

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

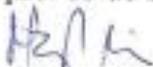


Dr. Antonio Fernando Gervásio Leonardo



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

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO GERAL	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	4
CAPÍTULO 01	10
RESUMO	11
ABSTRACT:	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS:	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
3. RESULTADOS	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
4. CONCLUSÃO	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
Anexo 01: Sistema para análise de consumo de oxigênio e excreção de amônia	42
Anexo 02: 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 sp² 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 ^a, Diego Stefani Teodoro Martinez ^b, Oswaldo Luiz Alves^c,
6 Edison Barbieri ^{d*}

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

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

12 ^c Laboratório de Química de Estado Sólido (LQES), Instituto de Química,
13 UNICAMP, Campinas-SP.

14 ^d 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 ZnCl₂
194 e CdCl₂ (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 ($\text{mLO}_2/\text{g/L/h}$) 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

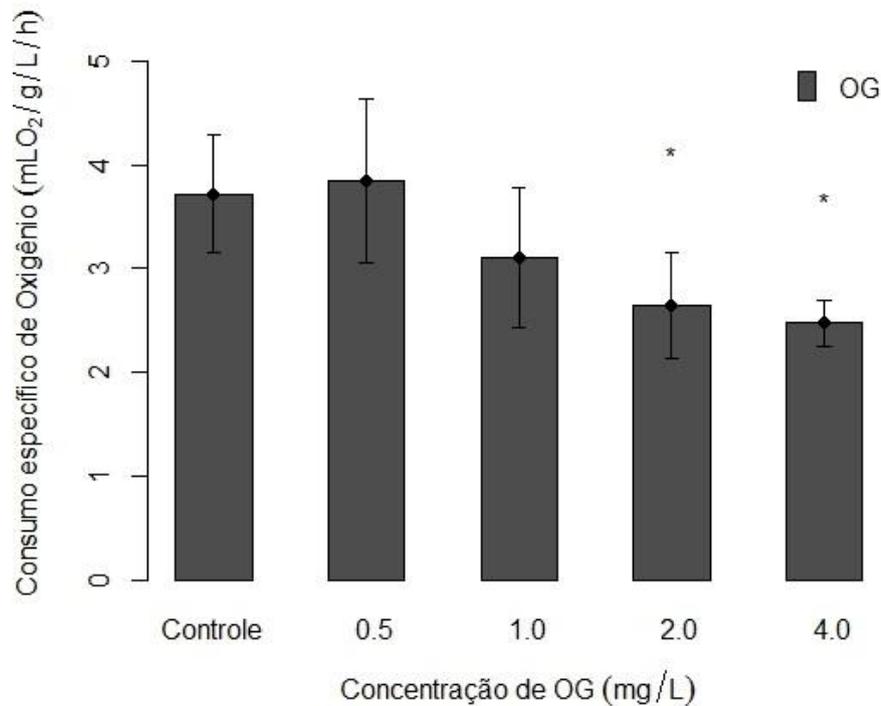
295

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

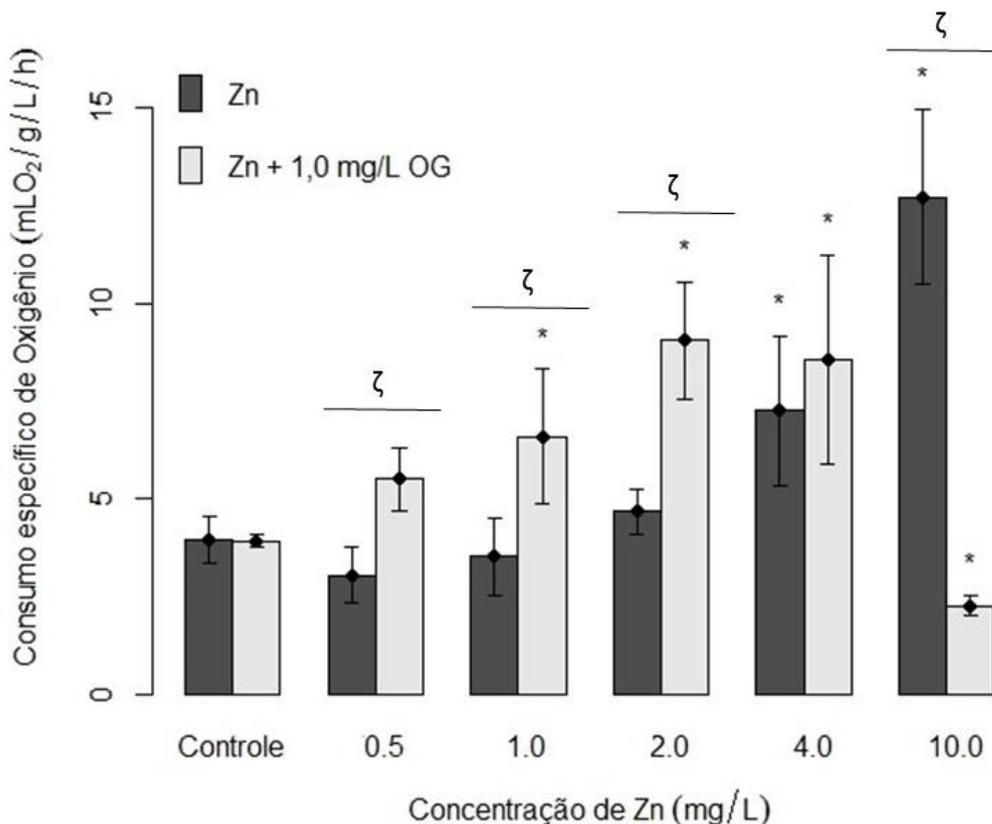
314

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

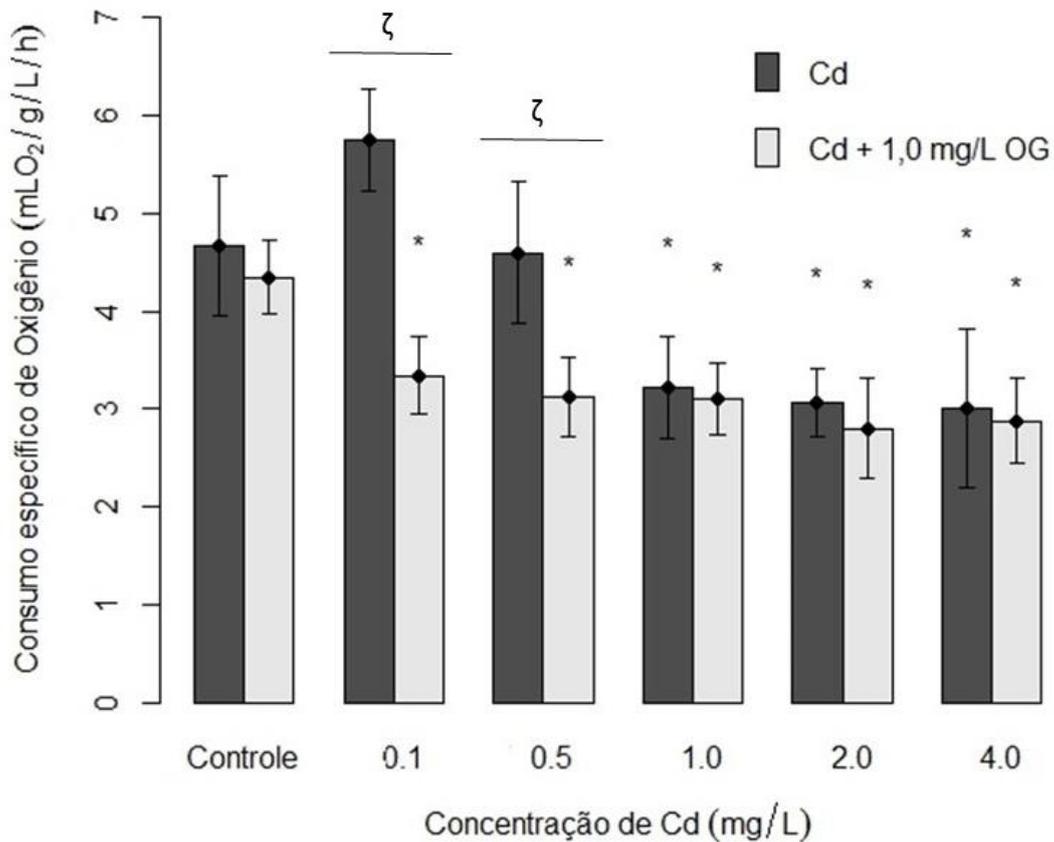
Figura 2: Consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) em relação a concentração de Zn e Zn + 1,0 OG (mg/L). As colunas representam as médias e as barras são os respectivos desvios padrões (n=5). O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatísticas significativas em relação ao controle. 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.

