação controlável foi utilizado para criar uma corrente de água no interior da câmara a uma velocidade desejada e controlada, forçando o animal a nadar contra o fluxo com a mesma velocidade que o da corrente gerada. A velocidade da corrente foi medida por um "Venturi" tipo "fluxo metros". Para guiar o fluxo, laminadores de fluxo foram instalados nas duas extremidades da câmara de natação. O volume total do túnel natação foi de 1,2 litros (**Figura 7**).

Antes de iniciar as experiências, apenas um peixe por vez foi mantido no túnel de natação com circulação contínua da água por pelo menos 90 minutos, em água sem o poluente, a uma velocidade de fluxo de água de 2,84 cm/s, para atenuar o estresse. Após 90 minutos, no caso das experiências com mercúrio, a quantidade de solução de reagente foi adicionada para se obter a concentração específica desejada. A velocidade foi então aumentada lentamente (1cm/s) até atingir 8 cm/s ($\pm 0,21$), de modo que o peixe foi forçado a nadar nessa velocidade até ao seu esgotamento. Para se obter a concentração correta de mercúrio, o volume necessário de produto químico (1,0 mg de mercúrio/ml) foi adicionado ao volume do túnel de natação no final do período de adaptação. Assim como Hg foi adicionado, o orifício de entrada foi imediatamente selado.

Imediatamente após cada ensaio, o comprimento total e o peso úmido dos animais testados foram medidos. Nenhum peixe foi usado mais que uma vez. O processamento e gráficos dos dados foram realizados com o auxílio de planilha eletrônica, especialmente adaptado para este estudo. As médias da capacidade de natação foram testadas com o teste estatístico Shapiro-wilks em relação a normalidade. Como a distribuição foi normal utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com comparações entre as médias com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 - RESULTADOS

3.1. - Resultados em relação à Salinidade

3.1.a - Salinidade 5

Observou-se que para o *Poecilia vivipara* aclimatado a salinidade 5, houve diminuição na capacidade de natação, nas diferentes concentrações de mercúrio, para as três temperaturas propostas: 25°C; 20°C e 15°C (tabela 2). O tempo de natação até o cansaço para qualquer concentração de mercúrio utilizada diminuiu notadamente com a temperatura, na velocidade de natação de 8 cm/s.

Também pôde ser verificado que no grupo de controle (0,0µg/L), o “tempo de natação até o cansaço” após adaptação do peixe a uma salinidade de 5 (**tabela 2**), para as temperaturas de 25°C; 20°C e 15°C, foi respectivamente de 110 min, 106 min e 114 minutos. Comparando os resultados do grupo controle com os resultados obtidos na maior concentração de mercúrio empregada nos testes (30µg/L), o “tempo de natação até o cansaço” diminuiu para 3,2 min; 5,6 min e 4,4 minutos, respectivamente para as temperaturas de 25°C, 20°C e 15°C. Isto representa uma diminuição no “tempo de natação até o cansaço” em relação ao controle de 97,1%; 94,7% e 96,1%.

Tabela 2 - Tempo de natação até o cansaço para *Poecilia vivipara* na velocidade de natação de 8,0 cm/s, submetido a diferentes concentrações de mercúrio (µg/L) em diferentes temperaturas (°C), na salinidade de 5. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem da diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (5 peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Concentração de mercúrio (µg/l)	Temperatura 25°C		Temperatura 20°C		Temperatura 15°C	
	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%
0	110 (±5.24)	100	106 (±4.84)	100	114 (±4.30)	100
10	39 (±1.87)	35.45*	59 (±6.78)	55.66*	67 (±5.38)	58.77*
20	14 (±2.91)	12.72*	20 (±3.53)	18.86*	30 (±3.53)	26.31*
30	3,2 (±0.66)	2.9*	5,6 (±1.50)	5.28*	4,4 (±1.02)	3.85*

Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Tukey) nos resultados obtidos para as concentrações de 10 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$ e 30 $\mu\text{g/L}$ nas temperaturas de 25°C, 20°C e 15°C, quando comparadas com o controle (0,0 $\mu\text{g/L}$) na salinidade 5.

3.1.b - Salinidade 20

Para a salinidade 20, foi observada a mesma tendência dose resposta semelhante a salinidade 5, ou seja, a capacidade de natação diminuiu com o aumento da concentração de mercúrio. Para todas as concentrações de mercúrio, o "tempo de natação até o cansaço" diminuiu com o aumento da temperatura. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do "tempo de natação até o cansaço" obtidos, em relação ao grupo controle nas temperaturas de 25 e 15°C, nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/L}$.

Verificou-se que para o controle (0,0 $\mu\text{g/L}$), o "tempo de natação até o cansaço" dos peixes aclimatados para salinidade 20 (**tabela 3**) nas três temperaturas 25°C; 20°C e 15°C, foi, respectivamente, 109 min, 110 min e 113 minutos. Comparando estes resultados com a concentração de 30 $\mu\text{g/L}$ utilizada no ensaio, o "tempo de natação até o cansaço" médio diminuiu para 8,8 min, 19 min e 18 minutos. Para as três temperaturas estudadas, o "tempo de natação até o cansaço" diminuiu em 91,9%; 83,5 % e 84,08 % em relação ao controle (**tabela 3**).

