

**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 NO METABOLISMO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE (*Geophagus iporangensis*) EXPOSTOS DE FORMA SIMPLES E COMBINADA AO ÓXIDO DE GRAFENO E ELEMENTOS TRAÇO (ZINCO E CÁDMIO)**

**Aline Maria Zigiotto de Medeiros**

**Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri**

**Co-orientador: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez**

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**  
**Setembro – 2016**

**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 NO METABOLISMO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE (*Geophagus iporangensis*) EXPOSTOS DE FORMA SIMPLES E COMBINADA AO ÓXIDO DE GRAFENO E ELEMENTOS TRAÇO (ZINCO E CÁDMIO)**

**Aline Maria Zigiotto de Medeiros**

**Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri**

**Co-orientador: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez**

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**

**Setembro – 2016**

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

M488e

Medeiros, Aline Maria Zigiotto de

Efeitos no metabolismo em peixes de água doce (*Geophagus iporangensis*)  
expostos de forma simples e combinada ao Óxido de Grafeno e elementos traço  
(zinco e cádmio) / Aline Maria Zigiotto de Medeiros. – São Paulo, 2016.  
iii, 52f. ; 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. Nanotecnologia. 2. Nanoecotoxicologia. 3. Nanomateriais. 4. Co-contaminantes.  
5. Consumo de oxigênio. 6. Excreção de Amônia. I. Barbieri, Edison. II. Título.

CDD 639.3

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

"EFEITOS NO METABOLISMO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE  
(*Geophagus iporangensis*) EXPOSTOS DE FORMA SIMPLES E  
COMBINADA AO ÓXIDO DE GRAFENO E ELEMENTOS TRAÇO  
(ZINCO E CÁDMIO)"

**AUTOR:** Aline Maria Zigiotta de Medeiros

**ORIENTADOR:** Edison Barbieri

**CO-ORIENTADOR:** Diego Stéfani Teodoro Martinez

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

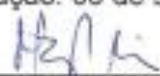


Dr. Antonio Fernando Gervásio Leonardo



Dra. Stefani Rossi

Data da realização: 09 de setembro de 2016



Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dr.ª Maria José T. Ranzani Paiva

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Edison Barbieri por sua constante preocupação na formação de seus alunos. Agradeço pelo tempo dedicado à mim. Tenho orgulho de ter sido parte deste laboratório. Sem seu apoio não teria retornado a vida acadêmica.

Ao apoio fundamental do LNNano. Não tenho palavras para agradecer as contribuições do meu coorientador Dr. Diego Martinez e aos amigos que fiz lá.

Aos funcionários e pesquisadores do Instituto de Pesca, em especial para a equipe da base de Cananéia. Em particular, gostaria de agradecer ao Dito e ao Kelison pelo apoio.

À Francine, minha companheira de laboratório, pelos ensinamentos, ajuda e incentivo. Sua amizade foi fundamental para a construção deste trabalho.

Às pesquisadoras Letizia e Karina pelas valiosas sugestões durante a minha qualificação.

À Camila e ao professor Antonio Sergio, pela preciosa ajuda com a estatística.

À Isabela, super mamãe do ano, que sempre esteve ao meu lado (até em Cananeia). Você é minha inspiração! Quero ser como você quando crescer!

Ao Leonardo, pelos peixes.

À Carmen, pela paciência, amizade e abrigo durante as disciplinas em Santos.

À minha família e amigos, que me apoiaram durante esta jornada. Sei que não é fácil aturar uma mestranda.

Agradeço a amizade de todos! Cada página desta dissertação está impregnada com este sentimento!

*Ohh baby I get by (by with a little help from my friends)*

*All I need is my buddies (try with a little help from my friends)*

*I said I want to get high I will (High with a little help from my friends)*

*Who-Ho-Hoo-yea*

(With a little help from my friends – The beatles)

Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>RESUMO GERAL</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	4
<b>CAPÍTULO 01</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT:</b> .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS:</b> .....	16
2.1. <i>Nanomaterial e elementos traço</i> .....	16
2.2. <i>Estudo da estabilidade coloidal e morfologia do Óxido de Grafeno</i> .....	16
2.3. <i>Organismo teste</i> .....	17
2.4. <i>Ensaio de exposição</i> .....	18
2.5. <i>Análise do consumo de oxigênio e excreção de amônia</i> .....	18
2.6. <i>Análise estatística:</i> .....	19
<b>3. RESULTADOS</b> .....	19
3.1. <i>Consumo de oxigênio</i> .....	19
3.2. <i>Excreção de amônia</i> .....	23
3.3. <i>Diâmetro hidrodinâmico e morfologia do Óxido de Grafeno</i> .....	25
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
<b>Anexo 01:</b> Sistema para análise de consumo de oxigênio e excreção de amônia .....	42
<b>Anexo 02:</b> Análise estatística .....	43

## RESUMO GERAL

A nanotecnologia apresenta potenciais aplicações em diversos setores, tais como eletrônica, farmacêutica, cosméticos, agroindústria e ambiental. Com o aumento da produção destes novos materiais, torna-se inevitável o risco para a saúde humana e ambiental devido ao descarte incorreto de seus produtos / resíduos. Desta forma, é primordial entender a interação destes novos materiais com o ambiente, buscando-se compreender melhor os seus potenciais efeitos adversos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos subletais decorrentes da exposição simples e combinada a um nanomaterial de carbono, o Óxido de Grafeno (OG), e elementos traço (zinco e cádmio) no metabolismo de peixes de água doce (*Geophagus iporangensis*). O consumo de oxigênio apresentou diferenças estatística na média em todas as exposições (OG, Zn, Cd, Zn+OG e Cd+OG). Já o biomarcador excreção de amônia revelou alterações apenas para a exposição ao zinco (exposição exclusiva e combinada). Foi observado que a presença de nanomateriais no meio intensificou o efeito do elemento traço pois constatou-se diferenças em relação ao controle em concentrações menores que na exposição exclusiva ao elemento traço. Além disso, a combinação Zn + OG apresentou um diâmetro hidrodinâmico maior e um potencial zeta menos negativo que o meio preparado apenas com OG ou OG+Cd. Desta forma, o estudo sugere que o Óxido de Grafeno pode funcionar como um cavalo de troia quando lançado no ambiente e pode potencializar o efeito de outros xenobiontes.

**Palavras-chave:** nanotecnologia, nanoecotoxicologia, nanomateriais, co-contaminantes, consumo de oxigênio, excreção de amônia.

## ABSTRACT

Nanotechnology has potential application in several areas, such as electronics, pharmaceutical, cosmetics, agribusiness and environmental. Due to the increase of production of these nanomaterials, the risk for human safe and environmental is inevitable, due the incorrect disposal of products / waste. Thus, it is fundamental understand its interaction with the environment, in order to better understand its potential adverse effects. The aim of this study is observed the sub lethal metabolism effects on freshwater fish (*Geophagus iporangensis*) due to exposure in single and combined form of graphene oxide (GO) and trace elements (zinc and cadmium). O oxygen consumption showed difference statically in all exposition groups (GO, Zn, Cd, Zn+GO, Cd+GO). Perhaps, the biomarker ammonia excretion only showed difference for zinc exposure (exclusive and associated). The presence of nanomaterial intensified the effect of trace element as combined exposure showed difference statistic at means in lower concentration that exclusive exposure. Furthermore, the Zn+GO combination showed a hydrodynamic diameter bigger and zeta potencial less negative than GO or GO+Cd. So, this study propose that graphene oxide could work as Trojan horse in the environmental and could increase the effects of others contaminants.

**Key-words:** nanotechnology, nanoecotoxicology, nanomaterials, co-contaminants, oxygen consumption, ammonia excretion.



# 1 INTRODUÇÃO GERAL

2

3 A nanotecnologia estuda, manipula e explora partículas cuja dimensão está na  
4 escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) (SHARON and SHARON, 2010). Com a diminuição do  
5 tamanho das partículas, ocorre o aumento da área superficial atômica em relação ao  
6 volume total da partícula que resulta em mudanças físico-químicas e estruturais, as  
7 quais acarretam no surgimento de novas propriedades quando comparados aos  
8 materiais convencionais, em microescala (bulk), de mesma composição química (NEL *et*  
9 *al.*, 2006).

10 Desta forma, inovações associadas a esta nova tecnologia podem ajudar no  
11 desenvolvimento de diferentes setores, como o agroalimentar (KUZMA e VERHAGE,  
12 2006), farmacêutico (TONELLI *et al.*, 2015), de cosméticos (ARIF *et al.*, 2015), eletrônica  
13 (YAN e MELOSH, 2016) e ambiental (KÜHNEL *et al.*, 2016)

14 Na aquicultura, o uso de nanomateriais tem propiciado melhores técnicas e  
15 inovações capazes de resolver diversos problemas relacionados a saúde animal,  
16 produção, reprodução, prevenção e tratamento de doenças (RATHER *et al.*, 2011). O seu  
17 uso pode melhorar as embalagens utilizadas no acondicionamento dos produtos, devido  
18 ao aumento da resistência e transparência, a atividade antimicrobiana ou através de  
19 sensores que indiquem o início da deterioração da carne (De AZEVEDO, 2009).

20 Os nanomateriais podem ser aplicados como agente de entrega de  
21 micronutrientes (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014) e de produtos veterinários, como  
22 vacinas, probióticos, hormônios e fármacos na produção de peixes (BHATTACHARYYA  
23 *et al.*, 2015). As características físicas da ração também podem ser modificadas com a  
24 inclusão de nanomateriais, auxiliando o manejo dos animais (HANDY, 2012).

25 Outra aplicação que pode trazer benefícios para aquicultura está na melhoria da  
26 qualidade d'água, fator essencial para a sanidade dos animais aquáticos. As  
27 propriedades antimicrobianas de alguns nanomateriais, como nanopartículas de titânio  
28 e de prata, podem ser usadas para evitar o crescimento excessivo de microrganismos no  
29 sistema (MÜHLING *et al.*, 2009). A nanotecnologia também pode ser aplicada para a  
30 purificação da água, pois podem adsorver compostos halogenados (como pesticidas  
31 organoclorados) e metais (PRADEEP e ANSHUP, 2009).

32 Eles também podem ser utilizados como material alternativo na construção de  
33 gaiolas, por conferirem maior resistência sem adição de peso (CHANG *et al.*, 2010).

34 O Grafeno é um nanomaterial cuja estrutura é composta por uma monocamada  
35 de átomos de carbono arranjadas em hexágonos com hibridização sp<sup>2</sup> formando uma  
36 folha bi-dimensional (GEIM e NOVOSELOV, 2007). A família do Grafeno inclui few-  
37 layer-graphene (FLG), ultrathin graphite, Óxido de Grafeno (OG), Óxido de Grafeno  
38 reduzido (rOG) e nanosheets (SANCHEZ *et al.*, 2012). O Óxido de Grafeno contém  
39 grupos funcionais oxigenados e uma carga superficial negativa os quais proporcionam  
40 maior reatividade e solubilidade em água ou em solventes polares (TONELLI *et al.*,  
41 2015).

42 Os benefícios do uso da nanotecnologia e de nanomateriais como Grafeno são  
43 consideráveis, porém, seu uso deve ser feito de modo responsável para que os potenciais  
44 riscos à saúde humana ou ao meio ambiente sejam minimizados (HANDY, 2012). Os  
45 nanomateriais podem potencialmente atingir o meio ambiente durante uso, produção e  
46 descarte, desta forma, estudos ecotoxicológicos são fundamentais para conhecermos o  
47 risco envolvido (BONCEL *et al.*, 2015).

48 Devido a escala nanométrica, estes materiais são capazes de interagir com  
49 biomoléculas (i.e. enzimas e receptores) das células (NAVALAKHE e NANDEDKAR,  
50 2007) e pode provocar efeitos negativos no organismo. De fato, o tamanho nanométrico  
51 dos materiais permite uma natural interação com os níveis inferiores da organização  
52 biológica, e dependendo da natureza desta interação, vias de exposição e tempo de  
53 contato, ocorrerão a manifestação de diferentes efeitos biológicos/toxicológicos  
54 (MARTINEZ e ALVES, 2013).

55 Os efeitos deletérios ao organismo decorrentes da exposição de nanomateriais  
56 podem ser modificados por diversos fatores, tais como: formato, tamanho, purificação,  
57 processos pós-produção, estado oxidativo, grupos funcionais, dispersão, método de  
58 síntese, forma de exposição (rota, dose e tempo de exposição) (LALWANI, 2016),  
59 recobrimentos e defeitos estruturais, (YANG *et al.*, 2013), presença de co-contaminantes,  
60 método de funcionalização, encapsulamento ou adesão de íons ou materiais  
61 carbonáceos, dispersão ou aglomeração dos materiais no meio (HANDY e SHAW, 2007).

62 Desta forma, a caracterização integrada dos nanomateriais é fundamental para  
63 compreensão do comportamento destes no meio e entendimento dos impactos dos  
64 xenobiontes sobre os organismos (WANG, 2011).

65 Por se tratar de materiais altamente reativos, podem interagir com outras  
66 substâncias alterando os seus efeitos. Devido a esta interação, eles conseguem introduzir  
67 e liberar xenobionte no interior de células vivas, proporcionando um efeito conhecido

68 como cavalo de troia (KAHRU e DUBOURGUIER, 2010). Assim, a presença de  
69 nanomateriais no ambiente é capaz de modular o perfil ecotoxicológico de outros  
70 contaminantes alterando sua biodisponibilidade (SANCHIS *et al.*, 2016).