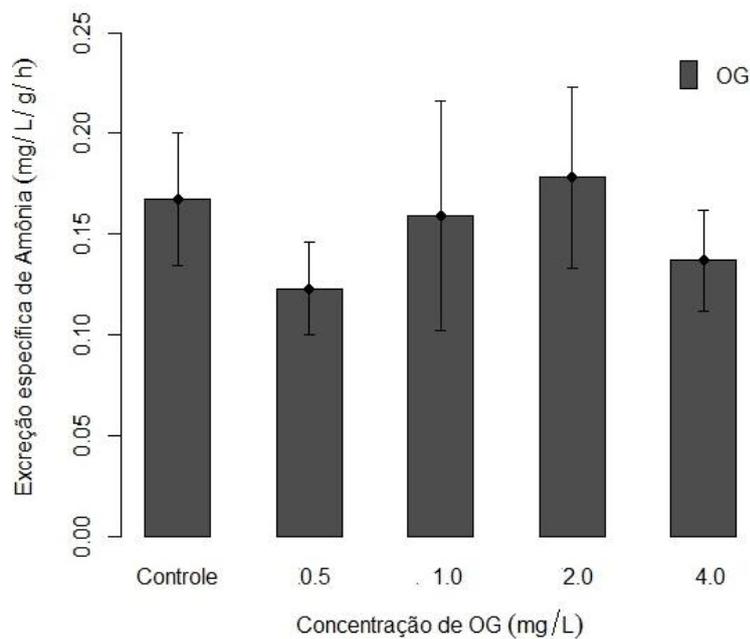
336

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

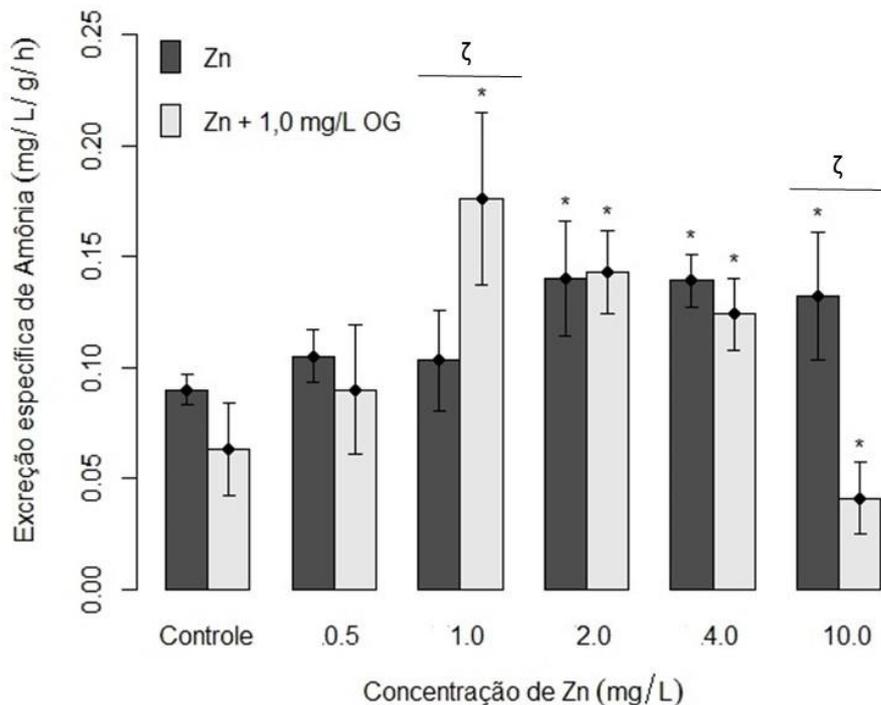
346 Os resultados obtidos para a excreção de amônia em relação ao aumento
347 das concentrações de Zn foram evidenciados por uma tendência de elevação
348 das taxas em relação ao controle. Entretanto, ao empregar o teste estatístico
349 somente as concentrações de 2,0; 4,0 e 10,0 mg/L foram diferentes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