Tabela 3 - Tempo de natação até o cansaço para *Poecilia vivipara* na velocidade de natação de 8,0 cm/s, submetido a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes temperaturas (°C), na salinidade de 20. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem da diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (5 peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Concentração de mercúrio µg/l	Temperatura 25°C		Temperatura 20°C		Temperatura 15°C	
	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%
0	109 (±4.58)	100	110 (±4.0)	100	113 (±5.14)	100
10	40 (±3.53)	36.69*	78 (±3.74)	71	88 (±2.54)	77.87
20	25 (±3.53)	22.93*	47 (±5.38)	42.7*	62 (±4.63)	54.86*
30	8.8 (±1.77)	8.07*	19 (±4.06)	17.27*	18 (±4.63)	15.92*

Nos resultados obtidos para a salinidade de 20 a média do “tempo de natação até o cansaço” foram estatisticamente diferentes (Tukey $p < 0,05$) para as concentrações de 20µg/L e 30µg/L, em comparação ao controle para as três temperaturas e a concentração de mercúrio 10µg/l não apresentou diferença estatística para as temperaturas de 20°C e 15°C.

Nas três concentrações testadas houve diferença estatística entre as médias do tempo de natação até o cansaço na maior temperaturas de 25°C.

Comparando as médias do “tempo de natação até o cansaço” em temperaturas diferentes, dos animais expostos a uma concentração de mercúrio, verificou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa apenas para a concentração 30 µg/L nas temperaturas de 25°C e 15°C. Para a concentração de 10 µg/L não houve diferenças estatisticamente significativas entre o “tempo de natação até o cansaço”, obtidas nas temperaturas 20°C e 15°C.

3.1. - Salinidade 35

Para a salinidade de 35, a mesma tendência foi observada para as salinidades anteriormente testadas (20 e 5); o “tempo de natação até o cansaço” diminuiu com o aumento da concentração de mercúrio.

O “tempo de natação até o cansaço” para o grupo controle adaptados a salinidade 35, expostos as temperaturas de 25°C, 20°C e 15°C foram

respectivamente, 103 min, 98 min e 109 minutos, enquanto que para os peixes submetidos à concentração de 30 µg/L de mercúrio o “tempo de natação até o cansaço”, foram, em média, 16 min, 24 min e 27 minutos; representando um decréscimo no “tempo de natação até o cansaço” de 75,2%, 84,08% e 96,1% em relação ao controle (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Tempo de natação até o cansaço para *Poecilia vivipara* na velocidade de natação de 8,0 cm/s, submetido a diferentes concentrações de mercúrio (µg/L) em diferentes temperaturas (°C), na salinidade de 35. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem da diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (5 peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Concentração de mercúrio (µg/l)	Temperatura 25°C		Temperatura 20°C		Temperatura 15°C	
	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%
0	103 (±4,63)	100	98 (±2,54)	100	109 (±5,78)	100
10	57 (±6,63)	55.33*	94 (±8,57)	95.91	96 (±7,81)	88.07
20	34 (±2,91)	33.00*	71 (±7,14)	72.44*	78 (±7)	71.55*
30	16 (±1,87)	15.53*	24 (±5,09)	24.48*	27 (±4,63)	24.77*

Comparando-se as médias do “tempo de natação até o cansaço” nas temperaturas empregadas, verificou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa (Tukey $p < 0,05$), em relação ao controle na concentração de 20 µg/L e 30 µg/L de mercúrio, para as três temperaturas estudadas. Nas temperaturas de 20°C e 15°C, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de peixes expostos somente para a concentração de 10 µg/L.

3.2 – Resultados em relação à Temperatura

3.2.a – Temperatura a 25°C

Para a temperatura de 25°C, não houve diferenças estatisticamente significativas (Tukey $p < 0,05$) entre as médias para todas as concentrações de mercúrio empregadas. Para a temperatura de 20°C, não houve diferença estatística significativa entre a maior concentração empregada, de 30 µg/L, em relação ao controle. Por outro lado, para 15°C, o "tempo de natação até o cansaço" as médias obtidas são significativamente diferentes para a concentração de 30 µg/L de mercúrio quando comparado com o "tempo de natação até o cansaço" nas médias dos animais do grupo controle e aqueles expostos de mercúrio a uma concentração de 10 µg/L.

Para *Poecilia vivipara* adaptada a 25°C, o "tempo de natação até o cansaço" em qualquer concentração de mercúrio diminuiu com o aumento da salinidade.

Foi verificado que o "tempo de natação até o cansaço" dos peixes do grupo controle aclimatados a 25°C de temperatura (**tabela 5**), submetido a salinidades de 35, 20 e 5, foi de, respectivamente, 103 min, 109 min e 110 minutos. Para os peixes submetidos à concentração de 30 µg/L de mercúrio, o "tempo de natação até o cansaço" foi de 16 min, 8,8 min e 3,2 minutos, respectivamente, para as salinidades testadas. Estes valores representam uma diminuição no "tempo de natação até o cansaço" de 84,4%, 91,2% e 97,1% em relação ao controle.

Para a maior concentração de mercúrio empregada (30 µg/L) a 25°C, o grupo submetido à salinidade 35% apresentou uma redução de 84,4% no "tempo de natação até o cansaço", enquanto que para os grupos de peixes expostos a salinidades de 20% e 5%, o "tempo de natação até o cansaço" diminuiu em 91,2% e 97,1% respectivamente quando comparado com o controle (**tabela 5**).