71       Corpos hídricos são destinos prováveis dos nanomateriais e os estudos  
72 ecotoxicológicos devem compreender fatores ambientais, como pH, temperatura, luz  
73 UV, matéria orgânica e outros poluentes para simular condições ambientais realistas  
74 (WONG *et al.*, 2013).

75       Escolheu-se como animal experimental o peixe por ser modelo utilizado para  
76 avaliar o limite aceitável de resíduos em corpos aquáticos e por se tratar de um grupo  
77 amplamente distribuído e presente em diversos ambientes (BOLIS *et al.*, 2001). A espécie  
78 escolhida trata-se do cará (*Geophagus iporangensis*), um peixe presente em uma região  
79 protegida de mata atlântica do vale do rio Ribeira de Iguape (TESHIMA *et al.*, 2015).

80       Uma das formas que os organismos aquáticos são expostos aos nanomateriais  
81 presentes no meio é através do contato branquial (ZICCARDI *et al.*, 2008; CAMPOS-  
82 GARCIA *et al.*, 2016). De acordo com HANDY *et al.* (2008) os nanomateriais são  
83 suficientemente pequenos para atingir as lamelas branquiais, o que a torna um dos  
84 órgãos alvo destas substâncias. As brânquias têm como função as trocas gasosas,  
85 manutenção do pH dos fluídos corpóreos, equilíbrio osmótico e iônico e excreção de  
86 compostos nitrogenados. Por se tratar de um órgão polivalente, ela desempenha um  
87 papel fundamental na fisiologia dos peixes (EVANS *et al.*, 2005).

88       Os biomarcadores fisiológicos escolhidos, consumo de oxigênio e excreção de  
89 amônia, estão intimamente relacionados com o bom funcionamento das brânquias. Eles  
90 refletem o metabolismo dos organismos e possibilitam mensurar o estresse da exposição  
91 às mudanças no ambiente, tais como a presença de xenobiontes (ADAMS *et al.*, 1989;  
92 DEPLEDGE *et al.*, 1995; VIJAYAVEL e BALASUBRAMANIAN, 2006; BARBIERI *et al.*,  
93 2013). Desta forma, distúrbios metabólicos podem resultar em mudanças na resposta do  
94 organismo (i.e. rotas metabólicas, capacidade de natação, atividade enzimática,  
95 reprodução, crescimento) alterando diversos comportamentos do animal e  
96 influenciando diretamente na sua capacidade de sobrevivência ao meio (SCOTT e  
97 SLOMAN, 2004). Além disso, o custo energético demandado no ajuste fisiológico  
98 decorrente da exposição podem influenciar processos como fecundidade, fertilidade,  
99 eclosão de ovos, sobrevivência larval o que resulta também na redução da viabilidade  
100 populacional (CAPPARELLI *et al.*, 2015)

101 O consumo de oxigênio mensura a oxidação do substrato alimentar e, desta  
102 forma, está interligado com dispêndio de energia para a manutenção da vida  
103 (BARBIERI, 2007). Além disso, o consumo de oxigênio está diretamente relacionado com  
104 a taxa de absorção dos xenobiontes (YANG *et al.*, 2000). A brânquia é um órgão plástico,  
105 capaz de se remodelar para diminuir a área superficial. Se por um lado, esta modificação  
106 pode reduzir a superfície de contato com o xenobionte, por outro pode diminuir a  
107 eficiência respiratória (NILSSON *et al.*, 2012)

108 Já a excreção de amônia é o produto final do catabolismo de aminoácidos em  
109 peixes (RANDALL e WRIGHT, 1987). Normalmente o aumento do catabolismo está  
110 associado com acréscimo do custo metabólico para a manutenção da homeostase, bem  
111 como energia adicional para detoxificação (SCOTT e SLOMAN, 2004).

112 Em condições de estresse, um descréscimo destas taxas podem indicar a  
113 incapacidade do organismo de compensar a perturbação ambiental (DE BOECK *et al.*,  
114 1995).

115 Como o cádmio e o zinco são poluentes comuns, objetivou-se estudar a interações  
116 destes elementos com o Óxido de Grafeno, um potencial contaminante emergente. Para  
117 isso, observou-se os efeitos no metabolismo de peixes de água doce (*Geophagus*  
118 *iporangensis*) decorrentes da exposição exclusiva e combinada do nanomaterial e dos  
119 elementos traço. O estudo realizado gerará um artigo que está apresentado na forma de  
120 capítulo desta dissertação.

121

## 122 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

123

124 ADAMS, S.M.; SHEPARD, K.L.; GREELEY JR, M.S.; JIMENEZ, B.D.; RYON, M.G.;  
125 SHUGART, L.R.; MCCARTHY, J.F.; HINTON, D.E. 1989 The use of bioindicators for  
126 assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Reserach**, nº 28,  
127 p. 459-464, 1989.

128

129 ARIF, T.; NISA, N.; AMIN, S.S.; SHOIB, S.; MUSHTAQ, R.; SHAWL, M.R. 2015.  
130 Therapeutic and Diagnostic Applications of Nanotechnology in Dermatology and  
131 Cosmetics. **Journal Nanomedine Biotherapeutic Discovery**. nº 5: 134. doi:10.4172/2155-  
132 983X.1000134

133

134 BARBIERI, E. 2007. Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate  
135 the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936,  
136 Crustacea). **Water Environmental Research**, n° 79, p. 641-646, 2007.

137

138 BARBIERI, E.; BRANCO, J. O.; FERRÃO, M. C.; HIDALGO, K. R. 2013. Effects of  
139 Cadmium and Zinc on Oxygen consumption and ammonia excretion of the Sea-Bob  
140 shrimp, according to temperature. **Boletim do Instituto de Pesca**, 39 (3):299-309.

141

142 BHATTACHARYYA, A.; REDDY, S.J.; HASAN, M.M.; ADEYMI, M.M.; MARYE, R.R.,  
143 NAIKA, R. 2015. Nanotechnology: A unique future technology in aquaculture for the  
144 food security. **International Journal of Biossays**, n° 4, p. 4115-4126, 2015.

145

146 BONCEL, S.; KYZIOŁ-KOMOSINSKA J.; KRZYZEWSKA I.; CZUPIOŁ, J. 2015.  
147 Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing  
148 organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems - A  
149 review. **Chemosphere**, n° 136, p. 211-221, 2015.

150

151 BOLIS, C.L.; PICCOLELLA, M.; DALLA, A.Z.; RANKIN, J.C. 2001. Fish as model in  
152 pharmacological and biological research. **Pharmacological Research**, n° 4, 2001.

153

154 CHANG, C. C.; HSU, I. K.; AYKOL, M.; HUNG, W. H.; CHEN, C. C.; CRONIN, S. B.  
155 2010. A new lower limit for the ultimate breaking strain of carbon nanotubes. **ACS Nano**,  
156 n° 4, p. 5095-5100, 2010.

157

158 CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D.S.T.; REZENDE, K.F.O.; da Silva, J.R.M.C.;  
159 ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia  
160 exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. **Ecotoxicology and**  
161 **Environmental Safety**, n° 133, p. 481-488, 2016.

162

163 CAPPARELLI, M.V.; ABESSA, D.M.; McNAMARA, J.C. 2015. Effects of metal  
164 contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler  
165 crab *Uca rapax* (oxypodidae, Brachyura). **Comparative Biochemistry and Physiology**  
166 **part C**, n° 186, p. 102-111, 2015.

167

168

169 De AZEVEDO, H.M.C. 2009. Nanocomposites for food packaging applications. **Food**  
170 **Research International**, n° 42, p. 1240-1253, 2009.

171

172 DE BOECK, G.; DE SMET, H. RONNY, B. 1995. The effect of sublethal levels of copper  
173 on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*.  
174 **Aquatic toxicology**, n° 32, p.127-141, 1995.

175

176 DEPLEDGE, M.H.; AAGAARD, A.; GYORKOS, P. 1995. Assessment of trace metal  
177 toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution**  
178 **Bulletin**, n° 31, p.19-27, 1995.

179

180 EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. 2005. The multifunctional fish gill:  
181 dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of  
182 nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, n° 85, p.97-177, 2005.

183

184 JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, E.; RUYRA, A.; ROHER, N.; ZUASTI, E. 2014. Nanoparticles  
185 as a novel delivery system for vitamin C administration in aquaculture. **Aquaculture**,  
186 n°432, p. 426-433, 2014.

187

188 GEIM, A.K.; NOVOSELOV, K.S. 2007. The rise of graphene. **Nature Materials**, n° 6 , p.  
189 183-191, 2007.

190

191 HANDY, R.D. e SHAW, B.J. 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials:  
192 implications for public health, risk assessment and the public perception of  
193 nanotechnology. **Health,Risk & Society**, n° 9, p.125-144, 2007.

194

195 HANDY, R.D.; HENRY, T.B.; SCOWN, T.M.; JOHNSTON, B.D.; TYLER, C.R. 2008.  
196 Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish - a mechanistic analysis.  
197 **Ecotoxicology**, n° 16, p. 396-409, 2008.

198

199 HANDY, R.D. 2012. FSBI briefing paper: nanotechnology in fisheries and aquaculture.  
200 **Fisheries Society of the British Isles**, p. 1-29, 2012.

201

202 KAHRU, A. e DUBOURGUIER, H. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology.  
203 **Toxicology**, nº 269, p. 105-119, 2010.  
204

205 KÜHNEL, D.; MARQUARDT, C.; NAU, K.; KRUG, H.F.; PAUL, F.; STEINBACH, C.  
206 2016. Environmental benefits and concerns on safety: communicating latest results on  
207 nanotechnology safety research—the project DaNa2.0. **Environmental Science**  
208 **Pollution Research**. p.1-16. Doi: 10.1007/s11356-016-6217-0  
209

210 LALWANI, G., D'AGATI, M., KHAN, A.M., SITHARAMAN, B. 2016. Toxicology of  
211 graphene-based nanomaterials. **Advance Drug delivery Reviews**, 2016.  
212

213 KUZMA, J. e VERHAGE, P. 2006. Nanotechnology in agriculture and food production:  
214 Anticipated applications. **Project on Emerging Nanotechnologies**, 2006.  
215

216 MARTINEZ, D.S.T. and ALVES, O.L. 2013. Interação de nanomateriais com biosistemas  
217 e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, nº 65, p.32-  
218 36, 2013.  
219

220 MÜHLING, M.; BRADFORD, A.; READMAN, J.W.; SOMERFIELD, P.J.; HANDY, R.D.  
221 2009. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of  
222 naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. **Marine Environmental Research**,  
223 nº 68, p.278-283, 2009.  
224

225 NAVALAKHE, R. e NANDEDKAR, T.D. 2007. Application of nanotechnology in  
226 biomedicine. **Indian Journal of Experimental Biology**, nº 45, p. 160-165, 2007.  
227

228 NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. 2006. Toxic potencial of material at nanolevel.  
229 **Science**, v. 311, p. 622-627, 2006.  
230

231 NILSSON, G.E.; DYMOWSKA, A.; STECK, A.W. 2012. New insights into the plasticity  
232 of gill structure. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, nº 184, p. 214-222, 2012.  
233

234 PRADEEP, T. e ANSHUP. 2009. Noble metal nanoparticles for water purification: a  
235 critical review. **Thin Solid Films**, nº 24, p. 6441-6478, 2009.

236

237 RANDALL, D.J. e WRIGHT, P.A. 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. **Fish**  
238 **Physiology and Biochemistry**, nº 3, p.107-120, 1987.

239

240 RATHER, M.A., SHARMA, R., AKLAKUR, M., AHMAD, S. KUMAR, N., KHAN, M.,  
241 RAMYA, V.L. 2011 Nanotechnology: a novel tool for aquaculture and fisheries  
242 development: a prospective mini-review. **Fisheries and Aquaculture Journal**, nº16, p.1-  
243 15, 2009.

244

245 SANCHEZ, V.C.; JACHAK, A.; HURT, R.H.; KANE, A.B. 2012. Biological Interactions of  
246 Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. **Chemical Research in**  
247 **Toxicology**, nº 25, p. 15-34, 2012

248

249 SANCHIZ, J.; OLMOS, M.; VICENT, P.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. 2016. New Insights  
250 on the Influence of Organic Co-Contaminants on the Aquatic Toxicology of Carbon  
251 Nanomaterials. **Environmental Science & Technology**, nº 50, p. 961-969, 2016.

252

253 SHARON, M. and SHARON, M. Introduction to the Nanoworld of Carbon. In: **Carbon**  
254 **Nano Forms and Applications**. McGraw-Hill Professional, AccessEngineering, 2010.

255

256 SCOTT, G.R. e SLOMAN, K.A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex  
257 fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. **Aquatic**  
258 **Toxicology**, nº 68, p.369-392, 2004.

259

260 TESHIMA, F.A.; FERREIRA, F.C.; CETRA, M. 2015. Rarity status of endemic and  
261 vulnerable fish species in a Brazilian Atlantic Forest protect area. **Natureza &**  
262 **Conservação**, nº 13, p. 67-73, 2015.

263

264 TONELLI, F. M.; GOULART, V. A.; GOMES, K. N.; LADEIRA, M. S.; SANTOS, A. K.;  
265 LORENÇON, E.; LADEIRA, L.O.; RESENDE, R. R. 2015. Graphene-based nanomaterials:  
266 biological and medical applications and toxicity. **Nanomedicine**, nº 10, p.2423-2450,  
267 2015.

