



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 DA INTERAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO COM CÁDMIO E ZINCO NO
CONSUMO DE OXIGÊNIO E EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO *Palaemon
pandaliformis* (STIMPSON, 1871) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE)**

Camila Batista de Melo

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

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

**São Paulo
Novembro-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 DA INTERAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO COM CÁDMIO E ZINCO NO
CONSUMO DE OXIGÊNIO E EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO *Palaemon
pandaliformis* (STIMPSON, 1871) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE)**

Camila Batista de Melo

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

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

**São Paulo
Novembro-2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

M528e

Melo, Camila Batista

Efeitos da interação do óxido de grafeno com cádmio e zinco no consumo de oxigênio e excreção de amônia do *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) / Camila Batista Melo. – São Paulo, 2016. ix, 85f. ; il. ; graf. ; 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. Óxido de grafeno. 2. Nanoecotoxicologia. 3. Toxicidade aguda. 4. Consumo de Oxigênio. 5. Excreção de amônia. 6. Palaemon pandaliformis. I. Barbieri, Edison. II. Título.

CDD 574.64



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 DA INTERAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO COM CÁDMIO E ZINCO NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE)”

AUTOR: Camila Batista Melo

ORIENTADOR: Edison Barbieri

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

Prof. Dr. EDISON BARBIERI

Profa. Dra. ANA JULIA F. CARDOSO DE OLIVEIRA

Profa. Dra. MÁRIA LETIZIA PETESSE

Data da realização: 10 de novembro de 2016

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Edison Barbieri

Agradecimentos

Agradeço à minha princesa, Ana Carolina, que está sempre ao meu lado, mantendo o meu ritmo e sintonia com o novo e a vida. Você é um presente divino e isso me faz acreditar que o amanhã será sempre melhor.

À minha família, especialmente à minha mãe, que sempre confiou nas minhas escolhas e que me apoia e me fortalece através de sua força e amor.

Ao Dr. Edison Barbieri, que me orientou com sabedoria e de contribuição fundamental do início ao fim deste projeto.

Ao Dr. Danilo Koetz Calazans, meu primeiro orientador, que me ensinou a amar a ciência e o ambiente acadêmico. Você é um amigo especial e essencial na minha história pessoal e profissional. Nossas conversas mais simples foram as mais profundas que se tornaram presentes eternos e que influenciam a minha vida diariamente.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Pesca de São Paulo, em especial aos coordenadores do curso e ao Ocimar, que trabalham bastante para garantirem o nosso sucesso. Fazer mestrado com o suporte de vocês fez toda diferença.

Aos professores e aos colegas de mestrado do Instituto de Pesca, que enriqueceram cada disciplina com suas individualidades, conhecimentos e amizade. Foi uma honra e alegria ter conhecido e aprendido com todos vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa DS concedida.

Aos membros da banca de qualificação e de dissertação, Dra. Karina Fernandes Oliveira Rezende, Dr. Marcelo Henriques, Dra. Ana Júlia Cardoso F. de Oliveira e Dra. Maria Letizia Petesse, por suas sugestões e críticas construtivas que contribuíram para elevar a qualidade deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador de estágio docência, Msc. Jorge Luis Santos, assim como aos alunos da Universidade Santa Cecília, que me receberam com carinho e respeito. Gostei muito da experiência de aprender a dar aulas com vocês.

Aos coautores desta dissertação, em especial à Francine, sempre muito presente no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que contribuíram para a realização deste projeto de forma direta e indireta. Em especial, ao Brian, Martha, Seamus, Bianca, Dominique, Tina, Tauá e Ceci que se tornaram grandes amigos e que cuidaram tão bem da Ana Carolina durante parte dos meus experimentos. À Ana e à Maria Luiza, nossas amigas em Santos que também nos deram suporte através de sua amizade e cuidados. A Ana Carolina e eu aprendemos e nos divertimos muito com todos vocês.

À Neide, meu anjo da guarda em Cananéia e que tem um lugar especial no meu coração. Ao Sr. Waldemar, que sempre nos acolheu e acolhe quando voltamos à Cananéia.

A todos da comunidade da Reserva Extrativa do Mandira que me receberam e auxiliaram nas coletas de campo. Vocês me ensinaram a reconectar com o tempo da natureza.

Ao Sr. Toninho, na época ainda motorista do Instituto de Pesca, que sempre me levou às coletas de campo com toda a sua tranquilidade e bom humor, garantindo a continuidade dos meus experimentos.

Agradeço hoje e sempre a Deus, Sabedoria e Amor Superiores, que me protege e que flui através de mim a cada momento de todos os dias.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	iii
Índice de Tabelas e Figuras.....	vi
Resumo Geral.....	viii
General Abstract.....	ix
Introdução Geral.....	1
Objetivo Geral.....	5
Referências Bibliográficas.....	6
Capítulo 1 – Efeitos da interação do Óxido de Grafeno (GO) com cádmio e zinco no consumo de oxigênio e excreção de amônia do <i>Palaemon pandaliformis</i> (Stimpson, 1871) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae).....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
1. Introdução.....	17
2. Materiais e Métodos.....	22
2.1. Caracterização do GO.....	22
2.2. Coleta e manutenção dos camarões.....	22
2.3. Reagentes Químicos.....	24
2.4. CL ₅₀	24

2.5.	Consumo Específico de Oxigênio.....	25
2.6.	Excreção Específica de Amônia.....	26
2.7.	Análises Estatísticas.....	26
3.	Resultados.....	27
3.1.	GO (AFM).....	27
3.2.	CL ₅₀ e letalidade dos indivíduos.....	28
3.3.	Consumo Específico de Oxigênio.....	33
3.3.1.	GO.....	33
3.3.2.	Cd.....	34
3.3.3.	Cd + GO.....	35
3.3.4.	Zn.....	36
3.3.5.	Zn + GO.....	37
3.4.	Excreção Específica de Amônia.....	38
3.4.1.	GO.....	38
3.4.2.	Cd.....	39
3.4.3.	Cd + GO.....	40
3.4.4.	Zn.....	41
3.4.5.	Zn + GO.....	42
4.	Discussão.....	43
5.	Conclusões.....	52
6.	Agradecimentos.....	53
7.	Referências Bibliográficas.....	54

Considerações Finais.....	68
Apêndice.....	69

Índice de Tabelas e Figuras

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ de <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao Óxido de Grafeno, n=30. Os valores são as médias das triplicatas. Toxicidade Não Detectada pelo Método (TNDM).....	28
Tabela 2. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ de <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao Cádmio, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.....	29
Tabela 3. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ de <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao Cádmio + 1,0 mg.L ⁻¹ de GO, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.....	30
Tabela 4. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ de <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao Zinco, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.....	31
Tabela 5. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ de <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao Zinco + 1,0 mg.L ⁻¹ de GO, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.....	32
Figura 1: Mapa de localização da Reserva do Mandira. Fonte: ICMBio – Plano de Manejo Participativo Reserva Extrativista do Mandira Cananeia/São Paulo, 2010.....	23
Figura 2. Imagem de topografia do Óxido de Grafeno por AFM.....	27
Figura 3. Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de GO. Barras são os respectivos desvios padrões.....	33
Figura 4. Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Cd. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	34
Figura 5. Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Cd + GO. Barras são os respectivos desvios padrões.....	35
Figura 6. Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Zn. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	36
Figura 7. Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Zn + GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	37

Figura 8. Média da excreção específica de amônia em relação à variação da concentração de GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	38
Figura 9. Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Cd. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	39
Figura 10. Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Cd + GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	40
Figura 11. Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Zn. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	41
Figura 12. Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Zn + GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L ⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.....	42

RESUMO GERAL

As várias aplicabilidades dos nanomateriais (NMs) vêm sendo rapidamente desenvolvidas e exploradas nas últimas décadas. No entanto, estudos para diagnosticar e diminuir seus potenciais impactos ao ecossistema aquático não acompanham o mesmo ritmo. São vários os fatores bióticos e abióticos no meio aquático que podem influenciar os fatores físico-químicos, destino e efeitos dos NMs. Conseqüentemente, a biodisponibilidade dos NMs pode ser alterada quando eles interagem com outros elementos orgânicos e inorgânicos, incluindo os sais minerais presentes no sistema aquático. O cádmio (Cd) e o zinco (Zn) são elementos-traço (ETs), provenientes de fontes naturais e antropogênicas, que podem ser tóxicos se disponibilizados em condições específicas. O Óxido de Grafeno (GO) é um NM potencialmente tóxico e de diversas aplicações, dentre elas a remoção de contaminantes de efluentes industriais e urbanos, assim a como remediação ambiental. A crescente demanda e conseqüente descarte deste NM no meio aquático induziram à necessidade de avaliar os potenciais efeitos adversos do GO sobre a biota, assim como os efeitos da sua interação com outros poluentes. Neste trabalho foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos do GO, isoladamente e associado ao Cd e ao Zn, através dos testes de toxicidade aguda e de metabolismo de rotina do *Palaemon pandaliformis*. Popularmente conhecido como camarão fantasma, o *P. pandaliformis* é um carídeo osmorregulador encontrado em ambientes costeiros sujeitos a constantes variações ambientais e de fácil manutenção em laboratório. Neste estudo, foram observados os efeitos tóxicos do GO e de sua interação com o Cd e o Zn através de testes de toxicidade aguda e de metabolismo de rotina.

Palavras chave: Óxido de Grafeno, nanoecotoxicologia, toxicidade aguda, consumo de oxigênio, excreção de amônia, *Palaemon pandaliformis*.

GENERAL ABSTRACT

Several applicability of nanomaterials (NMs) have been rapidly developed and exploited in recent decades. However, studies to diagnose and reduce potential impacts to the aquatic ecosystem do not follow the same pace. A number of biotic and abiotic factors in the aquatic environment can affect the physicochemical, fate and effects of NMs. Therefore, the bioavailability of NMs may change when they interact with other organic and inorganic components, including the minerals that are in the water system. Cadmium (Cd) and zinc (Zn) are trace elements (TEs) from natural and anthropogenic sources, which may be toxic if available under specific conditions. The graphene oxide (GO) is a potentially toxic NM and several applications, among them the removal of industrial and urban wastewater contaminants, as well as the environmental remediation. The increasing demand and consequent disposal of this NM in the aquatic environment induced to the need to assess the potential adverse effects of GO on the biota, as well as the effects of its interaction with other pollutants. This study evaluated the possible toxic effects of GO alone and associated with the Cd and Zn, via acute toxicity and routine metabolism tests in *Palaemon pandaliformis*. Popularly known as ghost shrimp, *P. pandaliformis* is an osmoregulator caridea present in coastal environments subjected to constant environmental changes and easy to maintain in laboratory. It was observed, in this study, the toxic effects of GO and its interaction with Cd and Zn through acute toxicity and routine metabolism tests.

Keywords: Graphene Oxide (GO), nanoecotoxicology, acute toxicity, oxygen consumption, ammonia excretion, *Palaemon pandaliformis*.

INTRODUÇÃO GERAL

Os nanomateriais (NMs) são materiais com pelo menos uma dimensão menor que 100 nm (Klaine et al., 2008) e dentro deste grupo estão as nanopartículas (NPs), que apresentam diâmetro menor que 100 nm (BOWMAN et al., 2010; LÖVESTAM et al., 2010). As NPs podem ser classificadas quanto à sua origem (naturais ou manufacturados), composição e propriedades físicas e químicas (BOWMAN et al., 2010; BUZEA et al., 2008).

As NPs naturais são originadas de uma grande variedade de processos geológicos e biológicos, estando presentes no meio ambiente desde a formação do planeta (BUZEA et al., 2008; LOWRY e CASMAN, 2009). Apesar dos organismos e do ser humano terem evoluído em ambientes contendo NPs, essa exposição aumenta a cada ano com a sua progressiva produção antropogênica (HANDY et al., 2008). Conseqüentemente, o crescente descarte de nanopartículas manufacturadas (NPMs) em ambientes naturais deve ser avaliado, uma vez que há amplo interesse e exploração de seu potencial econômico, tecnológico e científico (GEIM e NOVOSELOV, 2007; JOHNSTON et al., 2013; KLAINE *et al.*, 2008; SCHULTZ et al., 2014, CAMPOS-GARCIA et al., 2016). As NPMs podem interagir com uma grande variedade de elementos químicos orgânicos e inorgânicos (maiores, menores e traço) no meio aquático, no entanto, deve-se considerar que as NPMs também apresentam enorme variedade de composição física e química e, conseqüentemente, diferentes propriedades toxicológicas (BAALOUSHA et al., 2011; HE et al., 2014; JOHNSTON et al., 2013; MOORE, 2006).