Tabela 5 – Tempo de natação até o cansaço de *Poecilia vivipara* (velocidade de natação de 8,0 cm/s), aclimatados a 25°C, submetidos a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes salinidades. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem de tempo de natação até o cansaço diminuindo em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Concentração de mercúrio ($\mu\text{g/l}$)	Salinidade 35		Salinidade 20		Salinidade 5	
	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%
0	103 (± 4.63)	100	109 (± 4.58)	100	110 (± 5.24)	100
10	57 (± 6.63)	55.33*	40 (± 3.53)	36.69*	39 (± 1.87)	35,45*
20	34 (± 2.91)	33.00*	25 (± 3.53)	22.93*	14 (± 2.91)	12,72*
30	16 (± 1.87)	15.53*	8,8 (± 1.77)	8.07*	3,2 (± 0.66)	2,9*

Utilizando o teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$), verificou-se que as médias do "tempo de natação até o cansaço" para a concentração de mercúrio de 30 $\mu\text{g/L}$ em todas as salinidades empregados foram significativamente diferente em relação ao controle (0,0 $\mu\text{g/L}$).

3.2.b – Temperatura a 20°C

Houve diminuição no "tempo de natação até o cansaço" de *Poecilia vivipara* adaptada para a temperatura de 20°C, combinado com a concentração de mercúrio e a salinidade. O "tempo de natação até o cansaço" diminuiu com o emprego de mercúrio em todas as salinidades empregadas.

No controle, a média do "tempo de natação até o cansaço" dos peixes aclimatados para a temperatura de 20°C, submetidos às salinidades de 35, 20 e 5, foram respectivamente de, 98 min, 110 min e 106 minutos (**tabela 6**). Para as mesmas salinidades na maior concentração de mercúrio (30 µg/L) empregada, o "tempo de natação até o cansaço" foi, respectivamente de 24 min (35), 19 min(20) e 5,6 minutos(5). A média do "tempo de natação até o cansaço" diminuiu em todas as concentrações, o que representa uma perda da capacidade de natação de 75,5%, 83,4% e 94,7% em relação ao controle. Na maior concentração empregada, de 30 µg/L, o "tempo de natação até o cansaço" diminuiu significativamente. (**tabela 6**).

Tabela 6 – Tempo de natação até o cansaço de *Poecilia vivipara* (velocidade de natação de 8,0 cm/s), aclimatados a 20°C, submetidos a diferentes concentrações de mercúrio (µg/L) em diferentes salinidades. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem de tempo de natação até o cansaço diminuindo em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Concentração de mercúrio (µg/l)	Salinidade 35		Salinidade 20		Salinidade 5	
	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%
0	98(±2.54)	100	110 (±4.0)	100	106 (±4.84)	100
10	94 (±8.57)	95.91	78 (±3.74)	71	59 (±6.78)	55.66*
20	71 (±7.14)	72.44	47 (±5.38)	42.7*	20 (±3.53)	18.86*
30	24 (±5.09)	24.48*	19 (±4.06)	17.27*	5.6 (±1.50)	5.28*

Utilizando o teste estatístico de Tukey (p <0,05), verificou-se que as médias do "tempo de natação até o cansaço" para a concentração de mercúrio de 30 µg/L em todas as salinidades empregadas, são significativamente diferentes em relação ao controle. Na concentração de 20 µg/L houve diferença estatística nas salinidades 20 e 5. Quanto às concentrações de 10 µg/L, houve diferença estatisticamente significativa somente para a salinidade 5.

3.2.c – Temperatura a 15°C

Para o grupo de peixes adaptados a temperatura de 15°C, os resultados se apresentaram da mesma forma como foi observado para as temperaturas anteriormente testadas: 25°C e 20°C; ou seja, o “tempo de natação até o cansaço” diminuiu com o aumento da concentração de mercúrio.

Verificou-se que o grupo de controle de peixes adaptados a temperatura de 15°C (**Tabela 7**) e submetidos a salinidades de 35, 20 e 5, o “tempo de natação até o cansaço” foi, em média de 109 min, 113 min e 114 minutos. Comparando estes resultados com as médias do “tempo de natação até o cansaço” na maior concentração de mercúrio utilizada no ensaio, verificou-se que a média do “tempo de natação até o cansaço” diminuiu para 27 min, 18 min e 4,4 minutos, para as salinidades de 35, 20 e 5, respectivamente.

Analisando a capacidade natatória dos peixes expostos a diferentes concentrações de Hg a 15°C para diferentes salinidades: a salinidade de 35, houve uma diminuição do “tempo de natação até o cansaço” de 75,2% quando comparado com o controle. Para salinidade 5, o decréscimo no “tempo de natação até o cansaço” foi de 96,1% em relação ao controle. Para salinidade 20, a diminuição do “tempo de natação até o cansaço” foi de 84% quando comparado com o controle para a maior concentração empregada. (**tabela 7**).

Tabela 7 – Tempo de natação até o cansaço de *Poecilia vivipara* (velocidade de natação de 8,0 cm/s), aclimatados a 15°C, submetidos a diferentes concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) em diferentes salinidades. Entre parênteses, o desvio padrão; % Percentagem de tempo de natação até o cansaço diminuindo em relação ao controle. Cada valor representa a média de cinco determinações (peixes). * representa diferença estatística em relação ao controle.