268



269 VIJAYAVEL, K. e BALASUBRAMANIAN, M.P. 2006. Changes in oxygen consumption  
270 and respiratory enzymes as stress indicators in an estuarine edible crab *Scylla serrata*  
271 exposed to naphthalene. **Chemosphere**, n° 63, p.1523-1531, 2006.  
272

273 YAN, H. e MELOSH, N. 2016. Nanoparticles make salty circuits. **Nature**  
274 **Nanotechnology**, n° 11, p.579-580, 2016.  
275

276 YANG, K.; LI, Y.; TAN, X.; PENG, R.; LIU, Z. 2013. Behavior and toxicity of graphene  
277 and its functionalized derivates in biological systems. **Small**, n° 9, p. 1492-1503, 2013.  
278

279 YANG, R.; BRAUNER, C.; THURSTON, V.; NEUMAN, J.; RANDALL, D.J. 2000.  
280 Relationship between toxicant transfer kinetc process and fish oxygen comsuption.  
281 **Aquatic Toxicology**, n° 2-3, p. 95-108, 2000.  
282

283 WANG, W. 2011. Incorporating exposure into aquatic toxicological studies: an  
284 imperative. **Aquatic Toxicology**, n° 1055, p. 9-15, 2011.  
285

286 WONG, S.W.Y.; LEUNG, K.Y.L.; DJURISIC, A.B. 2013. A comprehensive review on the  
287 aquatic toxicity of engineered nanomaterials. **Reviews in Nanoscience and**  
288 **Nanotechnology**, n° 2, p. 79-105, 2013.  
289

290 ZICCARDI, L., MCARDLE, M., LOWNEY, Y. 2008. The ecological effects of  
291 nanomaterials: a focus on aquatic life. **Nano: Brief Reports and Reviews**, n° 3, p. 251-  
292 255, 2008.

## **CAPÍTULO 01**

**Efeitos no metabolismo em peixes de água doce (*Geophagus iporangensis*) expostos de forma simples e combinada ao óxido de grafeno e elementos traço (Zn e Cd)**

(Artigo está redigido nas normas da Revista  
“*Ecotoxicology and Environmental Safety*”)

1 **Efeitos no metabolismo em peixes de água doce (*Geophagus iporangensis*)**  
2 **expostos de forma simples e combinada ao Óxido de Grafeno e elementos**  
3 **traço (Zn e Cd)**

4  
5 Autores: Aline Zigiotta <sup>a</sup>, Diego Stefani Teodoro Martinez <sup>b</sup>, Oswaldo Luiz Alves<sup>c</sup>,  
6 Edison Barbieri <sup>d\*</sup>

7  
8 <sup>a</sup> Programa de Pós Graduação do Instituto de Pesca-SP-APTA SAA/SP, Caixa  
9 Postal 157, 11990-000 - Cananéia, SP, Brazil

10 <sup>b</sup> Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Centro Nacional de  
11 Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas-SP, Brasil.

12 <sup>c</sup> Laboratório de Química de Estado Sólido (LQES), Instituto de Química,  
13 UNICAMP, Campinas-SP.

14 <sup>d</sup> Instituto de Pesca – APTA SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990000 -  
15 Cananéia,SP,Brazil

16  
17 \* Corresponding author at:

18 Instituto de Pesca – APTA- SAA/SP, CaixaPostal 157, SP11900-000 – Cananéia,  
19 SP, Brazil. E-mail address: edisonbarbieri@yahoo.com.br (E. Barbieri).

20  
21 **RESUMO**

22  
23 O Óxido de Grafeno (OG) faz parte de um conjunto de novos materiais que  
24 possuem características específicas devido ao seu tamanho nanométrico.  
25 Porém, devido a esta mesma característica ele pode interagir com o meio  
26 ambiente de forma desconhecida e potencializar o efeito tóxico de alguns  
27 contaminantes. Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos deste  
28 nanomaterial e suas interações com dois contaminantes comuns, zinco e  
29 cádmio, sobre o peixe nativo de água doce *Geophagus iporangensis*. Para tanto,  
30 utilizou-se os biomarcadores fisiológicos consumo de oxigênio e excreção de  
31 amônia como respostas as alterações no metabolismo. Grupos de peixes foram  
32 expostos durante 24 horas a diferentes concentrações das seguintes  
33 substâncias: OG (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L), Zn (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 mg/L) e

34 Cd (0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L). A combinação destes materiais foi verificada  
35 por meio do uso das mesmas concentrações do elemento traço acrescidas de  
36 1,0 mg/L de OG. A exposição ao OG e Cd ocasionou redução do consumo de  
37 oxigênio pelo *G. Iporangensis* de aproximadamente 30% na maior concentração  
38 estudada (4 mg/L). Porém, os peixes expostos ao Zn aumentaram esta taxa.  
39 Neste caso, houve um aumento de cerca de 3 vezes com relação ao controle na  
40 maior concentração estudada (10 mg/L). Não foram encontradas diferenças na  
41 excreção de amônia em relação ao controle dos peixes expostos ao OG e Cd,  
42 porém, a exposição ao Zn acarretou em aumento na média desta taxa de 47%  
43 na concentração 10 mg/L com relação ao controle. A exposição combinada de  
44 OG com Zn intensificou o efeito do elemento traço apresentando respostas em  
45 menores concentrações em ambos bioindicadores, demonstrando que a  
46 interação entre os elementos aumentou os efeitos do Zn. Para a exposição  
47 Cd+OG, este fato só foi observado para o consumo de oxigênio. Desta forma, o  
48 biomarcador consumo de oxigênio demonstrou que a exposição combinada de  
49 OG com Zn e Cd potencializou os efeitos decorrentes da exposição ao elemento  
50 traço.

51

52 **Palavras Chaves:** nanoecotoxicologia, consumo de oxigênio, excreção de  
53 amônia

54

55 **Metabolic effects in the native freshwater fish (*Geophagus iporangensis*) in**  
56 **response to single and combined exposure of graphene oxide and its trace**  
57 **elements (Zn and Cd)**

58

59 ABSTRACT:

60

61 Graphene oxide (GO) is part of new brand of materials which have specific  
62 characteristics due their nanoscale size. Perhaps, due this characteristic them  
63 can interact with the environmental on unknown way and increase the toxic effect  
64 of some contaminants. The aim of this study is analyze the effects of this  
65 nanomaterial and its interactions with two common contaminants, zinc and  
66 cadmium, on native freshwater fish *Geophagus iporangensis*. To this end, the bio  
67 indicators oxygen consumption and ammonia excretion are used as measure of

68 metabolism alteration. Groups of fishes were exposed during 24 hours at different  
69 concentrations of these substances: GO (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L), Zn (0,5; 1,0;  
70 2,0; 4,0 e 10,0 mg/L) e Cd (0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L). The mix of the material  
71 was verified with the same concentration of trace elements plus 1,0 mg/L of GO.  
72 The OG and Cd exposure result in decrease of oxygen consumption of *G.*  
73 *iporangensis* around 30% of control means in the major concentration (4.0 mg/L).  
74 Perhaps the zinc exposure cause enhance of this rate around three times in 10  
75 mg/L. Ammonia excretion didn't show different in the exposure to OG and Cd  
76 regarding control, but, the Zn exposure enhance this rate around 47% in  
77 exposure to 10 mg/L. The combine exposure of GO with Zn intensified the effects  
78 of trace element showed difference at lowest concentrations in both biomarkers,  
79 showing the interaction between elements increase the effects. The exposure  
80 Cd+GO, this fact is only true to oxygen consumption. Thus, the oxygen  
81 consumptions showed with the combined exposure potentiated the effects of the  
82 exposure the trace element on the fish metabolism.

83

84 **Key words:** nanoecotoxicology, oxygen consumption, ammonia excretion

85

## 86 1. INTRODUÇÃO

87

88 Os nanomateriais (NMs) são substâncias que, em ao menos uma  
89 dimensão, possuem tamanho menor ou igual a 100 nm, apresentando-se  
90 morfológicamente como esferas, filmes ou tubos (Cattaneo et al., 2009). Devido  
91 às dimensões nanométricas, estes possuem maior relação entre área superficial  
92 e volume, a qual é responsável por características mecânicas, óticas,  
93 magnéticas e químicas inéditas em relação aos materiais convencionais (Quina,  
94 2004).

95 Desta maneira, apresentam um alto potencial de inovação, sendo  
96 promissores na área de melhoramento de produtos (e.g. desenvolvimento de  
97 materiais de alta resistência, componentes eletrônicos e magnéticos) (Barbosa,  
98 2011), de medicamentos e de cosméticos (Arifi et al., 2015; Nurummabi et al.,  
99 2015; Tonelli et al., 2015). Por possuírem alta reatividade, a aplicação destes  
100 materiais como adsorventes tem sido estudada, principalmente em questões

101 como remediação de contaminantes orgânicos e inorgânicos em ambientes  
102 aquáticos (Upadhyay et al., 2014; Wang et al., 2013; Zhao et al., 2011).

103 O nanomaterial objeto desta pesquisa é o Grafeno. Ele é um material  
104 nanoestruturado, cujos átomos de carbono estão organizados em hexágonos,  
105 formando uma folha plana, com apenas um átomo de espessura (Jastrzebska et  
106 al., 2012).

107 Um dos derivados deste material é o Óxido de Grafeno (OG). Ele é o  
108 produto da esfoliação química do grafite e contém grupos funcionais de oxigênio  
109 reativos (Dreyer et al., 2010). A presença destes grupos, como o carboxila, epóxi  
110 e hidroxila, confere sua interação com cátions divalentes, além de aumentar a  
111 sua dispersibilidade (Zhao et al., 2014).

112 O mercado para os nanomateriais da família do Grafeno, como o Óxido  
113 de Grafeno, está projetado em \$675 milhões para 2020 o qual poderá influenciar  
114 na quantidade de resíduos advindos da síntese e manipulação deste material  
115 (Ahmed and Rodrigues, 2013).

116 No ambiente, o Óxido de Grafeno pode interagir com componentes  
117 orgânicos e inorgânicos por meio de ligações não covalentes, covalentes e/ou  
118 iônicas (Hu and Zhou, 2012), proporcionadas pela sua carga superficial negativa  
119 (Santos et al., 2014; Wang et al., 2013). Devido a estas interações, existem  
120 evidências na literatura de que os nanomateriais podem alterar a toxicidade de  
121 xenobiontes (Campos-Garcia et al., 2015; Kim et al., 2009).

122 Diante deste cenário, faz-se necessário estudar os efeitos desses  
123 materiais no ambiente aquático, bem como sua interação com outros poluentes  
124 (Martinez et al., 2013; Zhao et al., 2014).

125 Estudos ecotoxicológicos são fundamentais para sustentar medidas de  
126 regulamentação e para que o risco ao meio ambiente possa ser calculado e  
127 devidamente prevenido (Doi et al., 2012; Klaine et al., 2008) e mitigado. Novas  
128 legislações deverão surgir indicando valores guias para estes materiais, bem  
129 como tecnologias para o tratamento destes resíduos (Paschoalino et al., 2010).  
130 Estudos quanto aos efeitos dos NMs sobre a biota deverão ser realizados com  
131 a finalidade de determinar concentrações “seguras” para os organismos como  
132 os peixes.

133 Corpos d’água são um dos destinos finais dos nanomateriais após o  
134 descarte, e os organismos aquáticos estarão expostos a eles por ingestão,

135 contato branquial, transporte passivo e absorção celular (Campos-Garcia et al.,  
136 2016; Ziccardi et al., 2008). Por esse motivo utilizou-se neste estudo o Cará  
137 (*Geophagus iporangensis*), peixe de água doce pertence à família *Cichlidae*,  
138 presente na bacia do Rio Ribeira do Iguape (Teshima et al., 2015). Seus hábitos  
139 onívoros e o fato de ser um peixe não migratório podem resultar em seu contínuo  
140 contato com um provável contaminante ambiental, tornando-o um excelente  
141 modelo biológico para avaliar a contaminação do ambiente por xenobiontes.

142 Elementos traço, como zinco e cádmio, são conhecidos poluentes no  
143 ambiente aquático que podem causar danos a biota (Barbieri and Paes, 2011;  
144 Evans, 1987). Além disso, são utilizados como substância referência em teste  
145 de toxicidade, sendo úteis para avaliar as condições de sensibilidade dos  
146 organismos teste, possibilitando repetibilidade e comparabilidade, servindo  
147 como carta controle para estudos biológicos (Zagatto and Bertolotti, 2006).

148 Os indicadores fisiológicos, consumo de oxigênio e excreção de amônia,  
149 são utilizados para avaliar possíveis perturbações no metabolismo de animais  
150 aquáticos pois fornecem informações importantes sobre o estado metabólico do  
151 organismo (Barbieri and Ferreira, 2011; De Boeck et al., 1995; Sokolova and  
152 Lanning, 2008). Estes parâmetros são importantes pois estão intimamente  
153 relacionados com a sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos  
154 (Beitinger and McCauley, 1990). Desta maneira, o uso de biomarcadores  
155 fisiológicos possibilita avaliar os efeitos subletais do estresse causados pela  
156 exposição de organismos à poluição ambiental (Adams *et al.*, 1989; Depledge *et*  
157 *al.*, 1995; Vijayavel and Balasubramanian, 2006 ).

158 Diversos estudos mostraram a correlação da exposição de animais a  
159 contaminantes e alterações em seus metabolismos, tais como: pesticidas  
160 organofosforados em tilápias *Oreochromis niloticus* (Barbieri and Ferreira, 2011),  
161 cobre em carpas *Cyprinus carpio* (de Boeck et al., 1995), detergente LAS-C12  
162 em tainhas *Mugil platanus* (Barbieri, 2007).