As NPs podem ser classificadas como orgânicas e inorgânicas, e dentre as orgânicas, encontra-se a família dos grafenos, que são NPMs alótropas do carbono (BAALOUSHA et al., 2011; LOWRY e CASMAN, 2009). O Grafeno é um NM bidimensional com espessura monoatômica de átomos de carbono com hibridização sp^2 (BOEHM *et al.*, 1994). Cada átomo de carbono está ligado a outros três átomos de carbono formando anéis planos hexagonais ligados entre si por ligações sigma (σ), garantindo-lhe dureza ainda não observada em qualquer outro material (BOEHM et al., 1994; CHOI et al., 2010). Este NM apresenta elevada área superficial, elevada transmitância óptica, estabilidade química e térmica, é extremamente forte, leve e

flexível, além de ser excelente condutor de calor e eletricidade (GEIM, 2009; GEIM e NOVOSELOV, 2007; NOVOSELOV et al., 2005, 2004). Entre os NMs da família do grafeno encontram-se: grafeno, nanofolhas de grafeno, grafite ultrafino, óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido (SANCHEZ et al., 2012). As propriedades deste NM têm gerado enorme interesse científico e industrial em suas várias aplicações: nano eletrônica, condutor de polímeros, eletrodo de bateria, supercapacitor, impermeabilidade, tinta de impressão, folha antibacteriana, farmacêutica, biomedicina e meio ambiente (CHOI et al., 2010; CHOWDHURY et al., 2013; CHUNG et al., 2013; DURÁN et al., 2015b; RUOFF, 2008; STANKOVICH et al., 2006; WU et al., 2012).

Fatores abióticos como pH, composição química e dureza da água, assim como a presença de matéria orgânica suspensa e dissolvida podem alterar as propriedades físicas, químicas e de reatividade dos NMs no meio aquático (BATLEY et al., 2013; HANDY et al., 2008a; KLAINE et al., 2008; MARTINEZ et al., 2013). Ao serem comparadas com macropartículas de mesma composição química, as NPs apresentam maior superfície de contato e reatividade química, podendo atenuar ou aumentar sua toxicidade e biodisponibilidade (AQUINO NETO et al., 2011; HANDY et al., 2008b; MOURA et al., 2011; OWEN e HANDY, 2007).

Sabe-se muito pouco sobre os potenciais riscos e impactos ecotoxicológicos dos NMs ao meio aquático (ARTAL et al., 2013; COLVIN, 2003; MARTINEZ et al., 2013; MAUTER e ELIMELECH, 2008). As propriedades físicas, químicas e de reatividade dos NMs modificam-se de acordo com a variação do seu tamanho, trazendo várias questões ainda não respondidas sobre os reflexos das inter-relações químicas, biológicas e toxicológicas quando o meio ambiente é exposto aos materiais em escala nano (BURDA et al., 2005; DURÁN et al., 2015a; HANDY et al., 2008b; MARTINEZ et al., 2013). Neste sentido, tornou-se imprescindível entender o destino e a interação dos NMs manufaturados com outros poluentes, assim como são assimilados, distribuídos e excretados pelos organismos que integram os ecossistemas aquáticos.

Os sistemas aquáticos apresentam composição química complexa, visto que a maioria contém quase todos os elementos da tabela periódica, mais uma extensa variedade de matéria orgânica e inorgânica dissolvida e particulada (GAFFNEY, et al., 1996; GUILHERME et al., 2005, MOHAN et al., 1993; ROGERS, 1993). Os elementos-traço (ETs) estão naturalmente presentes nos ambientes aquáticos em

concentrações muito baixas, mas que em condições específicas, visto que são suscetíveis a diversas interações bióticas e abióticas, podem ser tóxicos e afetar a qualidade da água e destes ecossistemas (KABATA-PENDIAS, 2010; POLETO e MERTEN, 2007; SOUZA et al., 2016). Os ETs integram e interagem em diferentes compartimentos biogeoquímicos, portanto sua toxicidade é determinada não apenas por sua concentração, mas também pelo tempo de exposição, mobilidade, biodisponibilidade e assimilação (absorção, adsorção e sorção) biótica e abiótica (GUILHERME et al., 2016; KABATA-PENDIAS, 2010; POLETO e MERTEN, 2007; RAINBOW, 1997).

Os ambientes costeiros e estuarinos exercem papel essencial nos ciclos biogeoquímicos de vários ETs essenciais e não essenciais (sem função biológica), influenciando seus processos físico-químicos (espeiação química e sedimentação) e biológicos (bioalteração, bioacumulação e biomagnificação) (COSTA, et al., 2012; STEFANIDOU et al., 2006). Estas áreas são suscetíveis às dinâmicas dos processos de interação entre os elementos químicos orgânicos e inorgânicos de origens fluviais, pluviais e marinhas, além de serem utilizadas como receptoras de lixo e escoamentos agrícolas, industriais e urbanos (COSTA et al., 2012; GUILHERME et al., 2005; KHAN et al., 2014; MANCE, 2012; SOUZA et al., 2016; XU et al., 2013). Consequentemente, os ecossistemas estuarinos e costeiros recebem e dissipam os ETs provenientes de suas áreas adjacentes (terrestre, fluvial e marinha) e também são fontes destes mesmos elementos para as áreas marinhas (KENNISH e FERTIG, 2012; MOORE, 2006). Estes ambientes são vitais para a produção primária e para uma grande variedade de espécies, em pelo menos uma fase do ciclo de vida (BRICKER et al., 2008; DUGAN, 1992; ELLISON, 2001, KHAN et al., 2014).

Kahru e Dubourquier (2010) avaliaram dados de toxicidade aguda (C(D)L₅₀) de NPs sintéticas e concluíram que os crustáceos e as algas foram os grupos de organismos mais sensíveis e, provavelmente, os mais vulneráveis às NPs. Baun et al. (2008) destacaram a importância de se estudar crustáceos em testes de nanoecotoxicidade, visto que são os mais numerosos em espécies e de grande importância ecológica em ampla variedade de ambientes: água doce, marinho e terrestre. Portanto, em avaliações nanoecotoxicológicas, os crustáceos são considerados bioindicadores importantes para a avaliação de potenciais riscos tanto

dos ambientes aquáticos quanto terrestres (BAUN et al., 2008; KAHRU e DUBOURGUIER, 2010; RINDERHAGEN et al., 2000).

A toxicidade pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a concentração, o tempo de exposição, a interação da espécie química com outros elementos, bem como outros vários fatores biológicos dos espécimes estudados (HEUGENS et al., 2001; JAISHANKAR et al., 2014). Ao avaliar respostas tóxicas, o poluente deve estar biodisponível, ou seja, ele deve atingir e interagir primeiramente com o seu local de ação biomolecular, propiciando reações ao nível molecular, podendo continuamente ser seguida de respostas nos tecidos, nos órgãos, no indivíduo, na população e na comunidade (SCHOETTGER, 1996; USEPA, 2002).

Os camarões de água doce da família Palaemonidae, *Palaemon pandaliformis*, são popularmente conhecidos como camarões fantasma ou potitinga (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1989). Estes carídeos osmorreguladores de pequeno porte são encontrados em águas costeiras desde a região sul do Brasil até a Guatemala (ROSA et al., 2015). Apresentam significativa importância ecológica por estarem associados à ciclagem de nutrientes e por serem recurso alimentar de peixes e aves que habitam ou migram para os ambientes em que são encontrados (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1999; FERREIRA et al., 2010). Os espécimes de *P. pandaliformis* usados nos experimentos deste estudo foram coletados na região de mangue da Reserva Extrativista do Mandira.

A Reserva Extrativista do Mandira encontra-se na porção continental oeste do município de Cananéia e faz parte do complexo estuarino lagunar Iguape-Cananeia-Paranaguá, considerado pela IUNC (União Internacional de Conservação da Natureza) como o terceiro estuário do mundo em produtividade primária (ADAIME, 1985). Este complexo é formado por extensas áreas de manguezais influenciadas pelo influxo de água doce e de marés interiores, com amplitude de dois metros (BESNARD, 1950; DE SALES e MOREIRA, 1996; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990). A temperatura média anual é de 23,8 °C e a salinidade pode chegar a 30‰, que varia em função do período de maré e da descarga fluvial e pluvial (BESNARD, 1950; CUNHA-LIGNON, 2009; PEREIRA et al., 2001). Os mangues são característicos de zonas tropicais e subtropicais, com substratos lamosos e hidrodinâmica influenciada por marés, ou seja, são inundados por águas estuarinas e

marinhas na maré alta e por águas fluviais na maré baixa (LINGON, 2005). É um ambiente que constantemente disponibiliza matéria orgânica, nutrientes e elementos químicos ao ecossistema (KHAN et al., 2014; PEREIRA et al., 2001; POLETO et al., 2009).

Os resultados desta dissertação foram apresentados em um capítulo, no formato de um artigo científico, como descritos a seguir:

CAPÍTULO 1: “Efeitos da interação do Óxido de Grafeno (GO) com Cádmio e Zinco no consumo de oxigênio e excreção de amônia do *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae)”, redigido de acordo com as normas da revista Chemosphere.

Neste capítulo foram avaliadas a toxicidade aguda e as alterações do metabolismo de rotina através do consumo de oxigênio e excreção de amônia dos camarões *Palaemon pandaliformis* ao serem expostos a diferentes concentrações de Óxido de Grafeno e da associação deste com Cd e Zn, por períodos de tempo determinados.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos tóxicos do GO assim como a influência do GO sobre a toxicidade do Cd e do Zn, e de que forma a interação entre estes contaminantes pode ser detectada através dos testes de toxicidade aguda, do consumo específico de oxigênio e da excreção específica de amônia utilizando o *Palaemon pandaliformis* como espécie indicadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIME, R.R. 1985. Produção do bosque de mangue da Gamboa Nóbrega (Cananéia, 25^o Lat. S-Brasil). Tese doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico.
- AQUINO NETO, S.; FORTI, J.C.; ZUCOLOTTI, V.; CIANCAGLINI, P.; DE ANDRADE, A.R. 2011. Process Biochemistry, 46(12): 2347-2352.
- ARTAL, M.C.; HOLTZ, R.D.; KUMMROW, F.; ALVES, O.L.; UMBUZEIRO, G.A. 2013. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similis*. Environmental Toxicology Chemistry, 32(4): 908-12.
- BAALOUSHA, M.; JU-NAM, Y.; LEAD, J.R. 2011. Natural colloids and engineered nanoparticles. In *Treatise on Water Science*. Frimmel F., Volume III: 2-41.
- BATLEY, G.E.; KIRBY, J.K.; McLAUGHLIN, M.J. 2013. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. Accounts of Chemical Research, 46(3): 854-862.
- BAUN, A. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology, 17(5): 387-395.
- BESNARD, W. 1950. Considerações gerais em torno da região lagunar de Cananéia: Iguape. II – Diversos aspectos atuais da região lagunar. Boletim do Instituto Paulista de Oceanografia, 1(2): 3-28.
- BOEHM, H.P.; SETTON, R.; STUMPP, E. 1994. Nomenclature and terminology of graphite intercalation compounds (IUPAC Recommendations 1994). Pure and Applied Chemistry, 66(9):1893-1901.
- BOND-BUCKUP, G. e BUCKUP, L. 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). Revista Brasileira de Biologia, 49(4): 883-896.

BOND-BUCKUP, G. e BUCKUP, L. 1999. Caridea (píius, camarões de água doce e marinhos). In *Os Crustáceos do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Ed. Universidade ,p. 300-318.

BOWMAN, D.; D'SILVA, J.; GEERT, V.C. 2010. Defining nanomaterials for the purpose of regulation within the European Union. *Eur. J. Risk Reg.*, 115pp.

BRICKER, S.B.; LONGSTAFF, B.; DENNISON, W.; JONES, A.; BOICOURT, K.; WICKS, C.; WOERNER, J. 2008. Effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries: a decade of change. *Harmful Algae*, 8(1): 21-32.

BURDA, C.; CHEN, X.; NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M.A. 2005. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews*, 105(4): 1025-1102.