Concentração de mercúrio (µg/l)	Salinidade 35		Salinidade 20		Salinidade 5	
	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%	Tempo em minutos	%
0	109 (±5.78)	100	113 (±5.14)	100	114 (±4.30)	100
10	96 (±7.81)	88.07	88 (±2.54)	77.87	67 (±5.38)	58.77*
20	78 (±7.0)	71.55	62 (±4.63)	54.86*	30 (±3.53)	26.31*
30	27 (±4.63)	24.77*	18 (±4.63)	15.92*	4.4 (±1.02)	3.85*

Usando a ($p < 0,05$) o teste estatístico de Tukey, verificou-se que a média do “tempo de natação até o cansaço” na concentração de 30 µg/L de mercúrio, em todas as salinidades estudadas, é significativamente diferente em relação ao controle. Para as outras concentrações (10 µg/L e 20 µg/L), não houve diferença estatisticamente significativa somente na salinidade 35.

4. DISCUSSÃO

MOUNT (1962) estudando dieldrin constatou que este xenobiótico não causou nenhum efeito aparente sobre a capacidade de natação do peixe *Pimephales notatus* ao nadarem contra uma corrente com velocidade constante. MAYER e KRAMER (1973) relataram que o desempenho da atividade de natação não diferiram significativamente entre as truta arco-íris expostas a diferentes concentrações de dieldrin (0,04 - 0,2 mg/L), mas foi notadamente significativa entre os peixes expostos a concentrações intermediárias (0,08 - 0,12 mg/L). GRIPPO e HEATH (2003) estudaram os efeitos do mercúrio (1,69; 6,79 e 13,57 g/L de HgCl₂, a exposição de 10 dias) sobre o comportamento alimentar de alevinos de *Pimephales promelas*; as comparações com peixes controle e peixes dos dois maiores grupos de

exposição, revelou déficits de desempenho consistentes em eficiência de forrageamento e velocidade de captura.

Deficits no desempenho de velocidade para captura de presas e no forrageamento, podem estar diretamente relacionados a diminuição na capacidade de natação. No presente trabalho houve uma diminuição na capacidade de natação em todas as concentrações de mercúrio empregadas, ficando mais evidenciado em altas temperaturas e baixas salinidades quando comparadas ao grupo controle.

RAND (1984) classificou uma série de características de comportamento dos peixes que são utilizados como indicadores de toxicidade. Entre eles, a atividade de natação é considerada um bom indicador para os efeitos da poluição, mesmo quando as substâncias são encontradas em níveis sub letais podem alterar a capacidade de natação. O "tempo de natação até o cansaço" é um comportamento apropriado para o estudo dos efeitos agudos de toxinas no meio ambiente, pois estes parâmetros fornecem respostas rápidas e facilmente mensuráveis para diferentes espécies de peixes nadadores (GRIPPO e HEATH, 2003, BARBIERI, 2007). Estudos comparando a atividade de natação, capacidade de natação, alimentação, fuga de predadores e duração da atividade de natação da truta arco-íris demonstraram que as atividades foram reduzidas a níveis sub letais de exposição a produtos químicos (LITTLE *et al.*, 1989).

Toxinas geralmente afetam a atividade de natação antes da morte do organismo. LITTLE *et al.* (1985). Em estudos com truta, verificou-se que o desempenho da natação, alimentação e comportamento de fuga de predadores foi reduzida pela exposição sub letal para Palation e Malation. Também em truta, a atividade de natação foi significativamente reduzida após 96 horas de exposição a uma concentração de 5,0 mg L⁻¹ do herbicida DEF (LITTLE *et al.*, 1989). No caso de *Poecillia vivipara*, com o aumento da concentração de mercúrio, o "tempo de natação até o cansaço" foi reduzido. Os animais apresentaram uma redução significativa na sua capacidade de nadar depois de terem sido submetidos a uma concentração de 30 µg/L de mercúrio. Verificou-

se uma redução acentuada do desempenho de natação em uma concentração de 30 µg/L, e verificou-se também que os peixes cansavam após nadarem por apenas 16 minutos a temperatura de 25°C e salinidade 35.

O presente estudo mostrou que, da mais baixa (10 µg/L) para a maior (30 µg/L) concentração utilizada nos experimentos que duraram menos de duas horas, o “tempo de natação até o cansaço” apresentou alterações. Na concentração de 30 µg/L, a diminuição da capacidade de natação foi de 97,1% em relação ao controle para a salinidade 5 e temperatura de 15°C. Esta verificação é muito preocupante, tendo em vista, que maiores concentrações de mercúrio foram encontrados em estudos realizados ao longo da costa brasileira (SIQUEIRA *et al.*, 2005). Para *Cyprinus carpio* expostos a SDS (dodecilsulfato de sódio) na concentração mais elevada utilizada (10 mg/L), a capacidade de natação foi reduzida em 5 vezes em relação ao controle (Barbieri *et al.*, 1998). BESCH *et al.* (1977) demonstraram que a capacidade de natação para carpas, fornece uma indicação rápida de toxicidade. Em seus experimentos com DDT na concentração de 0,5 µg/L, foi possível detectar alterações significativas dentro de um período de duas horas, enquanto que para CL50 que ocorreu após 48 horas, em uma concentração de 1,5 µg/L. Em truta o desempenho da natação foi alterada por Malation e Fenitrotiom numa concentração inferior a 33% do que a encontrada para a CL50 (PETERSON, 1974). Um efeito similar também foi encontrado para o salmão após a exposição ao cobre com concentrações de até 12% do que o estimado para CL50 (WALWOOD e BEAMISH, 1978). Assim modificações mensuráveis na natação podem ser detectadas bem antes de ocorrer mortalidade. Estudos com LAS indicaram a redução da capacidade de natação em truta arco-íris expostos a 0,2 µg/L (HOFER *et al.*, 1995), e em *Mugil platanus* a capacidade natatória foi reduzida em peixes expostos a concentrações entre 0,6 mg/L e 4,7 mg/L (BARBIERI *et al.*, 2007a). Para *Mugil platanus* a capacidade de natação diminuiu significativamente após 24 horas de exposição a 1,0 mg/L de LAS-C12 (BARBIERI, 2007b).