163 Com o uso crescente de aplicações do Grafeno, é inevitável sua presença  
164 no ambiente aquático o que torna fundamental o controle das autoridades e de  
165 legislação específica sobre o descarte desses materiais. Além disso, a  
166 biodisponibilidade dos NMs pode ser alterada por fatores ambientais, tais como  
167 presença de co-contaminantes (Sanchiz et al., 2016), por esse motivo é

168 recomendado que os ensaios ecotoxicológicos simulem a provável interação  
169 entre eles sempre que possível (Wong et al., 2013).

170 Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos decorrentes  
171 da exposição ao Óxido de Grafeno e de sua interação com elementos traço (i.e.  
172 zinco e cádmio) utilizando como biomarcador o consumo de oxigênio e a  
173 excreção de amônia do peixe nativo de água doce Cará (*Geophagus*  
174 *iporangesis*).

175 A hipótese deste estudo foi de que o óxido de Grafeno ao interagir com o  
176 Zn e Cd , seria capaz de potencializar os efeitos tóxicos dos elementos traço  
177 quando exposto de forma combinada.

178

## 179 2. MATERIAIS E MÉTODOS:

180

### 181 2.1. *Nanomaterial e elementos traço*

182

183 O nanomaterial utilizado foi o Óxido de Grafeno de parede simples,  
184 comercializado pela Cheap Tubes Inc., Brattleboro, USA. De acordo com as  
185 informações comerciais, este possui pureza de 99%, tendo sido caracterizado  
186 em um trabalho anterior por Dúran et al. (2015). Segundo este autor as imagens  
187 obtidas por AFM revelaram que o nanomaterial possui espessura de 0.7-1,2 nm  
188 com dimensões aproximadas de 300-800nm (eixos X&Y).

189 A solução estoque de Óxido de Grafeno (OG) foi preparada em água  
190 ultrapura na concentração de 1 g/L, em banho ultrassônico por 30 minutos. Antes  
191 de sua adição nos aquários, foi sonicada em banho durante 15 minutos para  
192 garantir a sua dispersão no meio.

193 Para o zinco e cádmio, utilizaram-se como padrão analítico os sais ZnCl<sub>2</sub>  
194 e CdCl<sub>2</sub> (99,5%, Merk). A solução estoque foi preparada na proporção de 1:1 em  
195 água destilada e adicionada aos aquários no momento do experimento.

196

### 197 2.2. *Estudo da estabilidade coloidal e morfologia do Óxido de Grafeno*

198

199 Foi realizado o estudo da estabilidade coloidal deste nanomaterial no  
200 mesmo meio utilizado para o experimento (água de abastecimento previamente  
201 filtrada) durante 24 horas. Medidas de diâmetro hidrodinâmico e carga



202 superficial (potencial Zeta) foram obtidas pelas técnicas de espalhamento de luz  
203 dinâmico (DLS) e eletroforético (ELS) no equipamento Zetasizer Nano ZS  
204 (Modelo ZEN3600, Malvern). Foram preparadas soluções com as seguintes  
205 concentrações: 4 µg/L de OG; 4 µg/L de OG com 80 µg/L de Cd e 4 µg/L de OG  
206 com 200 µg/L de Zn. Estas diluições foram escolhidas em decorrência de serem  
207 as maiores concentrações utilizadas no teste de ecotoxicidade.

208 As análise do diâmetro hidrodinâmico foi realizada em uma amostra de  
209 1ml em uma cubeta de poliestireno nos tempos 0, 3, 6 e 24 horas após o preparo  
210 da solução. Foram realizadas três medidas para cada análise. Parâmetros  
211 relacionados com a qualidade da medida, tais como valor do atenuador,  
212 correlograma, *count rate* e variação entre as medidas, foram observados.

213 A mensuração do pontencial Zeta foi realizada no mesmo aparelho. Em  
214 uma cubeta específica (DTS1060) foi colocado 1 ml da solução preparada e as  
215 análises ocorreram logo depois o preparo do material e após 24 horas. Três  
216 medidas foram realizadas.

217 O Grafeno utilizado neste estudo foi avaliado quanto a sua forma e  
218 morfologia da superfície através de imagens de topografia obtidas por  
219 microscopia de força atômica (AFM). Para esta análise foi preparada uma  
220 solução com 5 mg/L com água ultrapura. Uma amostra de 3 µL desta solução foi  
221 gotejada sobre um porta amostras de mica recém clivada e permaneceu em um  
222 dessecador durante 24 horas. O material depositado foi analisado no  
223 microscópio de Força Atômica, Nanoscope IIIa, da Digital Instruments®, em  
224 modo de operação tapping, contato intermitente. Foi utilizado ponteira PPP-  
225 CNHR, cuja frequência de ressonância é de 320 KHz e possui a constante de  
226 força de 42 N/m. As imagens foram tratadas no software Gwyddion e no ImageJ.

227

### 228 2.3. *Organismo teste*

229

230 Um total de 145 alevinos *Geophagus iporangensis* com peso médio 0,96  
231 ± 0,34 g (média ± desvio padrão) foram empregados para a avaliação do  
232 consumo de oxigênio e excreção de amônia. Os peixes foram obtidos do Centro  
233 de Piscicultura do Polo Regional-Apta de Pariquera-Açú, interior de São Paulo,  
234 e mantidos no Instituto de Pesca – Base Cananeia em tanques de 500 L por uma

235 semana para sua aclimação. Os animais foram alimentados com ração  
236 comercial uma vez ao dia durante este período. A alimentação foi suspensa 24  
237 horas antes da realização do teste. Nenhum animal foi utilizado mais de uma  
238 vez.

239

#### 240 *2.4. Ensaios de exposição*

241

242 Durante o experimento utilizou-se água de abastecimento desclorificada,  
243 previamente filtrada utilizando-se um filtro de éster de celulose com poro de 0,25  
244 µm com auxílio de uma bomba a vácuo.

245 Os 145 peixes foram separados aleatoriamente em 29 grupos, com 5  
246 indivíduos cada, os quais foram inseridos em aquários de 5 litros, contendo um  
247 litro da água filtrada, e com pH de 6,5. Os aquários foram constantemente  
248 aerados com temperatura controlada ( $20,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ).

249 Os peixes foram expostos durante 24 horas às seguintes concentrações:  
250 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 mg/L de Zn, 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L de Cd, 0,5; 1,0;  
251 2,0 e 4,0 mg/L de Óxido de Grafeno, além dos respectivos controles. A  
252 combinação destes materiais foi verificada por meio do uso das mesmas  
253 concentrações do elemento traço (0,5; 1,0; 2,0, 4,0 e 10,0 mg/L de Zn e 0,1; 0,5;  
254 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L de Cd) acrescidas de 1,0 mg/L de Óxido de Grafeno. A  
255 solução dos aquários foi preparada 30 minutos antes da inserção dos peixes.  
256 Para a exposição combinada, o meio foi preparado primeiramente com elemento  
257 traço e, após 15 minutos, foi acrescentado o Óxido de Grafeno.

258

#### 259 *2.5. Análise do consumo de oxigênio e excreção de amônia*

260

261 A análise foi realizada através da técnica de respirômetria fechada. Foi  
262 utilizado um sistema com água desclorificada e sem nenhum contaminante. Este  
263 é composto por dois compartimentos com circulação contínua de água entre  
264 eles. Em um dos compartimentos, são colocados recipientes de vidro  
265 herméticos, denominados respirômetros.

266 Após a exposição nos aquários, os peixes foram primeiramente  
267 aclimatados nos respirômetros pelo período de 1 hora com circulação contínua

268 de água para atenuar o estresse causado pelo manuseio. Posteriormente o fluxo  
269 de água foi interrompido e os respirômetros fechados por uma hora e meia.

270 Após este período, uma amostra de água foi retirada de cada  
271 respirômetro. A diferença entre as concentrações de oxigênio e da amônia  
272 determinadas no início e ao final do confinamento foi utilizada para o cálculo do  
273 consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/L/h) e excreção específica de amônia  
274 (mg/L/g/h). Para tal, foi considerado no cálculo o volume do respirômetro, o peso  
275 úmido do animal e o tempo de confinamento. O oxigênio dissolvido foi  
276 determinado segundo o método de Winkler (Winkler, 1888) e a excreção de  
277 amônia pelo método de Nessler (Standard Methods for the Examination of Water  
278 and Waste Water).

279

## 280 *2.6. Análise estatística:*

281

282 Os dados de consumo específico de oxigênio e excreção de amônia foram  
283 analisados quanto a normalidade da distribuição utilizando-se o teste de Shapiro-  
284 Wilk e homocedasticidade das variâncias usando o teste de Levene. Como os  
285 resultados formam normais e homocedásticos, as diferenças entre as médias  
286 dos tratamentos foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA)  
287 seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância  
288  $p < 0,05$ .

289 A comparação entre a exposição exclusiva e combinada na mesma  
290 concentração de elemento traço foi realizada através de teste t ( $p < 0,05$ ).

291 A análise estatística foi realizado no software Past, enquanto que os  
292 gráficos foram confeccionados através do software r.

293

## 294 3. RESULTADOS

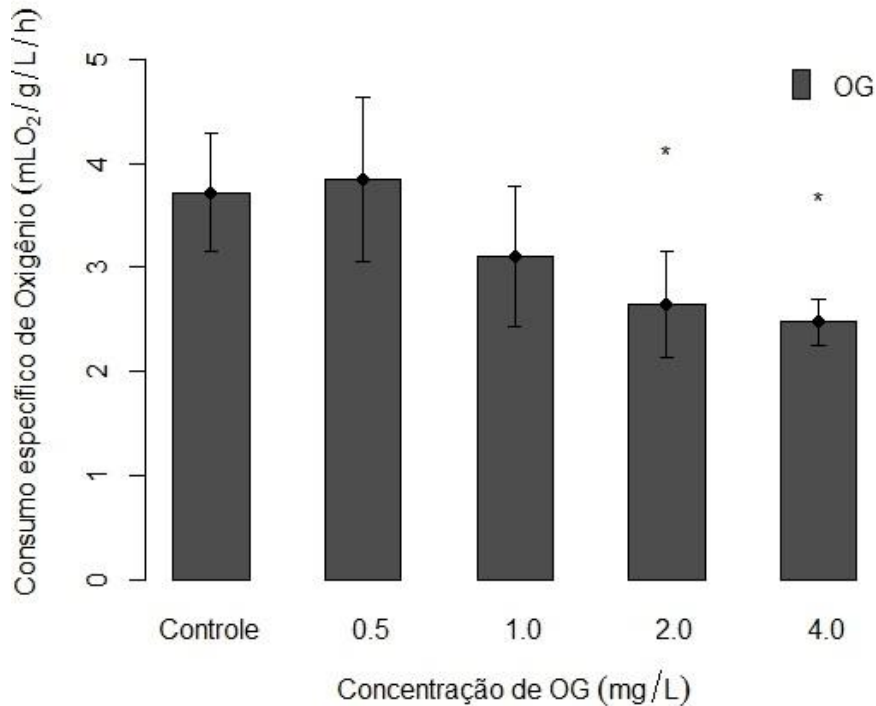
295

### 296 *3.1. Consumo de oxigênio*

297

298 Peixes expostos ao Óxido de Grafeno apresentaram redução no consumo  
299 específico de oxigênio. Houve diminuição na média do consumo específico de  
300 oxigênio de 33,3% em relação ao controle na maior concentração estudada (4,0  
301 mg/L). Nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg/L de Óxido de Grafeno, os valores de

302 consumo específico de oxigênio foram estatisticamente diferentes em relação ao  
303 controle (figura 1).



304

*Figura 1: Consumo específico de oxigênio em relação a concentração de Óxido de Grafeno. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios padrão. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatística em relação ao controle*

305

306 O consumo específico de oxigênio em indivíduos expostos ao Zn  
307 apresentou aumento com diferenças estatísticas nas maiores concentrações  
308 estudadas (4,0 e 10,0 mg/L de Zn) em relação ao controle. Na concentração de  
309 10 mg/L este aumento foi 3 vezes maior que a média encontrada no grupo  
310 controle (figura 2).