BUZEA, C.; PACHECO, B.I.I.; ROBBIE, K. 2008. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4): MR17-MR71.

CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D.S.T.; REZENDE, K.F.O.; DA SILVA, J.R.M.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 481-488.

CHOI, W.; LAHIRI, I.; SEELABOYINA, R.; KANG, Y.S. 2010. Synthesis of graphene and its applications: a review. *Critical Reviews on Solid State and Materials Sciences*, 35(1): 52-71.

CHOWDHURY, I.; DUCH, M.C.; HERSAM, M.C.; BOUCHARD, D. 2013. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 47(12):6288-6296.

CHUNG, C.; KIM, Y.; SHIN, D.; RYOO, S.; HONG, B.H.; MIN, D. 2013. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Accounts of Chemical Research*, 46(10): 2211-2224.

COLVIN, V.L. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21(10): 1166-1170.

COSTA, M.F.; LANDING, W.M.; KEHRIG, H.A.; BARLETTA, M.; HOLMES, C.D.; BARROCAS, P.R.G.; EVERS, D.C.; BUCK, D.G.; VASCONCELLOS, A.C.; HACON,

- S.S.; MOREIRA, J.C.; MALM, O. 2012. Mercury in tropical and subtropical coastal environments. *Environmental Research*, 119: 88-100.
- CUNHA-LIGNON, M.; MENGUINI, R.P.; SANTOS, L.C.; NIEMEYER-DINÓIA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. 2009. Case studies in the mangrove forests of the state of São Paulo (Brasil): application of tools using different spatial and temporal scales.
- DE SALES, R.J.R. e MOREIRA, A.C.C. 1996. Reservas extrativistas no Complexo Estuarino Lagunar de Iguape e Cananéia – Domínio Atlântica. USP, Documentos e Relatórios de Pesquisa, pp.97.
- DUGAN, P.J. 1992. Conservación de humedales: un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias. IUCN, pp. 108.
- DURÁN, N.; MARTINEZ, D.S.T.; JUSTO, G.Z.; DE LIMA, R.; DE CASTRO, V.L.; UMBUZEIRO, G.A.; BARBIERI, E.; DURÁN, M.; MELO, P.; ALVES, O.L.; FÁVARO, W.J. 2015a. Interlab study on nanotoxicology of representative graphene oxide. *Journal of Physics: Conference Series*, 617(1): 012019.
- DURÁN, N.; MARTINEZ, D.S.T.; SILVEIRA, C.P.; DURÁN, M.; DE MORAES, A.C.M.; SIMÕES, M.B.; ALVES, O.L.; FÁVARO, W.J. 2015b. Graphene oxide: a carrier for pharmaceuticals and a scaffold for cell interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(4): 309-327.
- ELLISON, A.M. 2001. Macroecology of mangroves: large-scale patterns and processes in tropical coastal forests. *Trees*, 16(2-3): 181-194.
- FERREIRA, R.S.; VIEIRA, R.R.R.; D'INCAO, F. 2010. The marine and estuarine shrimps of the Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from Brazil. *Zootaxa*, 2606: 1-24.
- GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B. 1996. Humic and fulvic acids and organic colloidal materials in the environment. In *Humic and Fulvic Acids*. American Chemical Society Symposium Series, 651: 2-16.
- GEIM, A.K. 2009. Graphene: status and prospects. *Science*, 324(5934):1530-1534.
- GEIM, A.K. e NOVOSELOV, K.S. 2007. The rise of graphene. *Nature Materials*, 6(3): 183-191.

GUILHERME, L.R.G.; MARQUES, J.J.; PIRANGELI, M.A.; ZULANI, D.Q.; CAMPOS, M.L.; MARCHI, G. 2005. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos Ci. Solo*, 4: 345-390.

HANDY, R.D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. 2008a. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5):315-325.

HANDY, R.D.; VON DER KAMMER, F.; LEAD, J.R.; HASSELLÖV, M.; OWEN, R.; CRANE, M. 2008b. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4): 287-314.

HEUGENS, E.H.; HENDRIKS, A.J.; DEKKER, T.; VAN STRAALLEN, N.M.; ADMIRAAL, W. 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for the use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(3): 247-284.

HE, X.; AKER, W.G.; LESZCZYNSKI, J.; HWANG, H. 2014. Using a holistic approach to assess the impact of engineered nanomaterials inducing toxicity in aquatic systems. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1):128-146.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B.B.; BEEREGOWDA, K. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2): 60-72.

JOHNSTON, H.; POJANA, G.; ZUIN, S.; JACOBSEN, N.R.; MØLLER, P.; LOFT, S., SEMMELER-BEHNKE, M.; McGUINNESS, C.; BALHARRY, D.; MARCOMINI, A.; WALLIN, H.; KREYLING, W.; DONALDSON, K.; TRAN, L.; STONE, V. 2013. Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(1): 1-20.

KABATA-PENDIAS, A. 2010. Trace elements in soils and plants. CRC press, Fourth Edition, pp. 548.

KENNISH, M.J. e FERTIG, B. 2012. Application and assessment of a nutrient pollution indicator using eelgrass (*Zostera marina* L.) in Barnegat Bay-Little Egg Harbor estuary, New Jersey. *Aquatic Botany*: 96(1): 23-30.

- KAHRU, A. e DUBOURGUIER, H. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269(2-3): 105-119.
- KHAN, M.B.; MASIOL, M.; HOFER, A.; PAVONI, B.; BINI, C.; BECH, J. 2014. Harmful elements in estuarine and coastal systems. In *PHEs, Environment and Human Health*. Springer Netherlands, pp. 37-83.
- KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P.J.J.; BATLEY, G.E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R.D.; LYON, D.Y.; MAHENDRA, S.; McLAUGHLIN, M.J.; LEAD, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Env. Tox. and Chem.*, 27(9):1825-1851.
- LÖVESTAM, G.; RAUSCHER, H.; ROEBBEN, G.; KLÜTTGEN, B.S.; GIBSON, N.; PUTAUD, J.; STAMM, H. 2010. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. Joint Research Centre (JRC) Reference Reports, 80004-1.
- LOWRY, G.V. e CASMAN, E.A. 2009. Nanomaterial transport, transformation, and fate in the environment. In *Nanomaterials: risks and benefits*. Springer Netherlands, pp. 125-137.
- MANCE, G. 2012. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. Springer Science & Business Media, pp. 372.
- MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2013. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. IOP Publishing, *Journal of Physics: Conference Series*, 429(1): 012043.
- MAUTER, M.S. e ELIMELECH, M. 2008. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 42(16): 5843-5859.
- MOHAN, K.K.; VAIDYA, R.N.; REED, M.G.; GREGORY, J. 1993. Water sensitivity of sandstones containing swelling and non-swelling clays. In *Colloids in the Aquatic Environment. A: Physicochemical and engineering aspects*, 73: 237-254.
- MOORE, M.N. 2006. Do nanoparticles present Ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environmental International*, 32(8): 967-976.
- MOORE, W.S. 2006. The role of submarine groundwater discharge in coastal biogeochemistry. *Journal of Geochemical Exploration*, 88(1-3): 389-393.

MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; ZUCOLOTTO, V.; MATTOSO, L.H.C. 2011. Barrier and mechanical properties of clay-reinforced polymeric nanocomposites. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 50(13):1323-1328.

NOVOSELOV, K.S.; GEIM, A.K.; MOROZOV, S.V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S.V.; GRIGORIEVA, I.V.; FIRSOV, A.A. 2004. Electric field in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696): 666-669.

NOVOSELOV, K.S.; JIANG, D.; SCHELDING, F.; BOOTH, T.J.; KHOTKEVICH, V.V.; MOROZOV, S.V.; GEIM, A.K. 2005. Two-dimensional atomic crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30): 10451-10453.

OWEN, R. e HANDY, R. 2007. Viewpoint: formulating the problems for environmental risk assessment of nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 41(16): 5582-5588.

PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B.; YAMANAKA, N. 2001. Growth of the oyster *Crassostrea brasiliana* sowed on artificial beds under different densities in the estuarine lagoon of Cananéia, SP, Brazil, 25⁰S, 48⁰W. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(2):163-174.

POLETO, C. e MERTEN, G.H. 2007. Urban watershed studies in southern Brazil. *Journal of Urban and Environmental Engineering*, 1(2):70-78.

POLETO, C.; MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. 2009. The identification of sediment sources in a small urban watershed in southern Brazil: An application of sediment fingerprinting. *Environmental Technology*, 30(11): 1145-1153.

RAINBOW, P.S. 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44(2): 169-176.

RINDERHAGEN, M.; RITTERHOFF, J.; ZAUKE, G. 2000. Crustaceans as bioindicators. *Environmental Research Forum*, 9: 161-194.

ROGERS, H.R. 1993. Speciation and partitioning of priority organic contaminants in estuarine waters. In *Colloids in the Aquatic Environment. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 73: 229-235.

- ROSA, L.C.; PASSOS, A.C.; CORRÊA, M.F.M. 2015. Aspectos populacionais e reprodutivos de *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea: Palaemonidae), em uma marisma tropical do sul do Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 41(4): 849-857.
- RUOFF, R. 2008. Graphene: calling all chemists. *Nature Nanotechnology*, 3(1): 10-11.
- SANCHEZ, V.C.; JACHAK, A.; HURT, R.H.; KANE, A.B. 2012. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1): 15-34.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H.S.L.; CINTRÓN-MOLERO, G. 1990. The Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Estuaries*, 13(2): 193-203.
- SCHOETTGER, R.A. 1996. Problems of aquatic toxicology, biotesting and water quality management. USEPA.
- SCHULTZ, A.G.; BOYLE, D.; CHAMOT, D.; ONG, K.J.; WILKINSON, K.J.; McGEER, J.C.; SUNAHARA, G.; GOSS, G.G. 2014. Aquatic toxicity of manufactured nanomaterials: challenges and recommendations for future toxicity testing. *Environmental Chemistry*, 11(3): 207-226.
- SOUZA, A.M.; SALVIANO, A.M.; MELO, J.F.B.; FELIX, W.P.; BELÉM, C.S.; RAMOS, P.N. 2016. Seasonal study of concentration of heavy metals in waters from lower São Francisco River basin, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, DOI: 10.1590/1519-6984.05215.
- STANKOVICH, S.; DIKIN, D.A.; DOMMETT, G.H.B.; KOHLHAAS, ZIMNEY, E.J.; STACH, E.A.; PINER, R.C.; NGUYEN, S.T.; RUOFF, R.S. 2006. Graphene-based composite materials. *Nature*, 442(7100): 282-286.
- STEFANIDOU, M.; MARAVELIAS, C.; DONA, A.; SPILIOPOULOU, C. 2006. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology*, 80(1): 1-9.
- USEPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. USEPA, Fifth Edition.
- WU, Z.; ZHOU, G.; YIN, L.; REN, W.; LI, F.; CHENG, H. 2012. Graphene/metal oxide composite electrode materials for energy storage. *Nano Energy*, 1(1): 107-131.

XU, B.; BURNETT, W.; DIMOVA, N.; DIAO, S.; MI, T.; JIANG, X.; YU, Z. 2013. Hydrodynamics in the Yellow River Estuary via radium isotopes: ecological perspectives. *Continental Shelf Research*, 66: 19-28.

CAPÍTULO 1

EFEITOS DA INTERAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO (GO) COM CÁDMIO E ZINCO NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE)

EFEITOS DA INTERAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO (GO) COM CÁDMIO E ZINCO NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE).

DE MELO, C.B. (a); COA, F. (a,b); ALVES, O.L. (c); MARTINEZ, D.S.T. (b); BARBIERI, E. (d)*.

(a) Programa de Pós Graduação do Instituto de Pesca - APTA- SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000, Cananéia, São Paulo, Brasil.

(b) Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brasil.

(c) Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

(d) Instituto de Pesca – APTA SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000 Cananeia, SP, Brasil.