Alterações na capacidade de natação são refletidas em várias atividades do organismo, como a migração, a predação ou o sucesso na fuga de

predadores, com graves consequências ecológicas (REIDY *et al.*, 1995, CAMPOS *et al* 2015). Além disso, a diminuição do “tempo de natação até o cansaço” dificulta as chances de encontrar a presa, devido à redução da área explorada pelo peixe (LAURENCE, 1972). Isto pode afetar a eficiência de alimentação que conduz a uma diminuição concomitante na quantidade de energia disponível para o crescimento do animal (LITTLE e FINGER, 1990).

A fisiologia da natação de um peixe é afetada pela maturidade e condições orgânicas, o grau de exposição a outros fatores de estresse, adaptação, o tempo de teste e parâmetros físico-químicos, tais como temperatura, salinidade, qualidade da água, a luz, o tamanho ou a forma do aquário (OLLA *et al.*, 1974, BARBIERI e FERREIRA, 2011). Portanto, os testes que envolvem respostas de comportamentais requerem um controle rígido e padronizado da metodologia, com uma uniformização rigorosa dos procedimentos experimentais, bem como do tratamento dos organismos submetidos a testes. SARIKAYA e YLMAZ (2003) estudaram o efeito do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), sobre o comportamento da carpa comum (*Cyprinus carpio*), eles observaram que o comportamento de natação anormal aumentado e os peixes batiam nas paredes do aquário. Padrões de natação ascendentes e descendentes verticais foram observados assim como e os saltos dentro do aquário aumentaram.

Se analisarmos os resultados obtidos neste estudo sobre *Poecilia vivipara* dentro de uma perspectiva ecológica, talvez a primeira resposta do peixe possa ser uma tentativa de escapar e, no caso de um ambiente totalmente poluído teríamos, talvez, encontrado uma resposta semelhante à que ocorreu no túnel de natação onde foram realizados os experimentos.

O estudo da capacidade de natação realizada em diferentes espécies de peixes fornece contribuições para a compreensão do papel ecológico das espécies em seu ambiente uma vez que avalia a capacidade de escapar de um predador (KASAPI *et al.*, 1992), os efeitos da atividade de natação e crescimento (HAMMER and SCHWAZL, 1996), composição corporal e conteúdo calórico (REIDY *et al*, 1995), a relação entre natação e consumo de

oxigênio (BRETT 1965; BARBIERI *et al.*, 1998;. 2007a, b), a relação entre a forma da cauda e a velocidade de natação desenvolvido pelo peixe (KARPOSIAN *et al.*, 1990), e a capacidade e velocidade de natação como um fator principal para a ocupação dos vários ambientes dentro da mesma área (PEAKE *et al.* , 1997; BARIERI, 2005).

Capacidade de natação é um parâmetro válido e um índice consistente da toxicidade sub letal que pode ser facilmente incorporado nos protocolos de ensaio para aumentar a sensibilidade do padrão do teste de toxicidade (WICKS *et al.*, 2002, BARBIERI, 2007a). O “tempo de natação até ao cansaço” pode ser estritamente observado em laboratório com equipamento simples que podem ser facilmente adaptados para utilização em ensaios de toxicidade no campo. A redução do “tempo de natação até o cansaço” pode ser o resultado de alterações na distribuição de energia que o peixe utiliza para a manutenção da sua homeostase (BRETT, 1964), assim, o peixe deixa de gastar energia em natação e redireciona seu gasto energético para a manutenção do funcionamento dos órgãos vitais para a sua sobrevivência.

Muitas pesquisas têm demonstrado que a variação da salinidade tem um pequeno efeito sobre a respiração dos peixes de água salgada (SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

O efeito do mercúrio sobre a capacidade natatória de *Poecilia vivipara* foi pronunciado para os grupos de peixes adaptados a salinidade da 5. Pesquisas sobre o efeito da toxidade do mercúrio sobre o caranguejo *Eriocheir sinensis* mostrou que houve um aumento do efeito tóxico em baixas salinidades para esta espécie (PEQUEUX *et al.*, 1996). Os autores mencionam que o mercúrio interage com um mecanismo osmorregulador, impedindo a capacidade de osmoregulação dos animais, aumentando assim a toxicidade do metal para baixas salinidades. Para gastrópodes *Thiara tuberculata* expostos a metais pesados (mercúrio e cobre), com o aumento da salinidade, houve uma diminuição da toxicidade, refletida em uma diminuição do consumo de oxigênio (MULE e LOMTE, 1994). HALL e ANDERSON (1994) analisaram a influência tóxica da salinidade sobre os diversos tipos de substâncias

químicas, encontrando que a toxicidade foi reduzida com o aumento da salinidade. Pesquisa em CL50, realizado em *Cyprinodon variegatus*, evidenciou que, com 96 horas de exposição ao cádmio (Cd^{+2}) na Baía de Chesapeake (maior estuário nos EUA), em três salinidades diferentes (15, 20 e 25), observou-se que na maior salinidade (25), ocorreu a menor a toxicidade do cádmio sobre o peixe (HALL *et al.*, 1995).