311

312

313

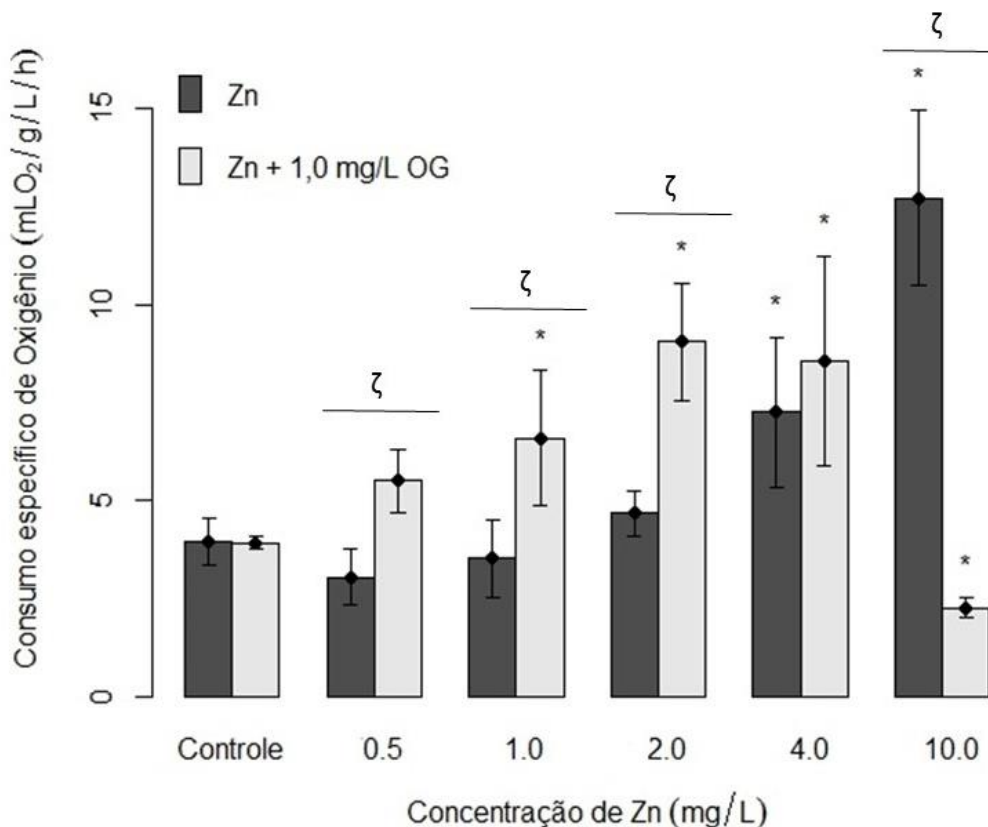
314

315

Acrescentando-se 1,0 mg/L de Óxido de Grafeno às concentrações de Zn, observou-se aumento do consumo específico de oxigênio até a concentração de 4,0 mg/l. Entretanto, na concentração de 10 mg/L houve uma diminuição significativa em relação ao controle. A partir da concentração 1,0 mg/L de Zn com 1,0 mg/L de Grafeno, todas as concentrações apresentaram valores de

316 consumo específico de oxigênio estatisticamente diferentes em relação ao  
317 controle (figura 2).

318 Comparando-se a exposição simples e combinada podemos observar que  
319 elas foram diferentes nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0 e 10,0 mg/L de Zn.



320

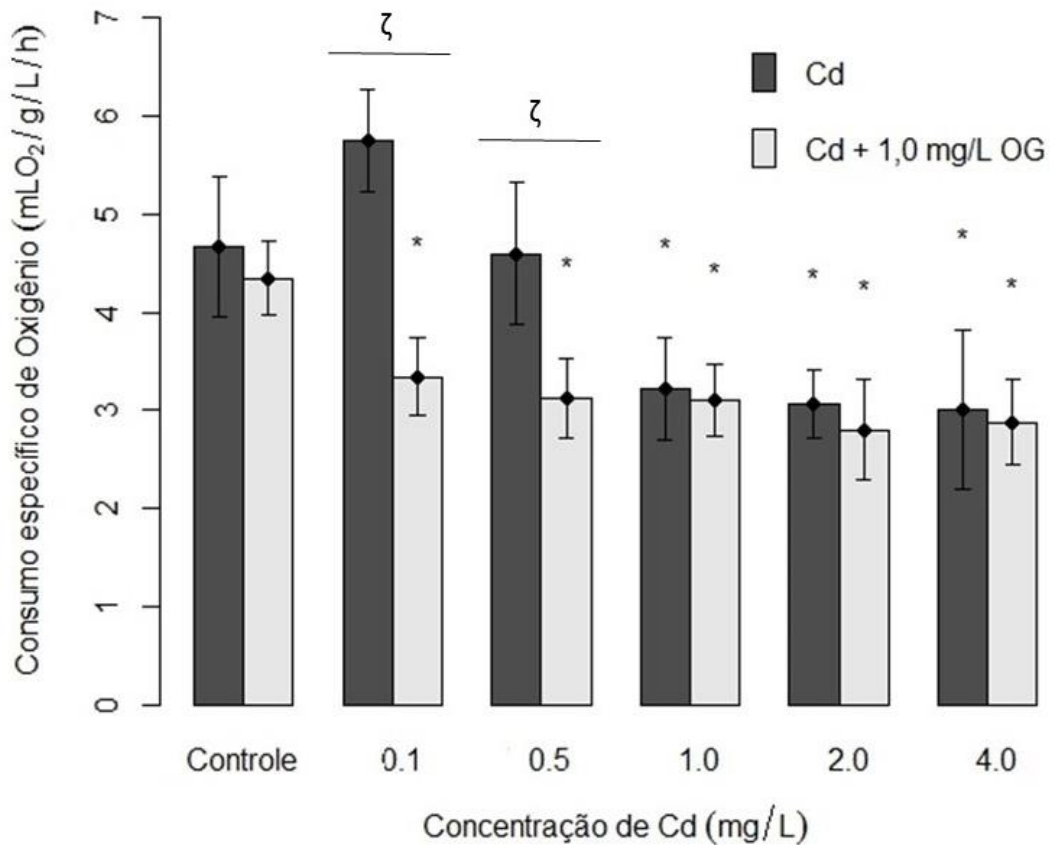
*Figura 2: Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/L/h) em relação a concentração de Zn e Zn + 1,0 OG (mg/L). As colunas representam as médias e as barras são os respectivos desvios padrões (n=5). O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatísticas significativas em relação ao controle. O símbolo ζ indica diferença entre a exposição simples e combinada em uma determinada concentração.*

321

322 Em indivíduos expostos ao Cd, o consumo específico de oxigênio  
323 diminuiu significativamente em relação ao controle a partir da concentração de  
324 1,0 mg/L. Na maior concentração estudada (4,0 mg/L) verificou-se uma redução  
325 na média do consumo de oxigênio de 35,6% em relação ao controle (figura 3).

326 Na interação de cádmio com 1,0 mg/L de Óxido de Grafeno houve  
327 diminuição do consumo específico de oxigênio a medida que elevou-se a  
328 concentração do elemento traço. Na maior concentração estudada (4,0 mg/L Cd  
329 + 1,0 mg/L OG) houve redução na média do consumo de oxigênio de  
330 aproximadamente 33,7% em relação ao controle. Todas as concentrações  
331 estudadas foram diferentes ao controle (figura 3).

332 A exposição combinada de Cd e OG apresentou diferença da exposição  
333 exclusiva ao Cd apenas nas duas menores concentrações estudadas (0,1 e 0,5  
334 mg/L).



335

*Figura 3: Consumo específico de oxigênio em relação a concentração de Cd e Cd + 1,0 OG (mg/L). As colunas representam as médias e as barras são os respectivos desvios padrões (n=5). O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatística em relação ao controle. O símbolo ζ indica diferença entre a exposição simples e combinada em uma determinada concentração.*

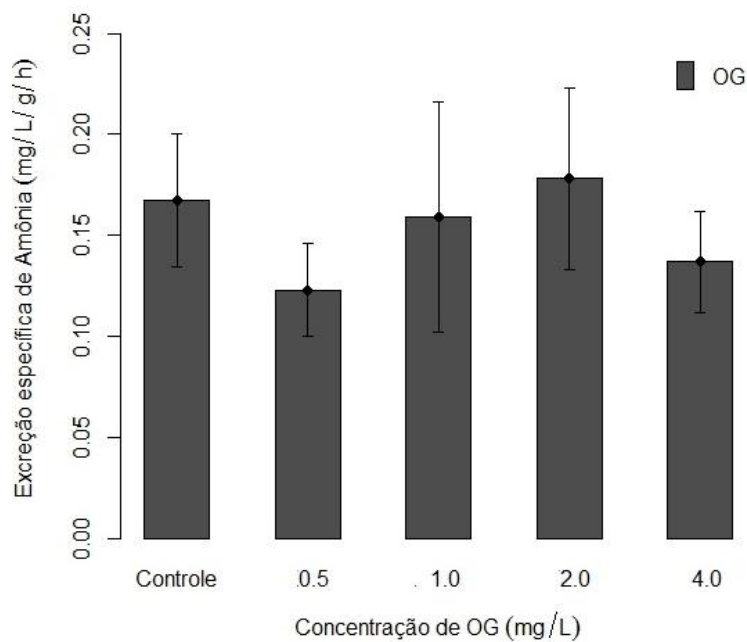
336

337 3.2. Excreção de amônia

338

339 A excreção específica de amônia de peixes expostos ao Óxido de Grafeno  
340 não demonstrou tendência, pois nenhuma das concentrações estudadas  
341 apresentaram médias diferentes em relação ao controle para o tempo de  
342 exposição estudado (figura 4).

343



344

*Figura 4: Excreção específica de amônia em relação à concentração de Óxido de Grafeno. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatísticas*

345

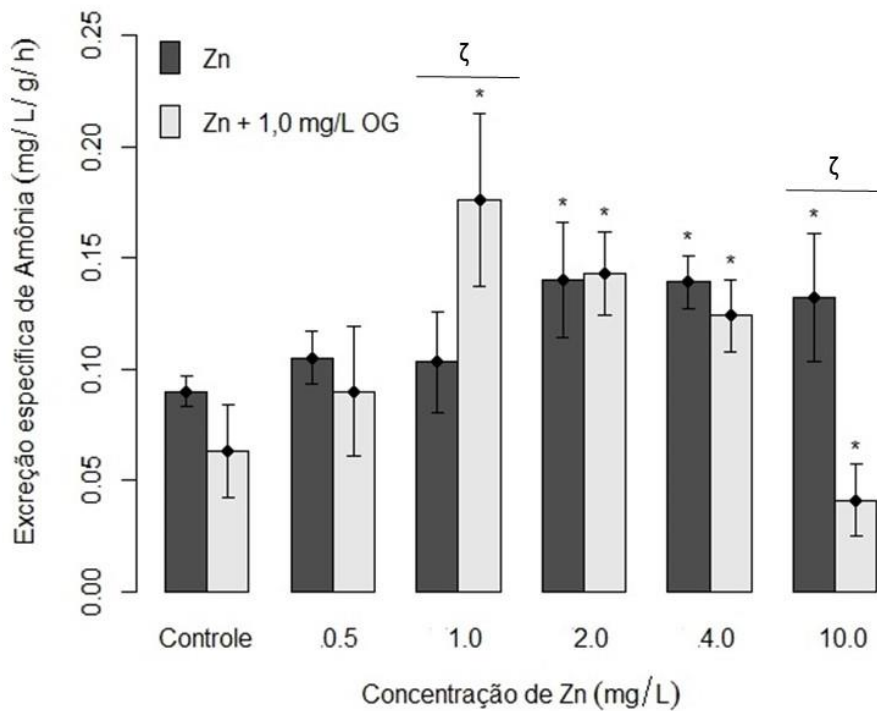
346 Os resultados obtidos para a excreção de amônia em relação ao aumento  
347 das concentrações de Zn foram evidenciados por uma tendência de elevação  
348 das taxas em relação ao controle. Entretanto, ao empregar o teste estatístico  
349 somente as concentrações de 2,0; 4,0 e 10,0 mg/L foram diferentes em relação  
350 ao controle (figura 5).

351 Avaliando-se a combinação de Óxido de Grafeno com Zn constatou-se  
352 que houve diferença estatística significativa para as concentrações a partir de  
353 1,0 mg/L na taxa de excreção de amônia dos peixes. Esta taxa aumentou até a  
354 concentração de 4 mg/L de Zn e diminuiu em 10,0 mg/L. Entretanto, somente as

355 concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L de Zn acrescidas de 1 mg/L de OG foram  
356 estatisticamente diferentes em relação ao controle (figura 5).

357 A exposição simples diferenciou da exposição combinada nas  
358 concentrações 1,0 e 10,0 mg/L de Zn. Na maior concentração, a excreção de  
359 amônia na exposição combinada foi cerca de 5,6 vezes menor quando  
360 comparado com a combinada.

361



362

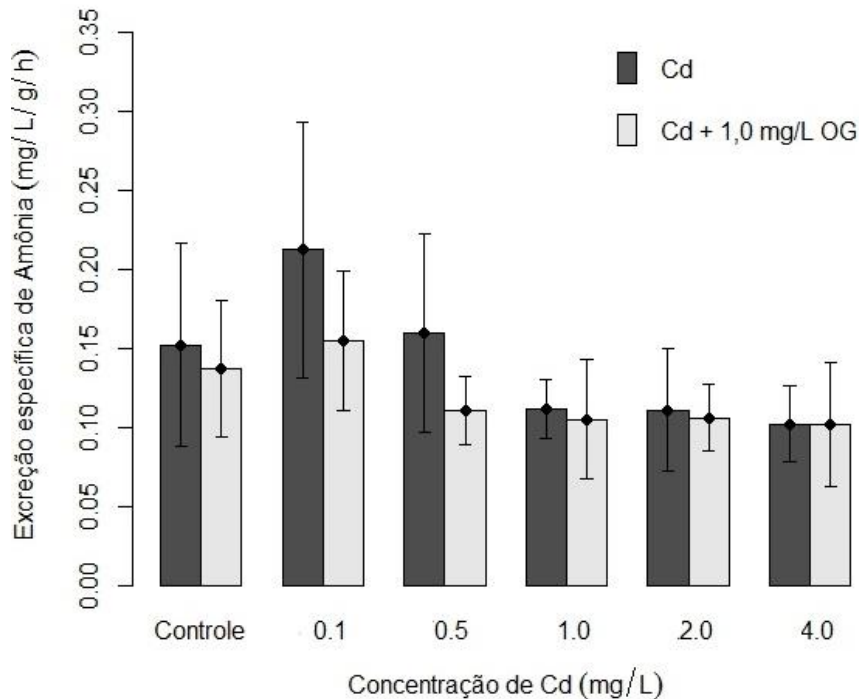
*Figura 5: Excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em relação à concentração de Zn e Zn + 1,0 OG (mg/L). As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatísticas significativas em relação ao controle. O símbolo ζ indica diferença entre a exposição simples e combinada em uma determinada concentração.*

363

364 Os indivíduos expostos ao cádmio apresentaram propensão de aumento  
365 na taxa de excreção de amônia na menor concentração (0,1 mg/L Cd), seguido  
366 de tendência de redução a medida em que houve o aumento da concentração  
367 deste xenobionte. Porém nenhuma das concentrações estudadas apresentou  
368 diferença estatística em relação ao controle (figura 6).