* Autor Correspondente: Instituto de Pesca-APTA-SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000, Cananeia/SP, Brasil. E-mail:edisonbarbieri@yahoo.com.br

RESUMO

O Óxido de Grafeno (GO) é considerado o mais importante derivado da família dos grafenos, de características únicas com alto potencial de inovação e aplicabilidade. O GO tem sido utilizado na remediação ambiental, entretanto, os efeitos colaterais de sua interação com poluentes no meio aquático ainda são pouco conhecidos. Com isso, tornou-se imprescindível investigar os possíveis efeitos adversos deste nanomaterial sobre a biota. Este estudo analisou os efeitos das diferentes concentrações de GO, Cd, Zn e da interação do GO com estes elementos-traço (ETs), através de testes de toxicidade aguda, consumo específico de oxigênio e excreção de amônia do *Palaemon pandaliformis*. Supôs-se, como hipótese, que o GO poderia afetar a toxicidade do Cd e do Zn no organismo-teste. Após 96h não foi observada toxicidade do GO nas concentrações 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹. Os resultados indicaram que o GO aumentou a toxicidade do Cd e do Zn evidenciada pela diminuição dos valores de CL₅₀. A CL₅₀96h do Cd associado a 1,0 mg.L⁻¹ de GO (0,001 mg.L⁻¹) foi 1,7 vezes menor que a CL₅₀96h do Cd (0,0017 mg.L⁻¹), assim como a CL₅₀96h do Zn associado a 1,0 mg.L⁻¹ de GO (0,12 mg.L⁻¹) foi 1,8 vezes menor que a CL₅₀96h do Zn (0,22 mg.L⁻¹). O GO não afetou o consumo específico de oxigênio, mas diminuiu a excreção específica de amônia em 93% e 95%, em relação ao controle, nas duas maiores concentrações empregadas, 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹, respectivamente. Ao associar GO com Cd, notou-se queda de 59% da excreção de amônia na maior concentração empregada (0,05 mg.L⁻¹ de Cd + 1,0 mg.L⁻¹ GO). Já quando houve interação do GO com o Zn observou-se elevação e queda do consumo de oxigênio, assim como diminuição de 84% da excreção de amônia, na maior concentração empregada (4,0 mg.L⁻¹+ 1,0 mg.L⁻¹ GO). Foi confirmada a hipótese de que o GO pode influenciar a toxicidade do Cd e do Zn, sugerindo cautela e maiores investigações quanto ao uso e descarte deste NM nos ecossistemas aquáticos.

Palavras chave: Óxido de Grafeno, nanoecotoxicologia, toxicidade aguda, consumo de oxigênio, excreção de amônia, *Palaemon pandaliformis*.

ABSTRACT

The Graphene Oxide (GO) is considered the most important of the graphene family with unique characteristics with high potential for innovation and applicability. The GO has been used in environmental remediation, however, the side effects of its interaction with pollutants in aquatic environment are still largely unknown. Therefore, it is essential to investigate the possible effects of nanomaterials (NMs) on the biota. This study analyzed the effects of different concentrations of GO, Cd, Zn and the interaction of GO with these trace elements (TEs) through acute toxicity tests, specific oxygen consumption and ammonia excretion of the shrimp *Palaemon pandaliformis*. It was assumed, as a hypothesis, that GO could affect the toxic effects of Cd and Zn in the test organism. After 96h, no toxicity was observed at concentrations of GO 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mg.L⁻¹. However, the results indicated that the GO increased the toxicity of Cd and Zn as evidenced by the decrease in LC₅₀ values. The LC₅₀96h of Cd associated to 1.0 mg.L⁻¹ of GO (0.001 mg.L⁻¹) was 1,7 times less than LC₅₀96h of Cd (0.0017 mg.L⁻¹), as well as LC₅₀96h of Zn associated with 1.0 mg.L⁻¹ of GO (0.12 mg.L⁻¹) was 1.8 times less than LC₅₀96h of Zn (0.22 mg.L⁻¹). The GO did not affect the specific oxygen uptake, but decreased the specific excretion of ammonia by 93% and 95%, when compared to control group, at the two highest concentrations employed, 2.0 and 4.0 mg.L⁻¹, respectively. By associating GO with Cd, a decrease of 59% of ammonia excretion was noticed at the highest concentration employed (0.05 mg.L⁻¹ + 1.0mg.L⁻¹ GO). However, in the interaction of GO with different concentrations of Zn, rise and fall of oxygen uptake as well as a decrease of 84% of ammonia excretion at the highest concentration of Zn (4.0 mg.L⁻¹ + 1.0 mg.L⁻¹ GO). The hypothesis that the GO could influence the toxicity of Cd and Zn was confirmed, suggesting caution and further research on the use and disposal of this NM in aquatic ecosystems.

Keywords: Graphene Oxide (GO), nanoecotoxicology, acute toxicity, oxygen consumption, ammonia excretion, *Palaemon pandaliformis*.

1. INTRODUÇÃO

O Óxido de Grafeno (GO) é um nanomaterial (NM) à base de carbono, originado a partir do Óxido de Grafite, sintetizado pela primeira vez em 1859 (Brodie, 1859). É um NM bidimensional hidrofílico, composto por uma camada de átomos de carbono sp^2 , carbonos oxidados a sp^3 , com radicais funcionais oxigenados: carbonilas, carboxilas, hidroxilas e epoxilas (Dreyer et al., 2010; Gao, 2015; Geim e Novoselov, 2007).

Os grupos funcionais oxigenados na superfície do GO aumentam sua biocompatibilidade e biofuncionabilidade (Choi et al., 2010; Durán et al., 2015b; Sanchez et al., 2012). É considerado como o mais relevante da família dos grafenos, com propriedades físico-químicas que dependem do processo de sua síntese e do tratamento pós-síntese (Durán et al., 2015a; Gao, 2015; Nanda et al., 2015). A caracterização morfológica e físico-química do GO é de fundamental importância para compreender suas propriedades e potenciais aplicações, assim como seus riscos ambientais (Dreyer et al., 2010; Durán et al., 2015a, 2015b; Geim e Novoselov, 2007; Li et al., 2015; Wang et al., 2011).

As diversas propriedades físico-químicas e estruturais do GO vêm sendo exploradas de forma crescente, expandindo e inovando os potenciais de aplicação deste NM em remediações ambientais e tratamento de efluentes (Gautam e Chattopadhyaya, 2016; Kyzas et al., 2014). A capacidade de adsorção da família dos grafenos pode ser usada na remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos de efluentes industriais e de corpos de água contaminados (Chowdhury e Balasubramanian, 2014). Os grupos funcionais de oxigênio na superfície do GO, obtidos pelo processo de oxidação química do grafite, aumentam sua solubilidade e o disponibiliza no meio aquático em dispersões coloidais (1-1000nm) estáveis (Baalousha et al., 2011; Chowdhury et al., 2013; Luo et al., 2010; Wu et al., 2011). A capacidade de adsorção do GO é muito superior que a de qualquer outro adsorvente com capacidade de interagir fortemente com diferentes espécies de contaminantes (Sitko et al., 2013; Zhao et al., 2011). A propriedade de adsorção do GO, consequente de sua porosidade e grande área de superfície bidimensional ($2,630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) com grupos funcionais de oxigênio, aliada ao seu baixo custo de produção potencializa o

seu uso nos procedimentos de purificação de água (Chabot et al., 2014; Chowdhury e Balasubramanian, 2014; Deng et al., 2010; Yang et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Apesar de estudos recentes evidenciarem os efeitos tóxicos do GO em estudos *in vitro* e *in vivo*, muito pouco se sabe sobre os efeitos adversos do GO no meio aquático e de sua interação com outros poluentes nestes ecossistemas (Das et al., 2013; Durán et al., 2015a; Liu et al., 2014; Seabra et al., 2014). No entanto, é sabido que o GO apresenta elevada solubilidade e biocompatibilidade, podendo interagir com os organismos aquáticos em nível biomolecular com: ácidos nucleicos, ácidos graxos, lipídeos, carboidratos e proteínas (Jastrzębska e Olszyna, 2015; Sanchez et al., 2012; Yang et al., 2013). Neste sentido, vários pesquisadores alertam para a necessidade de avaliar os riscos e benefícios associados ao uso dos grafenos, assim como sua interação com outros elementos presentes no meio aquático, além de seu destino e biocompatibilidade, com o intuito de regulamentar o uso e descarte deste NM no meio ambiente (Bianco, 2013; Chowdhury et al., 2013; Guo e Mei, 2014; Martinez e Alves, 2013; Zhao et al., 2014)

As águas continentais, estuarinas e marinhas, sustentam grande parte da biodiversidade marinha, dos recursos pesqueiros e das reservas energéticas mundiais (Collaço et al., 2015; Costa et al., 2012; Pusceddu et al., 2007). Ainda assim, a qualidade ambiental destes ecossistemas é bastante prejudicada pelos lançamentos de efluentes urbanos, agrícolas e industriais, que contaminam estes ambientes com diferentes compostos, dentre eles os elementos-traço (ETs) (Maia et al., 2006; Pinto et al., 2013; Poletto et al., 2009). O nível de contaminação dos ambientes aquáticos por ETs, em condições específicas, pode colocar em risco a biota e a população que sobrevive de seus recursos, devido à ação residual, à baixa biodegradabilidade e ao efeito cumulativo destes minerais-traço na cadeia trófica (Barbieri e Doi, 2011; Kabata-Pendias, 2010). A mobilidade, biodisponibilidade e ecotoxicidade dos ETs dependem, não só de sua concentração total, mas também de sua especiação e trajetória biogeoquímica no ambiente aquático (Charlesworth et al., 2003; Hirner e Hippler, 2011; Khan et al., 2014; Pueyo et al., 2001). Contudo, segundo Charlesworth et al. (2003), a avaliação da biodisponibilidade dos ETs só pode ser compreendida através de testes de ecotoxicidade.

O cádmio (Cd) e o zinco (Zn) são ETs naturalmente encontrados no meio ambiente e considerados substâncias de referência recomendadas a ensaios ecotoxicológicos (Kabata-Pendias, 2010; Zagatto e Bertoletti, 2006). Estes ETs apresentam propriedades físicas e químicas semelhantes, sendo que na natureza, o Cd é raramente encontrado na forma pura, mas associado a outros elementos, dentre eles o Zn (Kabata-Pendias, 2010). No meio aquático, ambos podem ser diretamente assimilados de forma ativa ou passiva pela biota, ou ingeridos quando adsorvidos à matéria orgânica (Mance, 1987; Rainbow, 1997; Virga et al., 2007). O Cd e o Zn estão entre os ETs frequentemente relacionados à intoxicação da biota de sistemas aquáticos poluídos, podendo ser bioacumulados e biomagnificados (Pinto et al., 2013; Rainbow, 2002, 1997; Soegianto et al., 1999; Spacie et al., 1995). Nos ambientes estuarinos, a mobilidade e ecotoxicidade do Cd e do Zn são influenciados principalmente, pela variação de pH e presença de elementos orgânicos e inorgânicos, dissolvidos ou particulados típicos da dinâmica dessa área de mistura (Khan et al., 2014; Xu et al., 2012).

O Cd não apresenta função biológica e sua principal forma encontrada em ambientes de água doce é a iônica livre, no entanto, é também a mais biodisponível e tóxica (Flick et al., 1971; Singh et al., 2011). Quando assimilado pelos crustáceos decápodes, associa-se às proteínas da hemolinfa, que pode ser estocado no hepatopâncreas na forma de grânulos inorgânicos ou associado à metalotioneína ou à ferritina (Rainbow, 1997; Wright e Welbourn, 1994). Nos ecossistemas de transição e lênticos, o Cd pode se complexar com a matéria orgânica dissolvida, principalmente com os ácidos húmicos, que estão entre os principais fatores que influenciam os processos de adsorção do Cd à matéria particulada orgânica e inorgânica (Callahan et al., 1979; Hirner e Hippler, 2011; Wright e Welbourn, 1994). Em águas marinhas, 97% do Cd encontra-se complexado com os cloretos (CdCl^+ , CdCl_2 , CdCl_3^{1-} e CdCl_4^{2-}), que é a sua forma mais solúvel, (Byrne et al., 1988; Wright e Welbourn, 1994). Apesar de o cloro ser um parâmetro importante que controla o comportamento e o destino do Cd nos ambientes estuarinos, outros fatores como a variação da salinidade e do pH também influenciam sua especiação e ecotoxicidade nestes ecossistemas aquáticos (Khan et al., 2014; Pinot et al., 2011). O Cd apresenta toxicidade média alta (Poletto et al., 2009).