BATTY *et al.* (1993), para estudar o efeito da temperatura sobre a resposta de fuga das larvas de peixes *Clupea harengus*, descobriu uma relação linear entre o aumento da temperatura e a diminuição na velocidade, e também na capacidade de natação destas larvas. Focando autoecologia, a temperatura afeta os processos bioquímicos e fisiológicos que envolvem todos os sistemas corporais do peixe como a digestão e a locomoção. As mudanças de temperatura, também influenciam o consumo de alimentos e a velocidade de fuga de predadores, e, neste caso, afetará o equilíbrio entre a sobrevivência da presa e do sucesso de captura do predador (BATTY *et al.*, 1993), resultando mudança no mecanismo de distribuição geográfica das espécies (FILONOV, 2000).

A interação da temperatura com do efeito tóxico do mercúrio em *Poecilia vivipara*, provocou um aumento da toxicidade desta substância que pode, em geral, ser melhor explicado pela diminuição do “tempo de natação até o cansaço” (WICKS *et al.*, 2002). O aumento da temperatura também pode aumentar a biodisponibilidade de certas substâncias químicas, assim como aumenta a solubilidade dos sais de metais (BOUDOU e RIBEIRE, 1989). Os aumentos da temperatura também aumentam a solubilidade de compostos aromáticos, aumentando, assim, a toxicidade destes compostos para os organismos aquáticos (HEMPTINNE *et al.*, 1998).

RAO e KHAN (2000) estudaram o efeito da interação entre as três temperaturas (15°C, 20°C e 25°C) na toxicidade do cobre no molusco *Dreissena polymorpha*. Estes autores mostraram que as altas temperaturas podem aumentar a toxicidade do cobre e, possivelmente, também a de outros metais. Para o gastrópode *Physa acuta*, com um aumento da temperatura, a

toxicidade de cádmio foi evidente na redução do crescimento embrionário (CHEUNG e LAM, 1998) e para o peixe *Hyphessobrycon callistus* com o aumento da concentração de Cd houve um aumento do metabolismo (DAMATO e BARBIERI 2012).

Efeitos de mercúrio em *Poecilia vivipara* são minimizados quando submetidos a baixas temperaturas e em concentrações inferiores a 10 µg/L. No entanto, a 25°C e com a maior concentração de mercúrio (30 µg/L), os efeitos sobre o “tempo de natação até o cansaço” tornou-se mais evidente. A temperatura é um fator ambiental que pode de acordo com a classificação de FRY (1971), afetar organismos de forma letal, controlada ou disfarçada, dependendo do tempo e / ou intensidade do estímulo, a extensão espacial dele influencia a capacidade do organismo para se adaptar às variações térmicas. Em geral, o efeito de mercúrio aumenta proporcionalmente com o aumento da temperatura (SWEDMARK *et al.*, 1971). Isto pode, em geral, ser explicado pelo aumento no metabolismo do organismo, em consequência do aumento da temperatura (BARBIERI e PAES 2011).

No presente estudo, com a diminuição da salinidade ocorreu um aumento do efeito tóxico do mercúrio, ocasionando uma diminuição na capacidade de natação.

5 . CONCLUSÃO

A variação da capacidade de natação de *Poecilia vivipara* expostos a concentrações de mercúrio em três temperaturas apresentou uma diminuição. Quando a temperatura foi aumentada, houve também um aumento do efeito tóxico do mercúrio, refletindo na capacidade de natação.

Nos experimentos realizados com uma salinidade de 5, houve uma diminuição do “tempo de natação até o cansaço”. Em geral, as médias foram

significativamente diferentes no que diz respeito ao controle, em todas as concentrações empregadas, em todas as temperaturas. Quando salinidade diminuiu, houve um aumento correspondente no efeito tóxico do mercúrio.

Atividade de natação é um parâmetro válido e um índice consistente do efeito tóxico sub letal que pode ser facilmente incorporado nos protocolos de ensaio para colaborar com testes de toxicidade padrão. O “tempo de natação até o cansaço” pode ser monitorado com precisão no laboratório com equipamento simples que podem ser facilmente adaptados para utilização em ensaios de efeito tóxico de xenobióticos no campo.

6 . REFERENCIAS IBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.M. 1990 Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *Am. Fish. Soc. Symposium* **8**,1-8.

APHA: 1985. Standard methods of the examination of water and wastes. 16th ed., New York. American Public Health Association.

BARBIERI, E.; PHAN, V.N.; GOMES, V. 1998 Efeito do DSS, dodecil sulfato de sódio, no metabolismo e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. *Rev. Brasil. Biol.* **58**, 263-271.

BARBIERI, E.; ROCHA, I.O; SERRALHEIRO, P.C. 2002 The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (mullet) according to the temperature and salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* **277**, 109-127.

BARBIERI, E. 2005 Efeito do LAS-C12 (Dodecil benzeno Sulfonato de Sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da Tainha (*Mugil Platanus*). *Atlântica, Rio Grande*, v. 27, n.1, p. 131-139.