369 Na exposição combinada de cádmio com 1,0 mg/L de Óxido de Grafeno  
 370 observou-se aumento na excreção de amônia para a menor concentração,  
 371 seguida de redução com o aumento da concentração de cádmio. Nenhum dos  
 372 tratamentos apresentou diferença significativa com relação do controle (figura  
 373 06).  
 374



375

*Figura 6: Excreção específica de Amônia em relação à variação da concentração de Cd e Cd+ 1,0 OG. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios padrões. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferenças estatística significativas em relação ao controle. O símbolo ζ indica diferença entre a exposição simples e combinada em uma determinada concentração.*

376

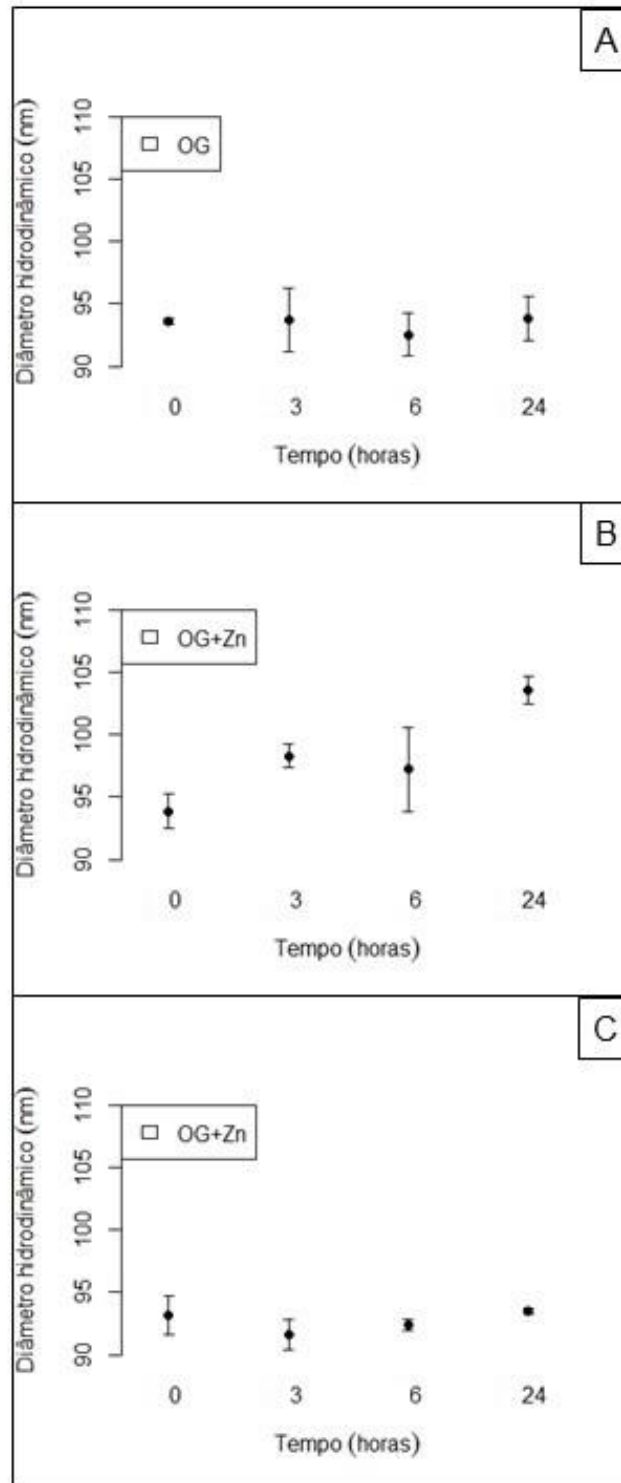
### 377 3.3. Diâmetro hidrodinâmico e morfologia do Óxido de Grafeno

378

379 Os diâmetros hidrodinâmicos da amostra de Óxido de Grafeno e da sua  
 380 interação com Zn e Cd na água de torneira, ao longo do tempo, estão  
 381 apresentados na figura 7. Pode-se notar que ocorreu agregação / sedimentação  
 382 do material quando na presença de zinco, com diferença estatística ao longo do  
 383 tempo, o que pode indicar uma provável interação entre os dois materiais. A

384 análise estatística também evidenciou diferença no diâmetro hidrodinâmico nos  
385 tempos 24 horas para os demais tratamentos (OG e Cd+OG).

386



387

Figura 7: Média e desvio padrão do diâmetro hidrodinâmico (nm) das soluções de OG (A); OG+Zn (B) e OG+Zn (C) ao longo de 24 horas na água de torneira previamente filtrada. Os testes foram conduzidos em triplicata.

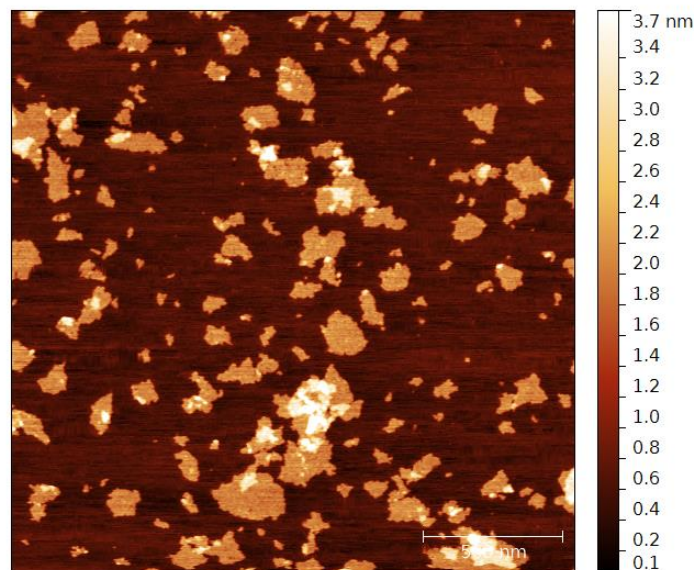
388 A carga superficial do grafeno na solução, mensurada pelo potencial Zeta,  
389 está apresentado na tabela 1. Os valores encontrados, em módulo, maiores que  
390 30 indicam uma boa dispersão no meio. Em relação ao GO, a combinação  
391 Zn+OG aumentou os valores negativos encontrados, o que sugere uma  
392 diminuição da carga superficial negativa nanomaterial e possível instabilidade no  
393 meio..  
394

*Tabela 1: Potencial Zeta (média ± desvio padrão) do OG e sua interação com Zn e Cd dispersos em água de abastecimento filtrada (mV). Os testes foram conduzidos em triplicatas.*

Amostra	Tempo (horas)	
	0	24
OG	-31.1 ± 0.40	-37.6 ± 5,46
Zn+OG	-24.1 ± 1.77	-24.9 ± 1,16
Cd+OG	-30.8 ± 3.40	-31.7 ± 3,73

395  
396  
397  
398  
399  
400

A imagem de topografia do Óxido de Grafeno obtidas através da AFM estão apresentadas na figura 8. Pode-se observar o formato e a morfologia superficial do nanomaterial.



401  
402

*Figura 8: Imagem de topografia do Óxido de Grafeno obtida por AFM.*

## DISCUSSÃO

Peixes expostos ao Óxido de Grafeno demonstraram redução em sua taxa de consumo de oxigênio nas maiores concentrações estudadas. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidados (HNO<sub>3</sub>-MWCNTs) realizado Martinez et al. (2013). Estes autores encontraram uma redução de 58% no consumo de oxigênio em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) quando comparado ao grupo controle. Smith et al. (2007) também constaram a diminuição da eficiência respiratória em trutas arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) quando expostas a nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs). Estes autores verificaram modificações na respiração dos peixes (redução da taxa de ventilação), presença dos nanomateriais no muco e danos histopatológicos que resultaram em irritações e lesões nas brânquias dos peixes, alterando assim a eficiência respiratória. Kashiwada (2006) observou alta concentração de nanopartículas fluorescentes aderidas a superfície branquial do peixe *Oryzias latipes* após 7 dias de exposição, o que pode ter resultado em prejuízos nas trocas respiratórias.

De acordo com Handy et al. (2008a) os nanomateriais são suficientemente pequenas para atingir a lamela secundária tendo acesso a superfície das brânquias. Devido a sua carga superficial e propriedades eletrostáticas, os nanomateriais interagem com as mucoproteínas presentes neste órgão. Assim, as brânquias são um dos órgãos alvos dos nanomateriais de carbono (Handy et al., 2011). Estes danos podem explicar a redução da eficiência respiratória encontrada nesse estudo. Efeitos ecotóxicos semelhantes também foram confirmados para outros grupos de animais. Em larvas de *Artemia salina* (Mesaric et al., 2015), observou-se a presença de Óxido de Grafeno no trato digestivo e adesão deste à superfície do corpo, incluindo apêndices e brânquias. Esta adesão provocou fusão das lamelas brânquias o que pode ter inibido a natação das larvas. Assim, a perda da integridade branquial devido a exposição ao Óxido de Grafeno pode ser a causa para a redução do consumo de oxigênio observada neste estudo.

O consumo de oxigênio revelou aumento da taxa quando os peixes foram expostos exclusivamente ao zinco. Assim como neste trabalho, Sellers et al. (1975) também constataram alterações respiratórias na exposição subletais

437 agudas ao zinco em salmões (*Salmo gairdneri*). Estes autores verificaram  
438 redução da pressão de oxigênio no sangue que, conseqüentemente, fez com  
439 que o organismo aumentasse a frequência dos movimentos respiratórios,  
440 ocasionando maior consumo de oxigênio. Brafield e Matthiessen (1975) e  
441 Gehrke (1988) também constataram aumento desta taxa quando *Gasterosteus*  
442 *aculeatus* e *Leiopotherpon unicolor* foram expostos ao zinco.

443 Neste trabalho, o grupo exposto ao cádmio apresentou queda significativa  
444 nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L. Damato and Barbieri (2012) também  
445 encontraram uma tendência semelhante na exposição de Cd em peixes  
446 (*Hyphessobrycon callistus*). A integridade branquial foi afetada em perca-gigante  
447 (*Lates calcarifer*) no qual observou-se que a exposição a este elemento resultou  
448 em edema no epitélio, aneurisma na lamela secundária e hiperplasia de células  
449 epiteliais e clorídricas com 24 horas de exposição (Thophon et al., 2003). A  
450 brânquia é um órgão altamente plástico que pode se remodelar para reduzir a  
451 área superficial, diminuindo o contato com xenobionte com perda da eficiência  
452 respiratória (Nilsson et al., 2012). Além disso, a redução desta taxa pode ser um  
453 mecanismo fisiológico importante para diminuir a absorção de xenobiontes,  
454 tendo em vista que captação de contaminantes está diretamente ligado com o  
455 consumo de oxigênio (Yang et al., 2000).

456 Na combinação do nanomaterial com zinco ou cádmio verificou-se  
457 respostas com diferenças estatísticas em relação ao controle em menores  
458 concentrações quando comparados com os grupos expostos exclusivamente ao  
459 elemento. Assim, pode-se constatar que a presença do nanomaterial associado  
460 com outro xenobionte alterou o consumo específico de oxigênio. Segundo  
461 Barbieri (2007) a taxa respiratória está relacionada com a energia liberada pela  
462 oxidação do substrato alimentar e, desta forma, mensura o dispêndio de energia  
463 para a manutenção de processos vitais. Desta forma, a redução encontrada nas  
464 maiores concentrações das exposições de forma combinada, podem representar  
465 uma queda no metabolismo dos peixes, provavelmente devido a dificuldades  
466 para manter a homeostase. Este fato também foi relatado por Campos-Garcia et  
467 al. (2015) e Martinez et al. (2013), quando tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)  
468 foram expostas a HNO<sub>3</sub>-MWCNTs associados aocarbofurano (pesticida) e  
469 chumbo, respectivamente.

470 Sendo a amônia o produto final do catabolismo das proteínas em peixes,  
471 sua quantidade excretada depende do estado do animal, condições ambientais  
472 e da espécie (Randall and Wright, 1987), fato que permite seu uso como um  
473 biomarcador da atividade metabólica do animal frente a diferentes poluentes.

474 Com relação a esta taxa, os efeitos no grupo exposto ao Óxido de Grafeno  
475 não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo  
476 controle. Segundo Smith et al. (2012) aparentemente o peixe pode contornar os  
477 distúrbios osmorregulatórios causados pela exposição à nanomateriais. Em um  
478 estudo realizado por Ma et al. (2016) com peixes híbridos da tilápia de  
479 Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) com a vermelha (*Oreochromis*  
480 *niloticus* var.) verificou-se que a ingestão de OG não alterou a morfologia do  
481 fígado dos animais. Este fato corrobora com o nosso estudo, pois o fígado é o  
482 maior produtor de NH<sub>3</sub> (Randall e Wright, 1987). Porém, vale salientar que este  
483 mesmo estudo evidenciou mudanças na expressão gênica do fígado indicando  
484 que este órgão poderia ser afetado com uma exposição por período mais longo.