Já o Zn é essencial à manutenção de diversas funções biológicas, pois atua como cofator em diferentes processos enzimáticos, mas se biodisponibilizado em elevadas concentrações, pode ser tóxico (Frassinetti et al., 2006; Stefanidou et al., 2006). A concentração do Zn nas áreas costeiras e estuarinas é muito maior que nas águas oceânicas, sendo que sua principal forma dissolvida e biodisponível é a iônica livre Zn^{2+} (Khan et al., 2014). O Zn dissolvido nos sistemas aquáticos de água doce pode ser facilmente adsorvido à matéria orgânica e partículas em suspensão (Mance, 1987; Marasinghe Wadige et al., 2014). Nos ambientes estuarinos, o Zn pode ser disponibilizado com a redução da salinidade (Khan et al., 2014). O Zn apresenta toxicidade baixa média (Poletto et al., 2009).

Segundo Barbieri e Paes (2011), as reações dos crustáceos aos ETs são específicas e influenciam seu equilíbrio metabólico. A avaliação da quantidade de oxigênio consumido e da amônia excretada, por um organismo em determinado período, pode indicar as alterações de sua taxa metabólica (Damato e Barbieri, 2011; Santos et al., 2014). O metabolismo oxidativo e a osmoregulação são indicadores sensíveis e eficientes usados para avaliar os efeitos tóxicos e as mudanças ambientais através das respostas fisiológicas de um organismo (Adams, 1990; Barbieri et al., 2013; Hansen et al., 1997; Heugens et al., 2001; USEPA, 2002; Vilas et al., 2006).

Diversos estudos de toxicidade vêm utilizando espécies de crustáceos decápodes com o objetivo de identificar e avaliar os potenciais riscos ambientais dos contaminantes, para auxiliar na elaboração de leis ambientais que possam servir de instrumento para gerenciar e preservar o equilíbrio trófico do meio ambiente (Barbieri, 2009; Barbieri et al., 2013; Santos et al., 2014; Soegianto et al., 1999; Thurberg et al., 1973; Virga et al., 2007; Wu e Chen, 2004; Zhang et al., 2014). No entanto, existem estudos insuficientes de nanoecotoxicologia com crustáceos, indicados como organismos relevantes e sensíveis aos testes de toxicidade aguda e crônica (He et al., 2014). A maioria dos ensaios nanotoxicológicos utilizaram *Daphnia magna*, seguido por *Ceriodaphnia dubia*, como organismos-teste para avaliar os riscos dos NMs (Baun et al., 2008a; Oberdörster et al., 2005). Este é um estudo pioneiro que utilizou o *Palaemon pandaliformis*, um crustáceo decápode de ampla distribuição, para analisar os efeitos do GO assim como sua interação com ETs em testes de toxicidade aguda e de metabolismo de rotina.

O *P. pandaliformis* (Stimpson, 1871) é um crustáceo decápode osmorregulador, encontrado em ambientes costeiros do sul do Brasil até a Guatemala (de Melo, 2003; Freire et al., 2003; Rosa et al., 2015). Popularmente conhecidos como camarões fantasma, ou potitinga, são localizados em ambientes estuarinos e de água doce, junto às raízes e hastes da vegetação aquática e estão envolvidos na ciclagem de nutrientes (Coelho, 1964; Ferreira et al., 2010; Gamba, 1998; Mortari e Negreiros-Fransozo, 2007). Este carídeo de pequeno porte (até 5,0 cm) é utilizado como isca viva em pescarias artesanais, faz parte da dieta de peixes e aves e, por isso, apresenta expressiva importância ecológica nos ecossistemas em que estão integrados (Bond-Buckup e Buckup, 1989; Mortari e Negreiros-Fransozo, 2007; Müller et al., 1996; Rosa et al., 2015). Os espécimes de *P. pandaliformis* utilizados nos experimentos deste estudo foram coletados na floresta de mangue da Reserva do Mandira, durante a maré baixa, próximos às raízes da vegetação do rio Mandira.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da interação do GO com o Cd e o Zn em diferentes concentrações, através de testes de toxicidade aguda, do consumo específico de oxigênio e da excreção específica de amônia do *Palaemon pandaliformis*.

Supôs-se, como hipótese, que o GO pode influenciar os efeitos de toxicidade do Cd e do Zn nos organismos-teste, *Palaemon pandaliformis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização do GO

Microscopia de Força Atômica (AFM)

Com o intuito de estudar a morfologia e a topografia do GO, utilizou-se a técnica de microscopia de força atômica (AFM). Para preparação da amostra para a AFM, a solução estoque de GO (1 mg/mL) foi submetida a banho ultrassom por 10 minutos. A partir desta, soluções de 5 e 10 µg/mL foram preparadas em água ultrapura. O volume de 3 µL foi coletado das soluções e gotejado em porta amostra de mica, previamente clivada com fita adesiva.

As amostras permaneceram no dessecador por, no mínimo, 24 horas, para secagem.

As amostras foram analisadas no Nanoscope IIIa (Digital Instruments) em contato intermitente (tapping), pelo uso da ponteira PPP-CNHR (frequência de ressonância 320 KHz e constante de força de 42 N.m⁻¹).

2.2. Coleta e manutenção dos camarões

Espécimes de *P. pandaliformis* foram coletados com rede de puçá, na maré baixa das margens do rio Mandira, Reserva Extrativista do Mandira, Cananéia, São Paulo, Brasil (Figura 1). Logo após a captura, foram transportados para o laboratório de Estudos Ecotoxicológicos do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul, Instituto de Pesca, Cananéia. Antes de serem submetidos aos experimentos, foram aclimatados por, no mínimo, 10 dias, em tanques circulares com capacidade de 2000 L, temperatura controlada de 20 (±2)⁰C, aeração constante, higienização dos tanques e renovação diária da água.

Os camarões foram alimentados diariamente com ração extrusada e submetidos a um jejum de 24 horas antes de serem utilizados nos experimentos de toxicidade aguda e de metabolismo de rotina.

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



Reserva Extrativista do Mandira

Mapa de Localização

48°0'0"W



48°0'0"W

LEGENDA

- Resex do Mandira
- Municípios

Sistema de Coordenadas Geográficas
Datum: Sad-69
Fonte de dados: ICMBio

5 2,5 0 5 Km



Localização
no Brasil



Localização
no Estado

Figura 1: Mapa de localização da Reserva do Mandira. Fonte: ICMBio – Plano de Manejo Participativo Reserva Extrativista do Mandira Cananeia/São Paulo, 2010.

2.3. Reagentes Químicos

O Óxido de Grafeno de camada simples utilizado neste experimento foi fornecido pelo Laboratório de Química do Estado Sólido (LQS), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O GO foi adquirido da empresa Cheap Tubes Inc., Brattleboro, EUA. Segundo Duran et al. (2015a), possui pureza de 99%, espessura 0,7-1,2 nm (AFM); dimensões X&Y ~300-800 nm sendo o tamanho padrão <450 nm e dimensões laterais 1-20 μm .

A dispersão do GO (200 mL) foi preparada na concentração de 1mg:1mL em água ultrapura, em banho ultrassom e mantida sob refrigeração. A dispersão foi novamente submetida a banho ultrassônico de 30 minutos, antes de cada experimento para garantir sua dispersão na água, com o uso de Cole-parmer 8891.

O cádmio (CdCl_2) (Sigma, 99,5%) e o zinco (ZnCl_2) (Sigma, 99,5%), foram diluídos em uma solução estoque com água ultra pura, no volume de 1 L e concentração de 1mg:1mL.

Para garantir a dispersão do GO e interação do GO com o Cd e o Zn no meio aquoso, os experimentos de exposição dos organismos teste aos xenobióticos foram realizados em aquários contendo água mineral, com valores paramétricos dentro dos estabelecidos pelo D.L. 306/2007 (Ministério do Ambiente, 2007) e de composição físico-química: Bário: 0,34 mg/L, Bicarbonato 108,32 mg/L, Brometo 0,02 mg/L, Cálcio 4,22 mg/L, Cloreto 2,38 mg/L, Estrôncio 0,04 mg/L, Fluoreto 0,26 mg/L, Fosfato 0,51 mg/L, Magnésio 0,99 mg/L, Potássio 2,26 mg/L, Sódio 38,29 mg/L, Sulfato 7,32 mg/L, pH 7,28, condutividade 197 $\mu\text{S/cm}$.

2.4. CL_{50}

Os ensaios de Concentração Letal Média (CL_{50}) foram realizados para avaliar a toxicidade aguda do Cd, Zn e a interação destes com o GO às 24, 48, 72 e 96h.

Nos experimentos de sistema estático de toxicidade aguda, os camarões foram expostos a diferentes concentrações de GO (0,0 mg.L^{-1} , 0,1 mg.L^{-1} , 0,5 mg.L^{-1} , 1,0 mg.L^{-1} , 2,5 mg.L^{-1} e 5,0 mg.L^{-1}), de Cd (0,0 mg.L^{-1} , 0,0005 mg.L^{-1} , 0,0010 mg.L^{-1} , 0,0025 mg.L^{-1} , 0,0050 mg.L^{-1} , 0,0100 mg.L^{-1} , 0,0500 mg.L^{-1} , 0,1000 mg.L^{-1} e 0,2500 mg.L^{-1}), e de Zn (: 0,0 mg.L^{-1} , 0,1 mg.L^{-1} , 0,5 mg.L^{-1} , 1,0 mg.L^{-1} , 2,5 mg.L^{-1} , 5,0 mg.L^{-1} e 10 mg.L^{-1}), por até 96 horas. Na avaliação da interação do GO com o Cd e o Zn,

foram utilizadas as mesmas concentrações dos experimentos destes elementos isoladamente e adicionou-se 1mg.L^{-1} de GO, por até 96h. Os organismos-teste foram introduzidos em aquários, em grupos de 10, com 3 L de água, capacidade de 5 L e aeração constante. Os xenobióticos foram inseridos nos aquários cinco minutos antes da introdução dos camarões, para assegurar sua distribuição homogênea na água. Manteve-se temperatura constante 20°C (± 1) e fotoperíodo natural do laboratório durante todo o experimento. Não houve oferta de alimento durante os ensaios.

Foram realizadas triplicatas com controle ($0,0\text{mg.L}^{-1}$) para cada tratamento de toxicidade aguda. Portanto, 1140 camarões, com massa úmida média $0,24\text{g}$ ($\pm 0,04$), foram submetidos aos 114 experimentos necessários para avaliar a toxicidade aguda dos contaminantes.

Os camarões mortos foram imediatamente retirados dos aquários e contados em 24, 48, 72 e 96 horas. A CL_{50} foi calculada pelo método Trimmed Spearman Karber, com limite de 95% de confiança (Hamilton *et al.*, 1977).

2.5. Consumo Específico de Oxigênio

Utilizaram-se 420 espécimes, nos experimentos de metabolismo de rotina avaliado através do consumo específico de oxigênio. As concentrações utilizadas nestes ensaios foram determinadas pelos estudos prévios de toxicidade aguda com o seguinte delineamento: GO ($0,0\text{mg.L}^{-1}$, $0,1\text{mg.L}^{-1}$, $0,5\text{mg.L}^{-1}$, $1,0\text{mg.L}^{-1}$, $2,0\text{mg.L}^{-1}$ e $4,0\text{mg.L}^{-1}$), Cd ($0,0\text{mg.L}^{-1}$, $0,01\text{mg.L}^{-1}$, $0,02\text{mg.L}^{-1}$, $0,04\text{mg.L}^{-1}$ e $0,05\text{mg.L}^{-1}$), Cd + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de GO ($0,0\text{mg.L}^{-1}$, $0,01\text{mg.L}^{-1}$, $0,02\text{mg.L}^{-1}$, $0,04\text{mg.L}^{-1}$ e $0,05\text{mg.L}^{-1}$), Zn ($0,0\text{mg.L}^{-1}$, $0,2\text{mg.L}^{-1}$, $0,5\text{mg.L}^{-1}$, $1,0\text{mg.L}^{-1}$, $2,0\text{mg.L}^{-1}$ e $4,0\text{mg.L}^{-1}$) e Zn + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de GO ($0,0\text{mg.L}^{-1}$, $0,2\text{mg.L}^{-1}$, $0,5\text{mg.L}^{-1}$, $1,0\text{mg.L}^{-1}$, $2,0\text{mg.L}^{-1}$ e $4,0\text{mg.L}^{-1}$).