BARBIERI, E. 2007a Use of metabolism and swimming activity to evaluate the sublethal toxicity of surfactant (LAS-C12) on *Mugil platanus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 50, 101-112.

BARBIERI, E. 2007b The use of active metabolism and swimming activity to evaluate the toxicity of Dodecyl Benzene Sodium Sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (Mullet) according to temperature and salinity. *Water Environment Research.* **79**, 707-719.

BARBIERI, E.; FERREIRA, L.A.A. 2011 Effects of the Organophosphate Pesticide Folidol 600 on the Freshwater Fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99, p. 209-214.

BARBIERI, 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* (Oxford), v. 84, p. 9-16.

BATTY, R.S.; BLAXTER, J.H.S.; FRETWELL, K. 1993 Effect of temperature on the escape responses of larval herring, *Clupea harengus*. *Mar. Biol.* **115**, 523-528.

BESCH, W.K.; KEMBALL, A.K.; MEYER-WARDEN, E.; SCHARF, B. 1977 A biological monitoring system employing rheotaxis of fish,. In: Cairns Jr., K.L. Dickson and G. F. Westlake (ed.), *Biological Monitoring of Water and Effluent Quality*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 56-74pp.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. 1989 Fish as "biological model" for experimental studies in ecotoxicology. In: A.Boudou and F. Riiibeyre (eds.), *Aquatic Ecotoxicology Fundamental Concepts and Methodologies*. vol. VIII. CRC Press Inc. Florida. 127-150pp.

BRETT, J.R. 1964 The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **21**, 1183-1226.

BRETT, J.R. 1965 The relation of size to rate of oxygen consumption and sustained swimming speed of sockeye salmon (*Onchorhynchus nerka*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **22**, 1491-1501.

CALDWELL, K. 1957 The biology of the pinfish *Lagodon rhomboides* (Linnaeus). *Bull. Fla St. Mus. biol. Sci.* **2**, 77-173.

CHEUNG, C.C.C.; Lam, V. 1998 Effect of cadmium on the juveniles of a tropical freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Water Science and Technology* **38**, 263-270.

CHRISTIANSEN, P.D.; BROZEK, M.; HANSEN, B.W. 1998 Energetic and behavioral responses by the common goby, *Pomatoschistus microps* (Kroyer), exposed to linear alkybenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 2051-2057.

CLEVELAND, L.; LITTLE, E.E.; HAMILTON, S.J.; BUCKLER, D.R.; HUNN, J.B. 1986 Interactive toxicity of aluminum and acidity to early life stages of brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**, 610-620.

DAMATO, M.; BARBIERI, E. 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* (CUSC. Impresso), v. 36, p. 574-581.

DOI, S.A.; COLLAÇO, F.L.; STURARO, L. R.; BARBIERI, E. 2012 Efeito do chumbo em nível de oxigênio e amônia no camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) em relação à salinidade. *O Mundo da Saúde* (CUSC. Impresso), v. 36, p. 594-601.

FILONOV, A.E. 2000 Spatial structure of the temperature and salinity fields in the presence of internal waves on the continental shelf of the states of Jalisco and Colima (Mexico). *Ciencias Marinas* **26**, 1-21.

FRY, F.E.J. 1971 The effect of environmental factors on the physiology of fish. In Hoar, W. S. & Randall, D. J. eds. *Fish Physiology*. New York, Academic Press. vol.6: 1-98.

GARCIA, J.C.; MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2015 Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 111, p. 131-137.

GUTBERLET, J. 1996 *Cubatão: Desenvolvimento, Exclusão Social, Degradação Ambiental*, EDUSP: São Paulo, p. 244.

GRIPPO, M. A.; HEATH A. G. 2003 The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnows. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55: 187-198.

GUNTER, G. 1945 Studies on the marine fishes of Texas. *Publs Inst. mar. Sci. Univ. Tex.* **1**,1-190.

HALL, L.W. Jr.; ANDERSON, R.D. 1994 The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota (report). Maryland Department of Environment, Baltimore, MD, USA.p.56.

HALL, L.W.Jr.; ZIEGENFUSS, M.C.; ANDERSON, R.D.; LEWIS, B.L. 1995 The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. *Marine Pollution Bull.* **30**, 376-384.

HAMMER, C.; SCHWARZ, G. 1996 The effect of prolonged swimming activity on the growth, proximate body composition and calorific content of O-age group whiting (*Merlangius merlangus* L., Gadidae). *Arch. Fish. Mar. Res.* **44**, 13-32.

HEMPTINNE, J.C.; DHIMA, A.; ZHOU, H. 1998 The importance of water-hydrocarbon phase equilibria during reservoir production and drilling operations.. *Revue de l institut francais du petrole* **53**, 283-302

HOFER, R.; JENEY, Z.; BUCHER, F. 1995 Chronic effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ammonia on rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Water Criteria Limits*. **29**, 2725-2729.

HOWARD, T.E. 1975 Swimming performance of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to bleached kraft pulpmill effluent. *J. Fish. Res. Bd Can.* **32**, 789-793.

KASAPI, W.A.; DOMENICI, P.; BLAKE, R.W.; HARPER, D. 1992 The kinematics and performance of escape responses of knifefish *Xenomystys nigri*. *Can. J. Zool.* **71**, 189-195.

KARPOSIAN, G.; SPEEDING, D.; CHENG, H. 1990 Lunate-tail swimming propulsion. Part. 2. Performance analysis. *J. Fluid Mech.* **210**, 329-351.