485 Os grupos expostos ao zinco apresentaram propensão de aumento da  
486 excreção específica conforme a elevação da concentração desta substância. A  
487 exposição à este resultou em um incremento do influxo do sódio nas brânquias  
488 do peixe *Galaxias maculatus* (McRae et al., 2016). Uma vez que a excreção de  
489 amônia é realizada pelo complexo trocador Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub>, o aumento do influxo de  
490 sódio resultará em acréscimo da excreção de peixes (Wilkie, 1997)  
491 corroborando os valores encontrados neste estudo. A exposição sub-crônica (15  
492 dias) a concentração sub-letal de zinco em *Channa punctatus* causou uma  
493 redução do glicogênio e das proteínas do fígado, provavelmente resultado do  
494 aumento do catabolismo (Srivasta e Verma, 2009).

495 Já a exposição ao cádmio revelou tendência de redução, porém, não foi  
496 observada diferença entre tratamentos e o controle. Em um estudo conduzido  
497 por Al-Attar, 2005, não foram observadas alterações nas concentrações de  
498 proteínas no sangue em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a este  
499 xenobionte por um dia. Porém, com mais tempo de exposição (4 e 7 dias)  
500 observou-se hiperproteinemia dos espécimes, provavelmente devido à  
501 desordem no metabolismo de proteínas. A exposição por longo período (14 dias)  
502 resultou em uma inibição da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) –ATPase nas brânquias de carpas

503 *Cyprinus carpio* (de la Torre et al. 2000). Assim, esta alteração indicou uma  
504 perturbação no equilíbrio osmótico e iônico dos peixes expostos ao cádmio.

505 Um estudo realizado por Zheng et al. (2016) comparou os efeitos da  
506 exposição de 0,6% LC50 – 96 horas ao zinco e ao cádmio em peixes-zebra  
507 (*Danio rerio*) durante 5 semanas. Foi constatado que o Zn provocou danos e  
508 estresse oxidativos hepáticos menores que a exposição ao Cd. Este fato poderia  
509 explicar o aumento da excreção encontrada na exposição ao Zn, fato que não  
510 ocorreu com o Cd.

511 Na exposição combinada de Óxido de Grafeno e zinco observou-se um  
512 aumento das taxas de excreção específica de amônia com o incremento das  
513 concentrações seguida de uma redução na maior concentração estudada.  
514 Assim, a exposição a este elemento traço pode induzir mudanças no  
515 metabolismo, aumentando o catabolismo para que os organismos suportem a  
516 exposição. Porém, o decréscimo observado na maior concentração pode ser  
517 reflexo da perda da habilidade de excreção do organismo provavelmente pelo  
518 xenobionte ter afetado células envolvidas nas atividades excretoras. Estudos  
519 sobre a interação de zinco com nanotubos de paredes múltiplas (MWCNTs)  
520 também verificaram diferenças quando comparadas com a exposição exclusiva.  
521 Foi observado um efeito sinérgico entre os xenobiontes, evidenciado pelo  
522 aumento no estresse oxidativo e dos danos histológicos no fígado e brânquias  
523 dos peixes *Carassius auratus* expostos (Yan, L. et al., 2016).

524 No grupo de peixes expostos de forma conjunta ao Óxido de Grafeno e  
525 cádmio, a excreção de amônia apresentou uma tendência semelhante quando  
526 comparada a exposição exclusiva ao cádmio, não evidenciando mudanças  
527 metabólicas na exposição combinada dos xenobiontes. No estudo conduzido  
528 Qu, et al., 2014, peixes *Carassius auratus* foram expostos a 0,1 mg/L Cd e 0,1  
529 mg/L Cd + 0,5 mg/L OH-MWCNTs. Com 3 dias de exposição não foi evidenciado  
530 diferença entre os grupos. Porém, após 12 dias verificou-se um efeito maior na  
531 acumulação de metal no fígado e nos biomarcadores de estresse oxidativo na  
532 exposição combinada quando comparada com a exclusiva.

533 Segundo Handy et al. (2008b) nanopartículas e nanomateriais podem  
534 adsorver outras substâncias químicas e promover um efeito sinérgico destes  
535 na presença de outros poluentes, o que poderia explicar a alteração no  
536 metabolismo encontrada no tratamento com a exposição associada do

537 nanomaterial e do elemento traço. Desta forma, quando os nanomateriais  
538 encontram-se dissolvidas elas podem funcionar como “cavalo de troia” de íons  
539 metálicos (Boncel et al. 2015). Assim, quando os nanomateriais estão  
540 combinadas com outros xenobiontes e encontram a superfície das brânquias,  
541 elas liberam uma alta concentração destes elementos, ou provocam uma  
542 liberação lenta e prolongada dos íons no epitélio (Limbach et al., 2007), o que  
543 poderia explicar a alteração no metabolismo encontrada no tratamento com a  
544 exposição associada do nanomaterial e do elemento traço.

545 Os efeitos combinados de cádmio e Óxido de Grafeno foram observados  
546 por Tang et al. (2015). Os danos celulares encontrados na alga *Microcystis*  
547 *aeruginosa* foram maiores na exposição combinada quando comparada ao  
548 grupo exposto somente ao Cd<sup>2+</sup>. Campos-Garcia et al. (2016) verificaram danos  
549 histológicos nas brânquias 25% maiores na exposição conjunta de nanotubos de  
550 carbono oxidados e carbofurano quando comparado com o grupo exposto de  
551 forma exclusiva ao pesticida.

552 Sanchís et al. (2016) estudaram a interação de diferentes nanomateriais  
553 de carbono (fulereno, nanotubo de carbono de paredes múltiplas e Grafeno) com  
554 co-contaminantes orgânicos (malation, glifosato, diuron, triclosan e nonilfenol) em  
555 *Daphnia magna* e *Vibrio fischerie*. Porém, o efeito cavalo de troia somente foi  
556 observado na interação fulereno com malation em *Daphnia*, indicando que as  
557 características dos contaminantes e do comportamento animal são importantes  
558 para que o efeito ocorra. Assim, existe uma correlação forte entre o ambiente e  
559 as características do nanomaterial na ecotoxicidade de NMs.

560 Com relação a caracterização do nanomaterial e sua interação com os  
561 elementos traço, pode-se observar uma maior agregação e redução da carga  
562 negativa na combinação com Zn. O aumento do diâmetro hidrodinâmico  
563 provavelmente é resultado de uma interação maior entre as duas substâncias, o  
564 que poderia explicar a diferença apresentada entre os bioindicadores para  
565 ambas as exposições (exclusiva e combinada). A interação entre o Cd e o OG  
566 não afetou o tamanho hidrodinâmico em 24 horas, o que indica uma provável  
567 interação mais fraca entre os elementos. Assim, somente um biomarcador  
568 (consumo de oxigênio) apresentou diferenças entre a exposição simples e  
569 combinada.

570



#### 571 4. CONCLUSÃO

572

573 O biomarcador consumo de oxigênio revelou alterações no metabolismo  
574 dos peixes, quando estes foram expostos aos xenobióticos na exposição  
575 exclusiva ou combinada. Já a excreção de amônia apresentou mudanças na  
576 média em relação ao controle apenas nos peixes expostos ao zinco e na sua  
577 combinação com o Grafeno.

578 O diâmetro hidrodinâmico do Zn e OG aumentou ao longo do tempo, o  
579 que pode ser reflexo de uma interação entre eles, o que pode ter contribuído na  
580 diferença encontrada em ambos biomarcadores. Este fato não foi observado  
581 com o Cd.

582 A hipótese que a exposição combinada do Zn / Cd com o OG  
583 potencializaria os efeitos dos elementos traço foi confirmada. Assim, o estudo  
584 sugere que o Óxido de Grafeno pode funcionar como um cavalo de troia quando  
585 lançado no ambiente e pode alterar o efeito de outros xenobiontes.

586 Mais estudos são necessários para se compreender os mecanismos de  
587 ação dos nanomateriais, tal como o Grafeno, bem como sua interação com  
588 outras substâncias.

589

#### 590 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

591

592 Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley Jr, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G.,  
593 Shugart, L.R., Mccarthy, J.F., Hinton, D.E., 1989 The use of bioindicators for  
594 assessing the effects of pollutant stress on fish. Mar. Environ. Res. 28, 459-464.

595

596 Ahmed, F., Rodrigues, D.F., 2013. Investigation of acute effects of graphene  
597 oxide on wastewater microbial community: A case study. J. Hazard. Mater. 256,  
598 33-39.

599

600 Al-Attar, A. M., 2005. Biochemical effects os short-term cadmium exposure on  
601 the freshwater fish, *Oreochormis niloticus*. J. Biol. Sci. 5, 260-265.

602

603 Arif, T., Nisa, N., Amin, S.S., Shoib, S., Mushtaq, R., Shawl, M.R., 2015.  
604 Therapeutic and diagnostic applications of nanotechnology in dermatology and  
605 cosmetics. *J. Nanomedicine. Biotherapeutic Discov.* 5:134.  
606  
607 Barbieri, E., 2007. The use of active metabolism and swimming activity to  
608 evaluate the toxicity of dodecyl benzene sodium sulfonate (LAS-C12) on the  
609 *Mugil platanus* (Mullet) accordings to temperature and salinity. *Water Environ.*  
610 *Res.* 79, 707-719.  
611  
612 Barbieri, E., Ferreira, L.A.A., 2011. Effects of the organophosphate pesticide  
613 Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pestic.*  
614 *Biochem. Phys.* 99, 209–214.  
615  
616 Barbieri, E., Paes, E.T., 2011. The use of oxygen consumption and ammonium  
617 excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with  
618 respect to salinity. *Chemosphere.* 84, 641-646.  
619  
620 Barbosa, L. C., 2011. Introdução à química dos compostos aromáticos, in:  
621 Introdução à química orgânica. Pearson, São Paulo, pp. 116-143  
622  
623 Beitinger, T.L., McCauley, R.W., 1990. Whole animal physiological processes for  
624 the assessment of stress in fishes. *J. Great Lakes Res.* 6, 542-575.  
625  
626 Brafield, A.E., Matthiessen, P. 1976. Oxygen consumption by sticklebacks  
627 (*Gasterosteus aculeatus* L.) exposed to zinc. *J. Fish. Biol.* 9, 359-379.  
628  
629 Boncel, S., Kyziol-Komosinska, J., Krzyzewska, I., Czupiol, J., 2015. Interactions  
630 of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic  
631 contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems – A review.  
632 *Chemosphere.* 136, 211-221.  
633  
634 Campos-Garcia, J., Martinez, D.S.T., Alvez, O. L., Leonardo, A.F.G., Barbieri, E.,  
635 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidized multiwalled carbon

636 nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide  
637 ecotoxicity. *Ecotox. Environ. Safe.* 111, 131-137.

638

639 Campos-Garcia, J., Martinez, D.S.T., Rezende, K.F.O., da Silva, J.R.M.C., Alvez,  
640 O.L., Barbieri, E. 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia  
641 exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotox. Environ. Safe.*  
642 133, 481-488.

643

644 Cattaneo, A.G., Gornati, R., Chiriva-Internati, M.; Bernardini, G., 2009.  
645 Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *I.S.J.* 6, 78-97.

646

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

651

652 De Boeck, G., De Smet, H., Blust, R., 1995. The effect of sublethal levels of  
653 copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp,  
654 *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.* 32, 127-141.

655

656 Depledge, M.H., Aagaard, A., Gyorkos, P., 1995. Assessment of trace metal  
657 toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar. Pollut.*  
658 *Bull.* 31,19-27.

659

660 Doi, S. A., Collaço, F. L., Sturaro, L. G. R., Barbieri, E., 2012. Efeito do chumbo  
661 em nível de oxigênio e amônia no camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) em  
662 relação à salinidade. *O Mundo da Saúde.* 36, 594-601.

663

664 Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., 2010. The chemistry of  
665 graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* 29, 228-240.

666

667 Dúran, N., Martinez, D.S.T., De Lima, R., Castro, V.L., Umbuzeiro, G.A., Barbieri,  
668 E., Dúran, M., Melo, P.S., Alves, O.L., Fávares, W.J., 2015. Interlab study on

669 nanotoxicology of representative graphene oxide. *J. Phys. Conf. Ser.* Doi:  
670 [10.1088/1742-6596/617/1/012019](https://doi.org/10.1088/1742-6596/617/1/012019).  
671

672 Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of  
673 environmental pollutants. *Environ. Health Persp.* 71, 47-58.