Para cada experimento, incluindo os controles ($0,0\text{mg.L}^{-1}$), os camarões em jejum de 24 horas, foram expostos às diferentes concentrações dos contaminantes por 2 horas em um aquário, de capacidade de 5 L, com 1 L. Para garantir distribuição homogênea no aquário, os contaminantes foram adicionados ao aquário com pipetas de precisão, de maneira a se obter a concentração final determinada, cinco minutos antes da introdução dos camarões. Após duas horas de exposição, os camarões foram distribuídos em respirômetros cilíndricos de acrílico, em triplicatas, sendo cinco camarões por respirômetro. Os respirômetros foram mantidos em um sistema fechado com circulação contínua de água. Para atenuar o estresse causado pelo manuseio, os

espécimes foram mantidos dentro dos respirômetros por 30 minutos com circulação contínua de água. Logo após este período, os respirômetros foram fechados, interrompendo a circulação interna de água e isolando-os do sistema fechado de circulação contínua, por duas horas. Imediatamente após estas duas horas, coletaram-se as amostras de água dos respirômetros para as análises do consumo de oxigênio e da excreção de amônia.

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

2.6. *Excreção Específica de Amônia*

As coletas das amostras de água para análise da excreção de amônia foram realizadas simultaneamente às coletas de água para análise de consumo específico de oxigênio. Portanto, foram realizadas em triplicatas com um controle para cada tratamento.

A excreção de amônia foi determinada pela diferença entre as concentrações de nitrogênio amoniacal no início e no final de duas horas, de acordo com o volume do respirômetro, a massa úmida dos camarões e o tempo de confinamento ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método de Nessler (Greenberg, 1995).

2.7. *Análises Estatísticas*

As médias do consumo específico e da excreção de amônia dos camarões foram primeiramente avaliadas quanto à normalidade, através do teste Shapiro-Wilk, com confiabilidade de 95%. Constatando-se distribuição normal, realizou-se Análise de Variância (ANOVA) seguida de testes de comparações múltiplas de Tukey ($P<0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. GO (AFM)

A imagem (Figura 12) do GO obtida por AFM evidencia a morfologia de “flake” que este possui, bem como sua única camada.

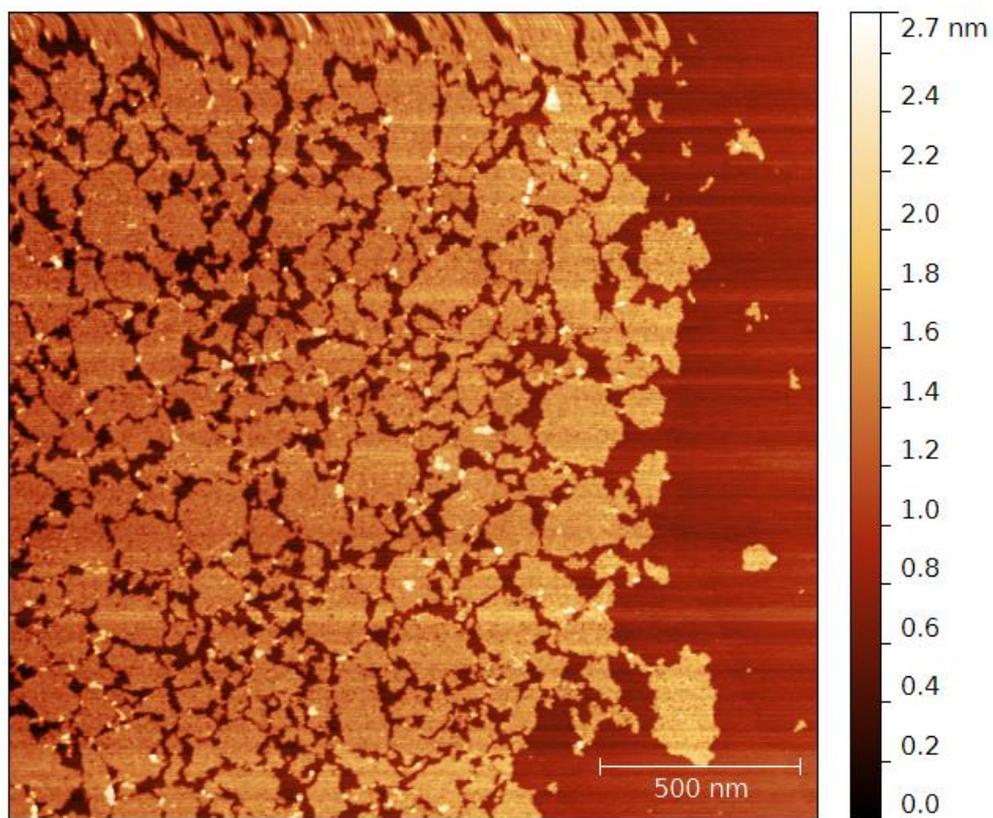


Figura 2: Imagem de topografia do Óxido de Grafeno obtida por AFM.

3.2. CL₅₀ e letalidade dos indivíduos

Os espécimes de *P. pandaliformis* foram expostos a diferentes concentrações de Óxido de Grafeno, Cádmio, Cádmio + GO, Zinco e Zinco + GO por até 96 horas. Os resultados de porcentagem de mortalidade (%) e de Concentração Letal Média (CL₅₀) com 95% de limite de confiança calculados por análise Spearman-Kärber estão expostos nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ de *Palaemon pandaliformis* expostos ao Óxido de Grafeno, n=30. Os valores são as médias das triplicatas. Toxicidade Não Detectada pelo Método (TNDM).

Tempo de Exposição(h)	Concentração de Óxido de Grafeno (mg.L ⁻¹)						
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	TNDM
48	0,00	6,67	6,67	10,0	10,0	10,0	TNDM
72	0,00	10,0	16,67	16,67	16,67	20,0	TNDM
96	0,00	10,0	16,67	16,67	20,0	23,33	TNDM

Os camarões expostos ao Óxido de Grafeno não foram sensíveis ao xenobiótico, não apresentando toxicidade nas concentrações e nos períodos estudados (Tabela 1).

Tabela 2: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ de *Palaemon pandaliformis* expostos ao Cádmiio, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.

Tempo de Exposição(h)	Concentração de Cádmiio (mg.L ⁻¹)									CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Intervalo Confiança
	0,0	0,0005	0,0010	0,0025	0,0050	0,0100	0,0500	0,1000	0,2500		
24	0,00	10,0	10,0	13,33	16,67	23,33	100,0	100,0	100,0	0,0154	0,0116 – 0,0205
48	0,00	33,33	33,33	33,33	36,67	43,33	100,0	100,0	100,0	0,0106	0,0057 – 0,0198
72	0,00	30,33	40,0	50,0	53,33	66,67	100,0	100,0	100,0	0,0027	0,0012 – 0,0057
96	0,00	36,67	46,67	53,33	60,00	70,0	100,0	100,0	100,0	0,0017	0,0007 – 0,0041

As CL₅₀ do Cádmiio para o período de exposição de 24, 48, 72 e 96 horas foram respectivamente 0,0154 mg.L⁻¹, 0,0106 mg.L⁻¹, 0,0027 mg.L⁻¹ e 0,0017 mg.L⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 3: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ de *Palaemon pandaliformis* expostos ao Cádmio + 1,0 mg.L⁻¹ de GO, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.

Tempo de Exposição(h)	Concentração de Cádmio (mg.L ⁻¹) + 1,0 mg.L ⁻¹ de Óxido de Grafeno									CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Intervalo Confiança
	0,0	0,0005	0,0010	0,0025	0,0050	0,0100	0,0500	0,1000	0,2500		
24	0,00	13,33	16,67	33,33	33,33	73,33	83,33	100,0	100,0	0,0058	0,0038 – 0,0089
48	0,00	13,33	36,67	46,67	63,33	80,0	96,67	100,0	100,0	0,0025	0,0017 – 0,0037
72	3,33	26,67	56,67	56,67	73,33	83,33	96,67	100,0	100,0	0,0013	0,0009 – 0,0021
96	3,33	36,67	56,67	60,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0010	0,0006 – 0,0018

As CL₅₀ do Cádmio + 1,0 mg.L⁻¹ de GO para o período de exposição de 24, 48, 72 e 96 horas foram respectivamente 0,0058, 0,0025, 0,0013 e 0,0010 mg.L⁻¹. Ao serem comparadas, as CL₅₀ do Cd + 1,0 mg L⁻¹ de GO foram respectivamente 2,7, 4,2, 2,0 e 1,7 vezes menores que a CL₅₀ do Cd (Tabelas 2 e 3).

Tabela 4: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ de *Palaemon pandaliformis* expostos ao Zinco, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.

Tempo de Exposição(h)	Concentração de Zinco (mg.L ⁻¹)							CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Intervalo de Confiança
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0		
24	0,00	6,66	10,0	63,33	93,33	96,67	100,0	0,89	0,70 – 1,14
48	0,00	23,33	40,0	76,67	93,33	96,67	100,0	0,49	0,31 – 0,78
72	0,00	36,67	50,0	86,67	100,0	100,0	100,0	0,36	0,15 – 0,85
96	3,33	46,67	60,0	93,33	100,0	100,0	100,0	0,22	0,05 – 1,05

A CL₅₀ do Zinco nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram respectivamente 0,89, 0,49, 0,36 e 0,22 mg.L⁻¹, evidenciando-se relação direta do aumento da toxicidade com o tempo de exposição (Tabela 4).

Tabela 5: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ de *Palaemon pandaliformis* expostos ao Zinco + 1,0 mg.L⁻¹ de GO, n=30. Os valores são as médias das triplicatas.

Tempo de Exposição(h)	Concentração de Zinco (mg.L ⁻¹) + 1,0 mg.L ⁻¹ de Óxido de Grafeno								
	0,00	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Intervalo de Confiança
24	0,00	6,67	33,33	86,67	93,33	100,0	100,0	0,53	0,40 – 0,69
48	0,00	16,67	60,0	93,33	96,67	100,0	100,0	0,32	0,23 – 0,45
72	0,00	40,0	70,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,17	0,08 – 0,35
96	3,33	50,0	83,33	100,0	100,0	100,0	100,0	0,12	0,06 – 0,24

As CL₅₀ do Zn + 1,0 mg.L⁻¹ de GO para os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram respectivamente 1,7, 1,5, 2,1 e 1,8 vezes menores que as CL₅₀ do Zn, evidenciando-se o aumento da toxicidade quando houve combinação destes contaminantes (Tabelas 4 e 5).

3.3. Consumo Específico de Oxigênio

3.3.1. GO

Observou-se uma tendência de aumento e queda do consumo específico de oxigênio de *P. pandaliformis* à medida que as concentrações de GO foram elevadas (Figura 3). Ainda assim, ao aplicar o método estatístico (ANOVA) não houve diferença significativa das médias em relação ao controle.

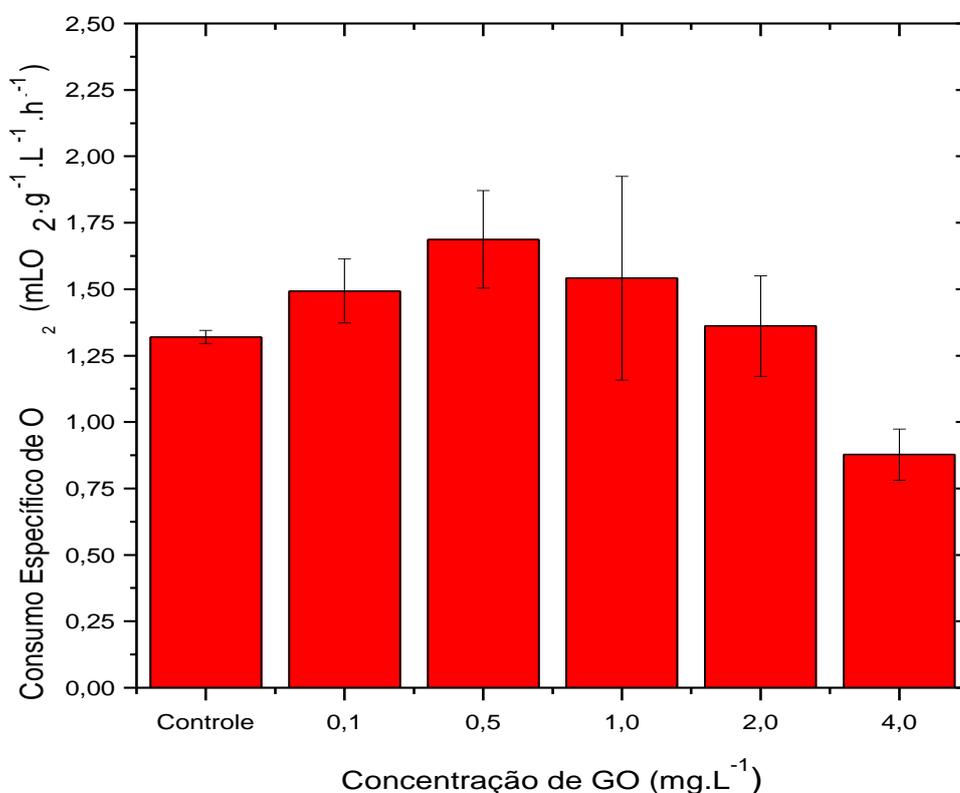


Figura 3: Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de GO. Barras são os respectivos desvios padrões.