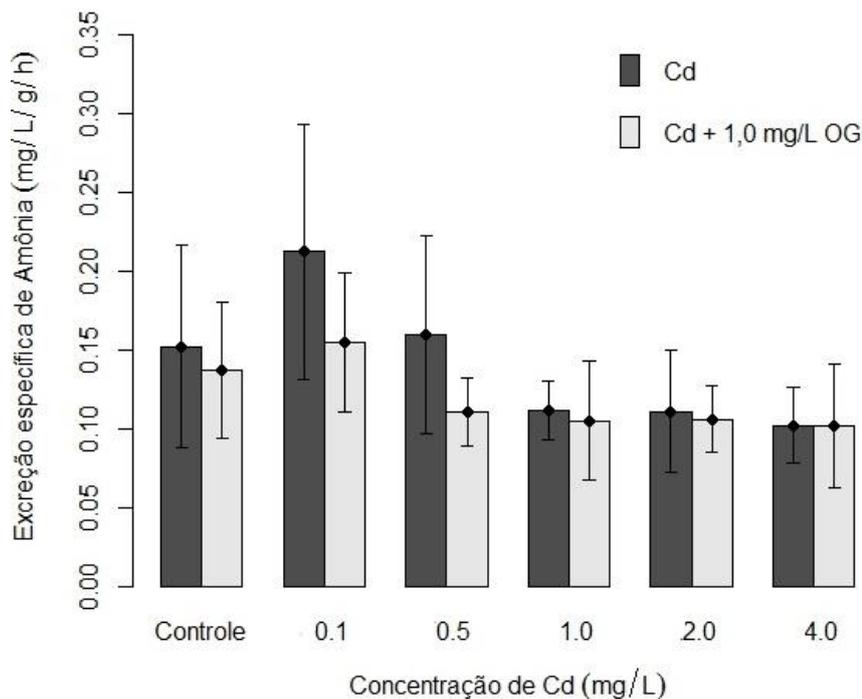
362

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

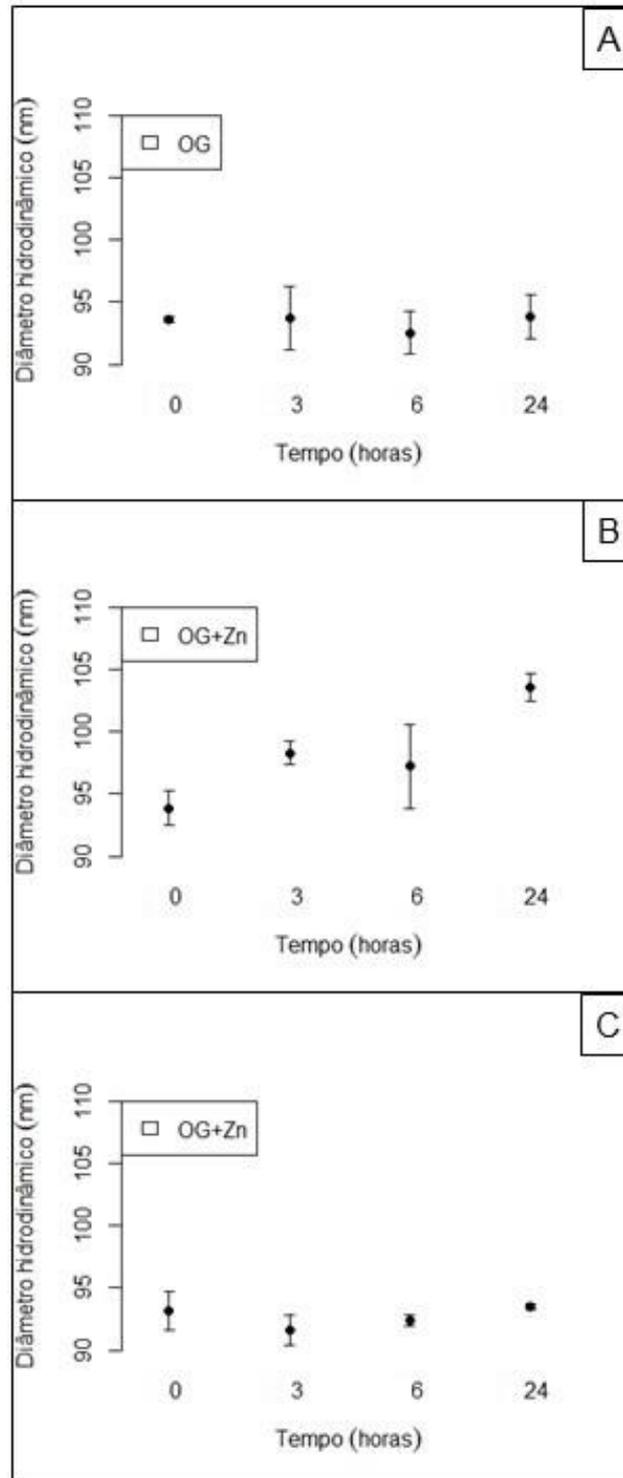
377 3.3. Diâmetro hidrodinâmico e morfologia do Óxido de Grafeno

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+Cd (B) e OG+Zn (C) ao longo de 24 horas na água de torneira previamente filtrada. Os testes foram conduzidos em triplicata.

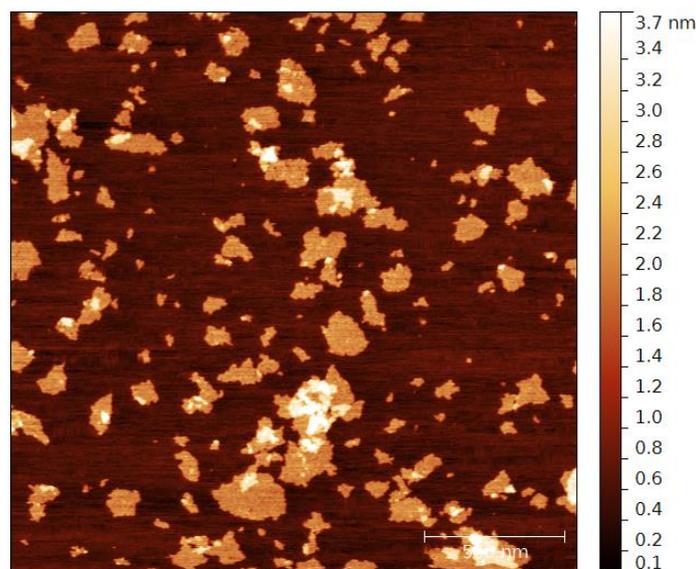
388 A carga superficial do grafeno na solução, mensurada pelo potencial Zeta,
389 está apresentado na tabela 1. Os valores encontrados, em módulo, maiores que
390 30 indicam uma boa dispersão no meio. Em relação ao GO, a combinação
391 Zn+OG aumentou os valores negativos encontrados, o que sugere uma
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 (HNO₃-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 HNO₃-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 NH₃ (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⁺/NH₄, 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⁺, K⁺) –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 Cd²⁺. 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., Djuriscic, 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:

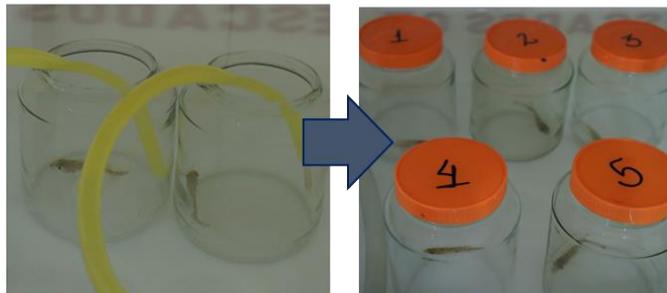
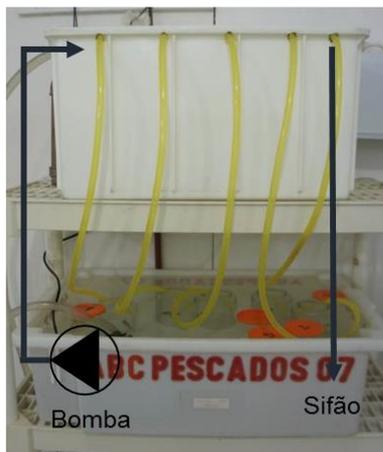
Sistema para análise de consumo de oxigênio e excreção de amônia

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:

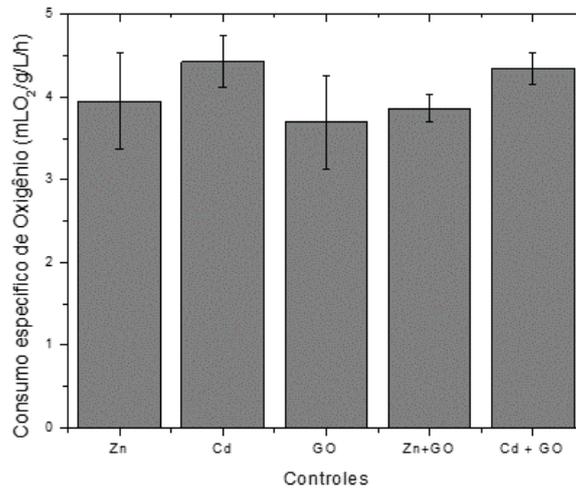


Figura 11 - Consumo específico de oxigênio (mL_O₂/g/h) comparando os 5 grupos controle efetuados em cada bateria de experimento. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios.

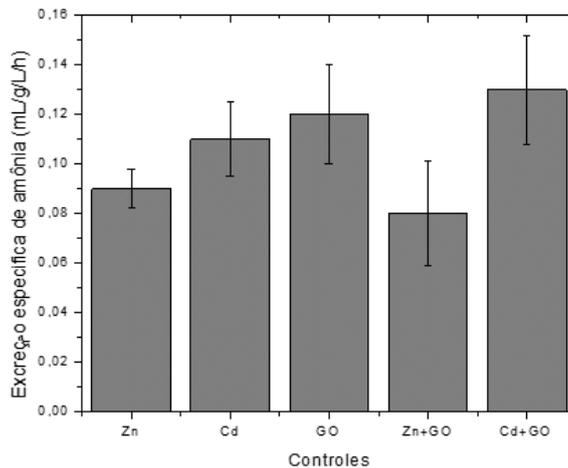


Figura 12 – Excreção específica de Amônia (mg/L/g/h) comparando os grupos controles efetuados em cada bateria do experimento. As colunas representam as médias (n=5) e as barras são os respectivos desvios.

Tabela resumo:

Consumo específico de oxigênio					
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	↓	↓	↓	↓	↓

Excreção específica de amônia					
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