674 Gehrke, P.C., 1988. Acute Cardio-respiratory responses of Spangled Perch,  
675 *Leiopotherapon unicolor* (Gunther 1859), to sublethal concentrations of zinc,  
676 temephos and 2,4-D. *Aust. J. Mar. Fresh. Res.* 39, 767-774.  
677

678 Jastrzebska, A.M., Kurtyez, P., Olszyna, A.R., 2012. Recent advances in  
679 graphene family materials toxicity investigations. *J. Nanopart. Res.* DOI:  
680 10.1007/s11051-012-1320-8.  
681

682 Handy, R.D., Henry, T.B., Scon, T.M., Johnston, B. D.; Tyler, C. R. 2008a.  
683 Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish — a mechanistic  
684 analysis. *Ecotoxicology* 17, 396-409  
685

686 Handy, R.D., Von Der Kammer, F., Lead, J.R., Hasselov, M., Owen, R., Crane,  
687 M., 2008b. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles.  
688 *Ecotoxicology.* 17, 287-314.  
689

690 Handy, R.D., Al-Bairuty, G., Al-Jubory, A., Ramsden, C.S., Boyle, D., Shaw, B.J.,  
691 Henry, T.B., 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target  
692 organ and body systems physiology approach. *J. Fish Biol.* 79, 821–853.  
693

694 Hu, X., Zhou, Q., 2013. Health and ecosystem: risks of graphene. *Chem. Rev.*  
695 113, 3815-3835.  
696

697 Kashiwada, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the See-throught Medaka  
698 (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Persp.* 114, 1697-1702.  
699

700 Kim, K., Edgington, A.J., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.D., 2009. Influence of  
701 multiwalled carbon nanotubes dispersed in natural organic matter on speciation  
702 and bioavailability of copper. *Environ. Sci. Technol.* 43, 8979-8984

703

704 Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T., Handy, R.D., Lyon, D.Y.,  
705 Mahendra, S., Mclaughlin, M.J., Lead, J.R., 2009. Nanomaterials in the  
706 environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27,  
707 1825–1851.

708

709 Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A., Stark, W.J. 2007.  
710 Nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition  
711 and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4158-4163.

712

713 Ma, K., Zhang, S., Ye, B., Ouyang, J., Yue, G.H., 2016. A new view of graphene  
714 oxide biosafety in a water environment using an eatable fish as a model. *RSC*  
715 *Adv.* 6, 29619.

716

717 Martinez, D.S.T., Alves, O. L., Barbieri, E., 2013. Carbon nanotubes enhanced  
718 the lead toxicity on the freshwater fish. *J. Phys. Conf. Ser.* 429, 1–8.

719

720 McRae, J.K., Gaw, S., Glover, C. N., 2016. Mechanisms of zinc toxicity in the  
721 galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 179, 184-190.

722

723 Mesaric, T., Gambardella, C., Milivojevic, T., Faimali, M., Drobne, D., Falugi, C.,  
724 Makovec, D., Jemec, A., Sepcic, K., 2015. High surface adsorption properties of  
725 carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition,  
726 and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. *Aquat. toxicol.* 163, 121-129.

727

728 Nilsson, G.E.; Dymowska, A.; Steck, A.W. 2012. New insights into the plasticity  
729 of gill structure. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 214-222.

730

731 Nurunnabi, M., Parvez, K., Nafiujjaman, M., Revuri, V. Khan, H.A., Feng, X., Lee  
732 Y., 2015. Bioppllication of graphene oxide derivate: drug/ gene delivery, imaging,  
733 polymeric modification, toxicology, therapeutics and challenges. *RSV Adv.* 5,  
734 42141.

735

736 Paschoalino, M.P., Marcone, G.P.S., Jardim, W.F., 2010. Os nanomateriais e a  
737 questão ambiental. *Quim. Nova.* 33, 421-430.  
738

739 Quina, F., 2004. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Quim.*  
740 *Nova.* 27, 1028–1029.  
741

742 Qu, R., Wang, X., Wang, Z., Wei, Z., Wang, L., 2014. Metal accumulation and  
743 antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to  
744 single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon  
745 nanotube. *J. Hazard. Mater.* 275, 89-98.  
746

747 Randall, D.J., Wright, P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish*  
748 *Physiol. Biochem.* 3, 107-120.  
749

750 Sanchís, J., Olmos, M., Vicent, P., Farré, M., Barceló, D. 2016. New insights on  
751 the influence of organic co-contaminants on the aquatic toxicology of carbon  
752 nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 50, 961-969.  
753

754 Santos, D.B., Barbieri, E., Bondioli, A.C., Melo, C.B., 2014 . Effects of lead in  
755 white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *O Mundo da*  
756 *Saúde.* 38, 16-23.  
757

758 Sellers, C.M., Heath, A.G., Bass, M. L., 1975. The effect of sublethal  
759 concentrations of copper and zinc on ventilatory activity, blood oxygen and pH in  
760 rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* 9, 401-408  
761

762 Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon  
763 nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ  
764 pathologies, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 82:94-109.  
765

766 Srivastava, N., Verma, H., 2009. Alteration in biochemical profile of liver and  
767 ovary in zinc-exposure fresh water murrel, *Channa punctatus* (Bloch). *J. Environ.*  
768 *Biol.* 30, 413-416.  
769

770 Sokolova, M.I., Lanning, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and  
771 temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate  
772 change. *Climate Res.* 37, 181-201.  
773

774 Tang, Y., Tian, J., Li, S., Xue, C., Xue, Z., Yin, D., Yu, S., 2015. Combined effects  
775 of graphene oxide and Cd on the photosynthetic capacity and survival of  
776 *Microcystis aeruginosa*. *Sci. Total Environ.* 532: 154-161  
777

778 Teshima, F.A., Ferreira, F.C., Cetra, M., 2015. Rarity status of endemic and  
779 vulnerable fish species in a Brazilian Atlantic Forest protected area. *Braz. J. Nat.*  
780 *Conserv.* 13, 67-73.  
781

782 Tonelli, F. M., Goulart, V. A., Gomes, K. N., Ladeira, M. S., Santos, A. K.,  
783 Lorençon, E., Ladeira, L.O., Resende, R. R., 2015. Graphene-based  
784 nanomaterials: biological and medical applications and toxicity. *Nanomedicine*  
785 (Lond.) 10, 2423-2450.  
786

787 de la Torre, F.R., Salibián, A., Ferrari, L. 2000. Biomarkers assessment in juvenile  
788 *Cyprinus carpio* exposed to waterborn cadmium. *Environ. Pollut.* 109, 277-282.  
789

790 Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahphong, S.,  
791 Jaritkhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates*  
792 *calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.* 121, 307-  
793 320  
794

795 Upadhyay, R.V., Soin, N., Roy, S.S., 2014. Role of graphene / metal oxide  
796 composites as photocatalysts, adsorbents and disinfectants in water treatment:  
797 a review. *R.S.C. Adv.* 4, 3823-3851  
798

799 Vijayavel, K., Balasubramanian, M.P., 2006. Changes in oxygen consumption  
800 and respiratory enzymes as stress indicators in an estuarine edible crab *Scylla*  
801 *serrata* exposed to naphthalene. *Chemosphere.* 63, 1523-1531.  
802

803 Wang, S., Sun, H., Tadé, A.M.O., 2013. Adsorptive remediation of environmental  
804 pollutants using novel graphene-based nanomaterials. Chem. Eng. J. 226, 336-  
805 347.

806

807 Wilkie, M.P. 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comp.  
808 Biochem. Physiol. 118A, 39-50.

809

810 Wong, S.W.Y., Leung, K.M.Y., Djuricic, A.B., 2013. A comprehensive Review on  
811 the aquatic toxicology of engineered nanomaterials. Rev. Nanosc. Nanotechnol.  
812 2, 79-105.

813

814 Yan, L., Feng, M., Liu, J., Wang, L., Wang, Z. 2016. Antioxidant defenses and  
815 histological changes in *Carassius auratus* after combined exposure to zinc and  
816 three multi-walled carbon nanotubes. Ecotox. Environ. Safe. 125, 61-71.

817

818 Yang, R.; Brauner, C.; Thurston, V.; Neuman, J.; Randall, D.J. 2000. Relationship  
819 between toxicant transfer kinetic process and fish oxygen consumption. Aquat.  
820 Toxicol, 48, 95-108.

821

822 Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2006. Ecotoxicologia aquática: Princípios e  
823 Aplicações. Editora Rima, São Carlos. 464 p.

824

825 Ziccardi, L., McArdle, M., Lowney, Y., 2008. The Ecological Effects Of  
826 Nanomaterials: A Focus On Aquatic Life. *Nano*. 3, 251-255

827

828 Zhao, G., Li, J., Ren, X., Chen, C., Wang, X., 2011. Few-layered Graphene oxide  
829 nanosheets as superior sorbents for heavy metal ion pollution management.  
830 Environ. Sci. Technol. 45, 10454-10462.

831

832 Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the aquatic  
833 environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation. Environ. Sci.  
834 Technol. 48, 9995-10009.

835



836 Zheng, J.L., Yuan, S.S., Wu, C.W., Li, W.Y. 2016. Chronic waterborne zinc and  
837 cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the  
838 liver of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 177, 261-268.

## Anexo 01:

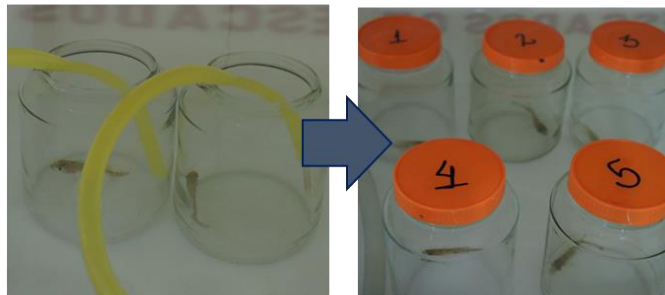
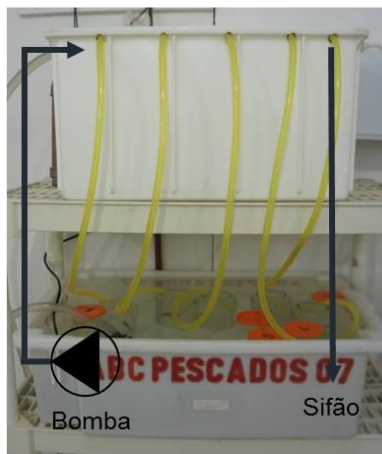
### Sistema para análise de consumo de oxigênio e excreção de amônia

#### Exposição:



- Aquários com 1 litro de água filtrada
- 5 peixes por tratamento
- Temperatura:  $20,5 \pm 0,5$  °C
- Tempo de exposição: 24 horas

#### Sistema: Circulação de água



**1 hora**  
Adaptação  
Circulação contínua de  
água

**1,5 hora**  
Respirômetros fechados

Coleta da amostra de  
água do respirômetro /  
sistema

#### Amostra de água:

Oxigênio dissolvido na água



Método de Winkler

Amônia presente na água



Método de Nessler



$$\frac{|\text{Diferença entre amostra inicial e final}|}{\text{Peso do peixe} + \text{Volume do respirômetro}}$$

↓

Consumo / Excreção específica

## Anexo 02: Análise estatística

### Análise comparativas dos grupos controle:

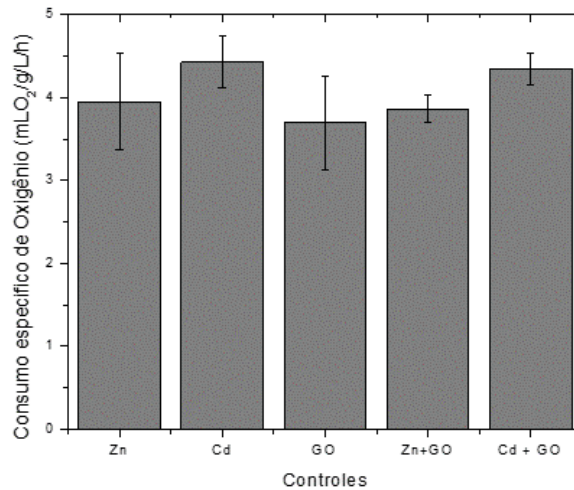


Figura 11 - Consumo específico de oxigênio (mL O<sub>2</sub>/g/h) comparando os 5 grupos controle efetuados em cada bateria de experimento. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios.

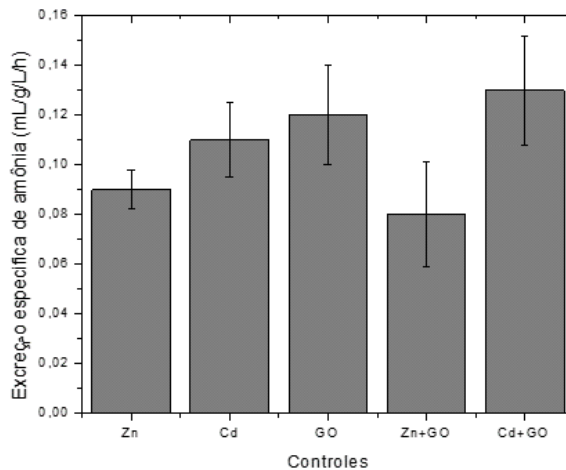


Figura 12 – Excreção específica de Amônia (mg/L/g/h) comparando os grupos controles efetuados em cada bateria do experimento. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios.

**Tabela resumo:**

<b>Consumo específico de oxigênio</b>					
Concentração (mg/L)	0,5	1,0	2,0	4,0	
Óxido de Grafeno (OG)			↓	↓	
Concentração (mg/L)	0,5	1,0	2,0	4,0	10,0
Zinco				↑	↑
Zinco + 1mg/L OG		↑	↑	↑	↓
Concentração (mg/L)	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
Cádmio			↓	↓	↓
Cádmio + 1 mg/L OG	↓	↓	↓	↓	↓

<b>Excreção específica de amônia</b>					
Concentração (mg/L)	0,5	1,0	2,0	4,0	
Óxido de Grafeno (OG)					
Concentração (mg/L)	0,5	1,0	2,0	4,0	10,0
Zinco			↑	↑	↑
Zinco + 1mg/L OG		↑	↑	↑	↓
Concentração (mg/L)	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
Cádmio					
Cádmio + 1 mg/L OG					

↑ = Aumento com diferença estatística com relação ao controle

↓ = Redução com diferença estatística com relação ao controle