3.3.2. Cd

Observou-se aumento do consumo específico de oxigênio seguido de queda à medida que as concentrações de Cd foram elevadas (Figura 4). Ao aplicar testes estatísticos, constatou-se diferença significativa das médias nas concentrações 0,02, 0,04, e 0,05 em relação ao controle (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).

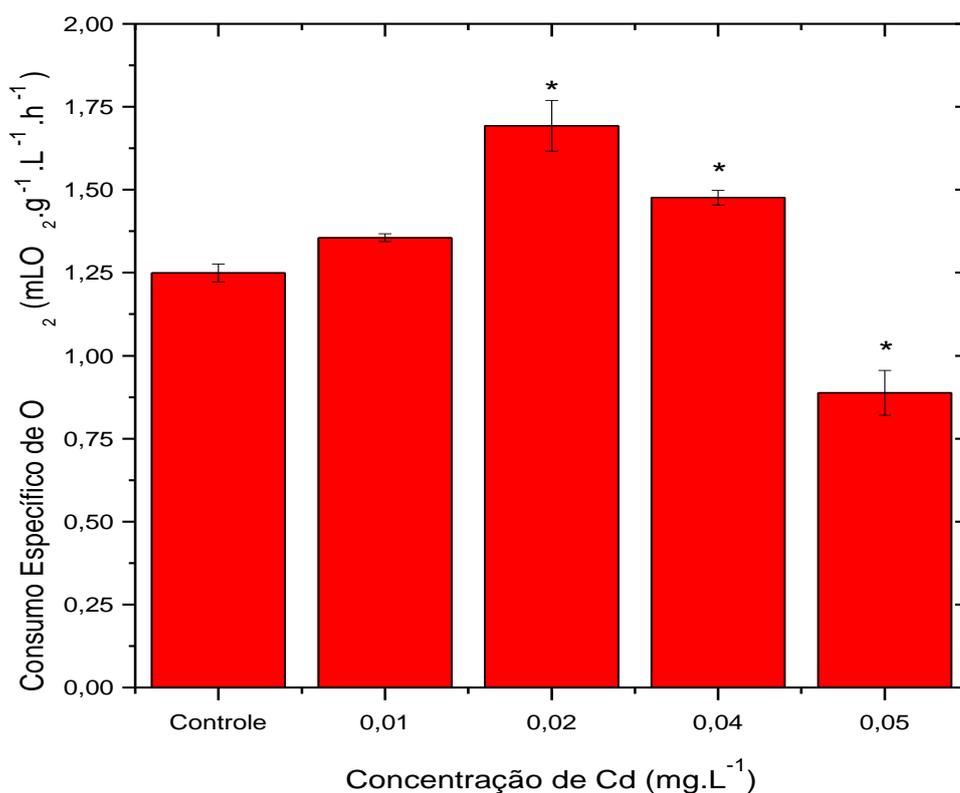


Figura 4: Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Cd. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.3.3. Cd + GO

O consumo específico de oxigênio dos espécimes de *P. pandaliformis* expostos a concentrações crescentes de Cd + GO demonstrou uma tendência de aumento e queda. Entretanto, não houve diferença significativa das médias em relação ao controle (Figura 5), (ANOVA).

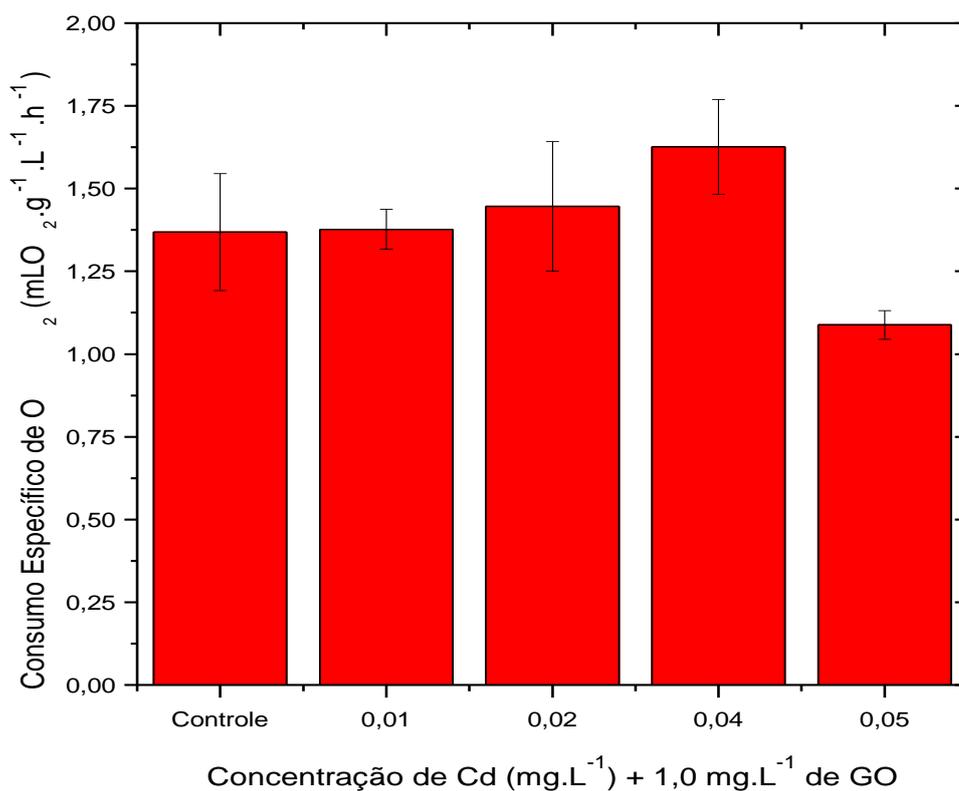


Figura 5: Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Cd + GO. Barras são os respectivos desvios padrões.

3.3.4. Zn

Nas concentrações de Zn estudadas nesse trabalho observou-se aumento do consumo específico de oxigênio nas concentrações 0,2, 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, representando um aumento de 105%, 30% e 27% respectivamente, em relação ao controle (Figura 6). Já nas concentrações 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ foram observadas quedas de 35% e 58%, respectivamente. Houve diferença significativa em todas as concentrações deste experimento em relação à média do controle (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).

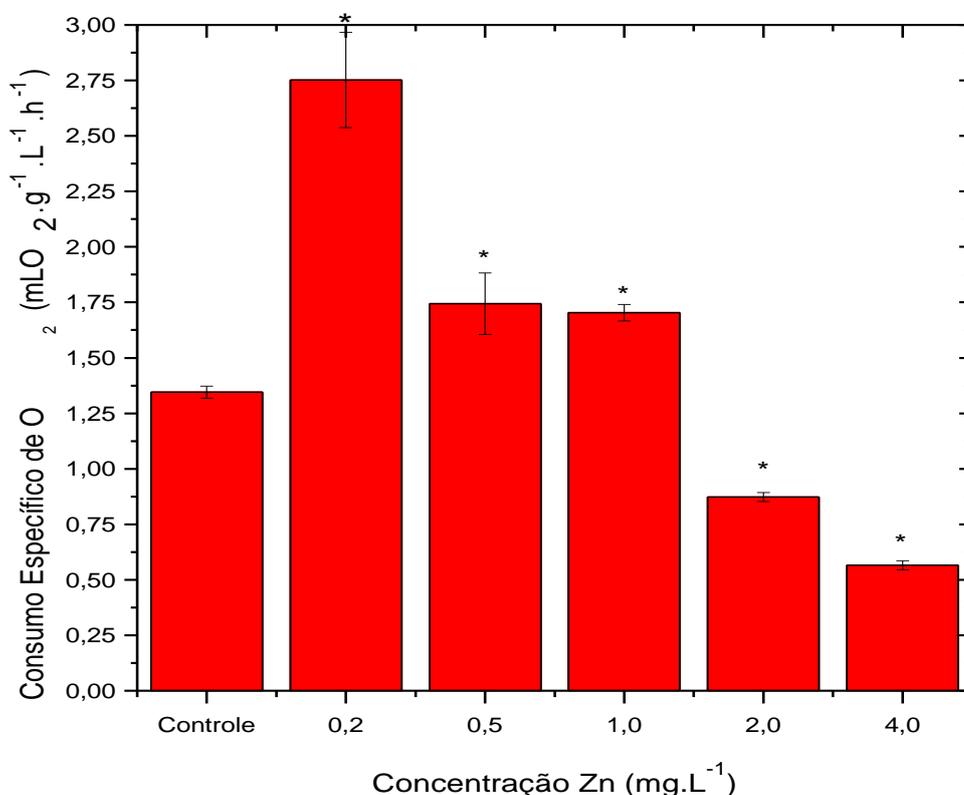


Figura 6: Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Zn. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.3.5. Zn + GO

Ao estudar o acréscimo de 1mg de GO às concentrações de Zn, observou-se aumento do consumo específico de oxigênio de 100% e queda de 40% em relação ao controle nas concentrações 0,2 e 4,0 mg.L⁻¹, respectivamente (Figura 7). Constatou-se diferença significativa das médias nas concentrações 0,2 e 4,0 mg.L⁻¹ quando comparadas ao controle (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).

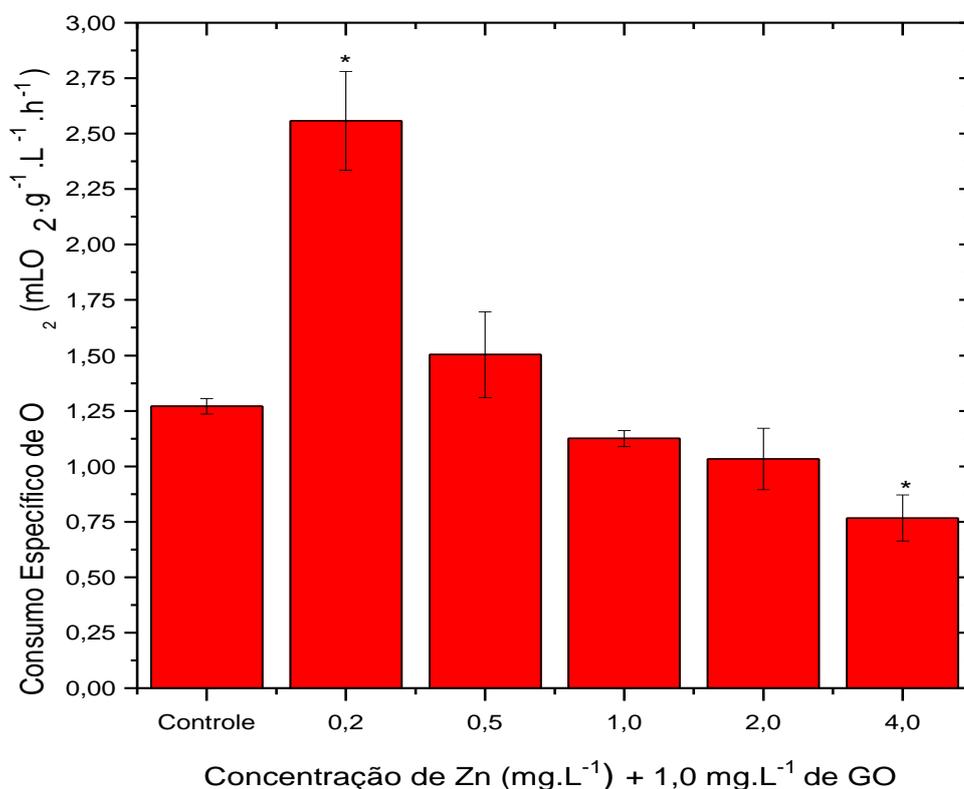


Figura 7: Média do consumo específico de oxigênio em relação à variação da concentração de Zn + GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.4. Excreção Específica de Amônia

3.4.1. GO

Houve uma tendência de queda da excreção específica de amônia à medida que aumentou a concentração de GO (Figura 8). Entretanto, apenas nas concentrações 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹, observou-se diferença significativa com declínio da excreção de 93% e 95%, respectivamente, em relação ao controle (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).