KLOTH, T.; WOHLRSCHIAG, D. 1972 Size-related metabolic responses of the pinfish, *Lagodon rhomboides*, to salinity variations and sublethal petrochemical pollution. *Marine Science* **16**, 125-137.

LAURENCE, G.C. 1972 Comparative swimming abilities of fed and starved larval largemouth bass (*Micropterus salmonides*). *J. Fish Biol.* **4**, 73-78.

LITTLE, E.E.; FLEROV, B.A.; RUZHINSKAYA, N.N. 1985 Behavioral approaches in aquatic toxicity: A review. In: Mehrle, P. M. Jr., Gray, R. H. and Kendall, R. L. (eds.), *Toxic Substances in the Aquatic Environment: An International Aspect*. American Fisheries Society, Water Quality Section, Bethesda, MD. 72-98pp.

LITTLE, E.E.; ARCHESKI, R.D.; FLEROX, B.A.; KOZLOVSKAYA, V.I. 1989 Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **12**, 43 -56.

LITTLE, E.E.; FINGER, S.E. 1990 Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environm. Toxicol. and Chemistry* **9**, 13-19.

MAGAZZU, G.; ROMEO, G.; AZZARO, F.; DECEMBRINI, F.; OLIVA, F.; PIPERNO, A. 1995 Chemical pollution by urban and industrial sewages in Augusta bay (Sicily). *Water Science and Technology* **32**, 221-229.

MARTINEZ, D.S.T. ; ALVES, O.L; BARBIERI, E. 2013 Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics. Conference Series (Print)*, v. 429, p. 12-43.

MEHRLE, P. M.; BUCKER, D.R.; LITTLE, E.E.; SMITH, L. M.; PETTY, J.D.; PETERMAN, P.H.; STALLING, D.L.; DEGRAEVE, G. M.; COYLE, J.L.; ADAMS, C. 1988 Toxicity and bioconcentration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin and 2,3,7,8 - Tetrachlorodibenzofuran in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 47-62.

MOUNT, D.I. 1962 Chronic effects of endrin on bluntnose minnows and guppies. U. S. Bur Sport Fish Wildl Res. Rept. **58**, 34-37.

MULE, M.B.; LONTE, V.S. 1994 Effect of heavy metals (CuSO₄ and HgCl₂) on the oxygen-consumption of the fresh-water snail, *Thiara-tuberculata*. *Journal of Environmental Biology.* **15**, 263-268.

MAYER, F.L. Jr.; KRAMER, R.H. 1973 Effects of hatchery water reuse on rainbow trout metabolism. *Prog. Fish Cult.* **35**, 9-10.

OLLA, B.L.; ATEMA, J.; COUTANT, C.; DECOURSEY, P.; HANSEN, D.; KITTERIDGE, J. S.; MAGNUSON, J.J.; MILLER, D.; SCHNELDER, M.J.; VERNBERG, W. 1974 Behavioral measurements of environment stress. In C. V. Cox, (ed.), *Proceedings, Workshop on Marine Bioassays*. Marine Technical Society Washington, D. C. pp. 1-31.

PEAKE, S.; MCKINLEY, R.S.; SCRUTON, D.A. 1997 Swimming performance of various freshwater Newfoundland salmonids relative to habitat selection and fishway design. *J. Fish Biol.* **51**, 710-723.

PEQUEUX, A.; BIANCHINI, A.; GILLES, R. 1996 Mercury and osmoregulation in the crab, *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*. **113**, 149-155.

PETERSON, R. H. 1974 Influence of fenitrothion on swimming velocities of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Bd Can.* **31**, 1757-1762.

RAND, G.M. 1984 The use of behavioral measurements to assess toxicant induced stress in marine organisms. In G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus, (Eds.), *Ecotoxicological testing for the marine environment*, vol.2. Institute for Marine Scientific Research, Bredene, Belgium, pp.431-456.

RAO, E.G.V.P.; KHAN, M.A.Q. 2000 Zebra mussels: Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. *Water Environment Research*. **72**, 175-178.

REIDY, S.P.; NELSON, J.A.; TANG, Y.; KERR, S.R. 1995 Post-exercise metabolic rate in Atlantic cod and its dependence upon the method of exhaustion. *J. Fish Biol.* **47**, 377-386.

SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. 2003 Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere* **52**, 195-201.

SCHMIDT-NIELSEN, K.E.D. 1997 *Animal Physiology. Adaptation and environment*. Cambridge, Cambridge University Press. 607 pp.

TOEPFER, C.; BARTON, M. 1992 Influence of salinity on the rates of oxygen-consumption in two species of fresh-water fishes, *Phoxinus erythrogaster* (family cyprinidae), and *fundulus-catenatus* (family fundulidae). *Hidrobiologia* **242**, 149-154.

WALWOOD, K.G.; BEAMISH, F.W.H. 1978 The effects of copper, pH, and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout, *Salmo gairdeneri*, *Water Res.* **12**, 611-619.

WICKS, B.J.; JOENSEN, R.; TANG, Q.; RANDALL, D.J. 2002 Swimming and ammonia toxicity in salmonids: the effects of sub lethal ammonia exposure on the swimming performance of coho salmon and the acute toxicity of ammonia in swimming and resting rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 59, 55-69.

ANEXO 2 – FOTO LAMBARI – *Astyanax* sp.



ANEXO 3- FOTO: *Poecilia vivipara*