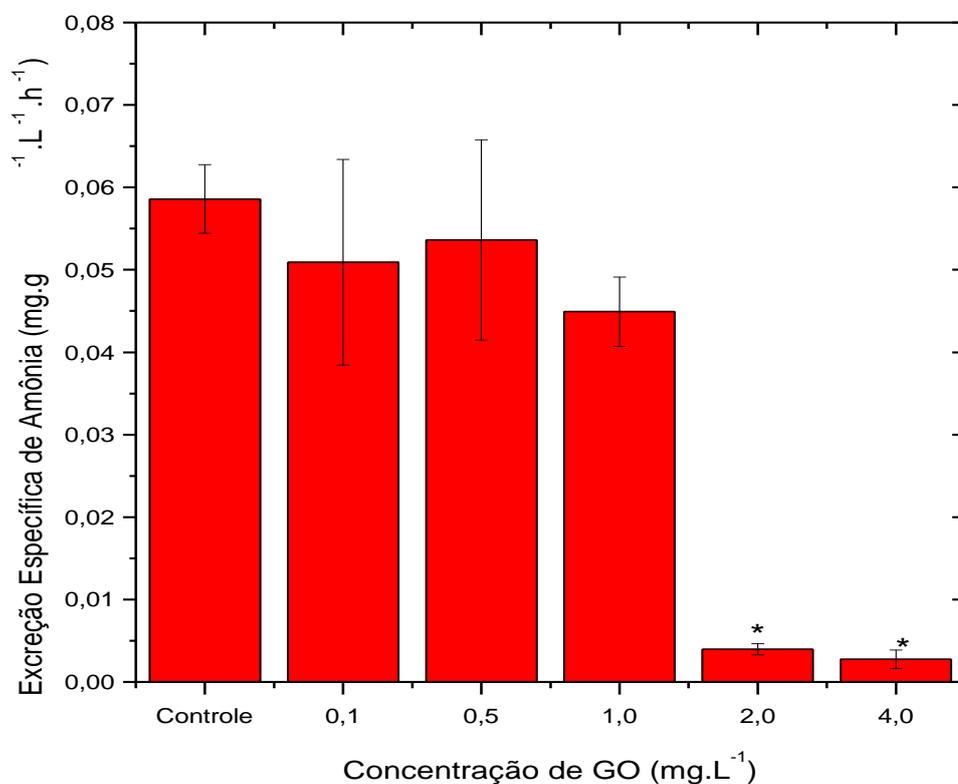


Figura 8: Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.4.2. Cd

Os camarões expostos ao Cd apresentaram redução da excreção específica de amônia à medida que a concentração foi elevada (Figura 9). Houve diferença significativa das médias nas concentrações 0,02, 0,04 e 0,05 mg.L^{-1} , constatando-se declínio de 68%, 87% e 93%, respectivamente, em relação ao controle (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).

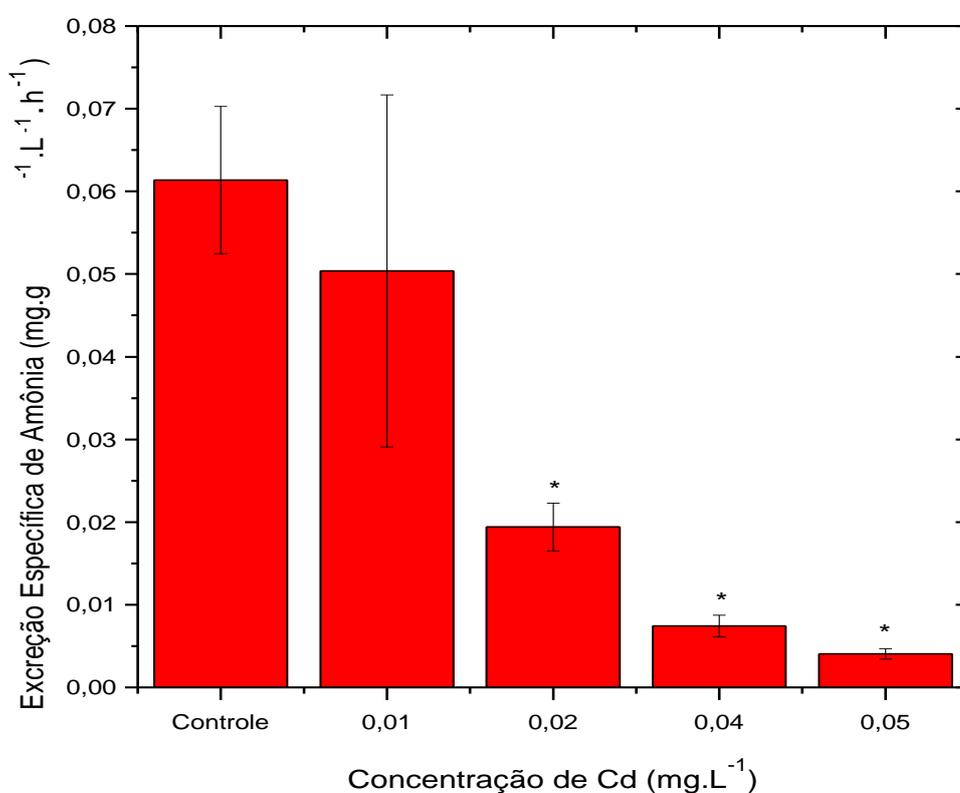


Figura 9: Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Cd. * Diferença significativa em relação ao controle ($0,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.4.3. Cd + GO

A excreção específica de amônia aumentou na concentração 0,01 mg.L⁻¹, evidenciando-se elevação de 38% em relação ao controle (Figura 10). Houve diminuição significativa nas concentrações 0,02 e 0,04 mg.L⁻¹, em relação à concentração 0,01 mg.L⁻¹. Na concentração 0,05 mg.L⁻¹ a excreção específica de amônia diminuiu para 59% quando comparada ao controle. Utilizando-se o teste estatístico (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$) foi constatada diferença significativa das médias nas concentrações 0,01 e 0,05, em relação ao controle.

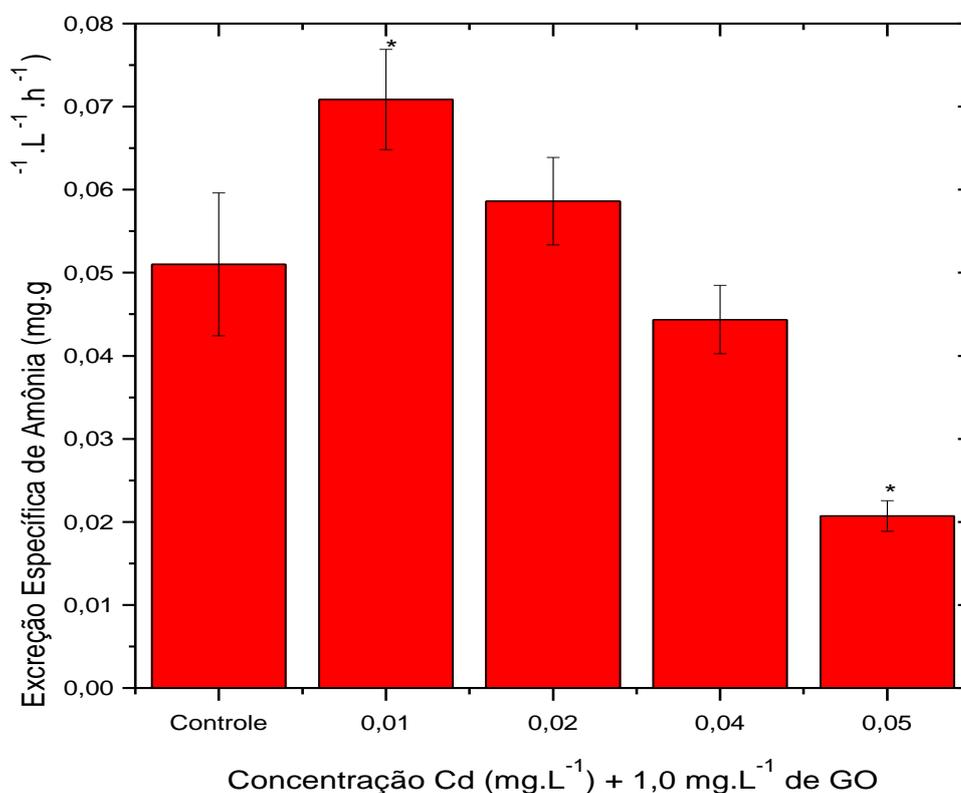


Figura 10: Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Cd + GO. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.4.4. Zn

A excreção específica de amônia dos espécimes de *P. pandaliformis* expostos ao Zn apresentou tendência de aumento e queda (Figura 11). Na concentração 4,0 mg.L⁻¹ constatou-se diferença significativa, com declínio de 47% em comparação ao controle (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).

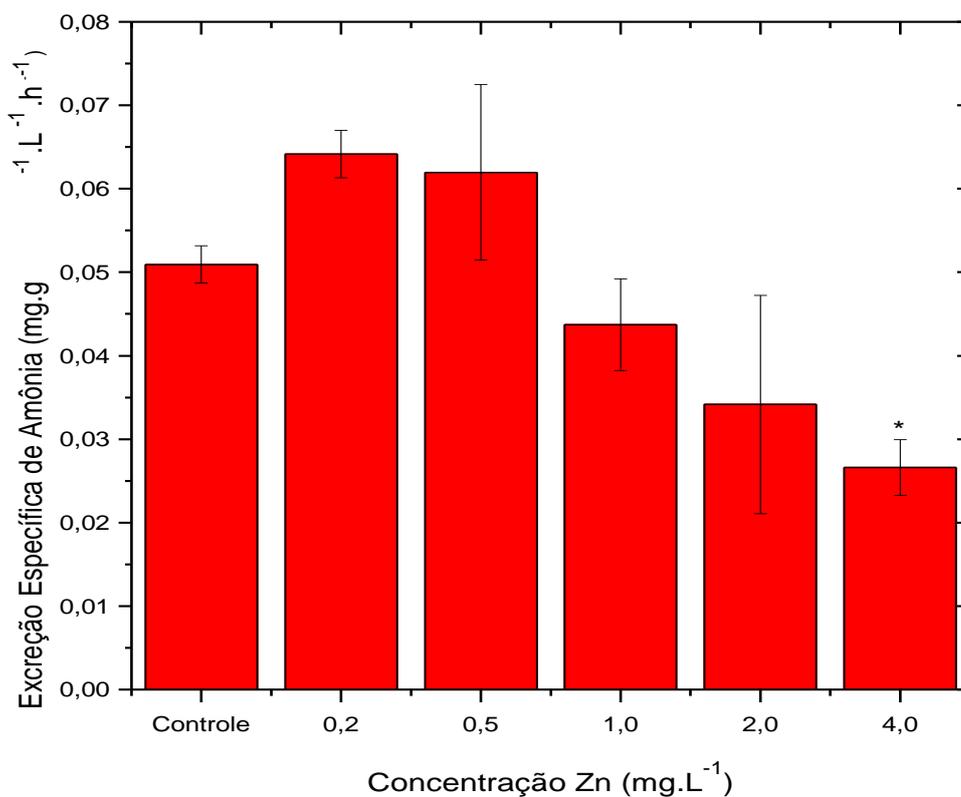


Figura 11: Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Zn. * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹). Barras são os respectivos desvios padrões.

3.4.5. Zn + GO

A excreção específica de amônia, de um modo geral, para esta espécie estudada, diminuiu com o incremento da concentração de Zn + GO (Figura 12). Observou-se diferenças significativas em relação ao controle nas concentrações 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹, representando queda de 42%, 63%, 63% e 84%, respectivamente (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$). Quando houve combinação de Zn com GO, observou-se que as médias nas concentrações 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ foram respectivamente 18%, 53%, 57% 46% e 70% menores que as médias nas concentrações correspondentes do tratamento com Zn (Figuras 11 e 12).

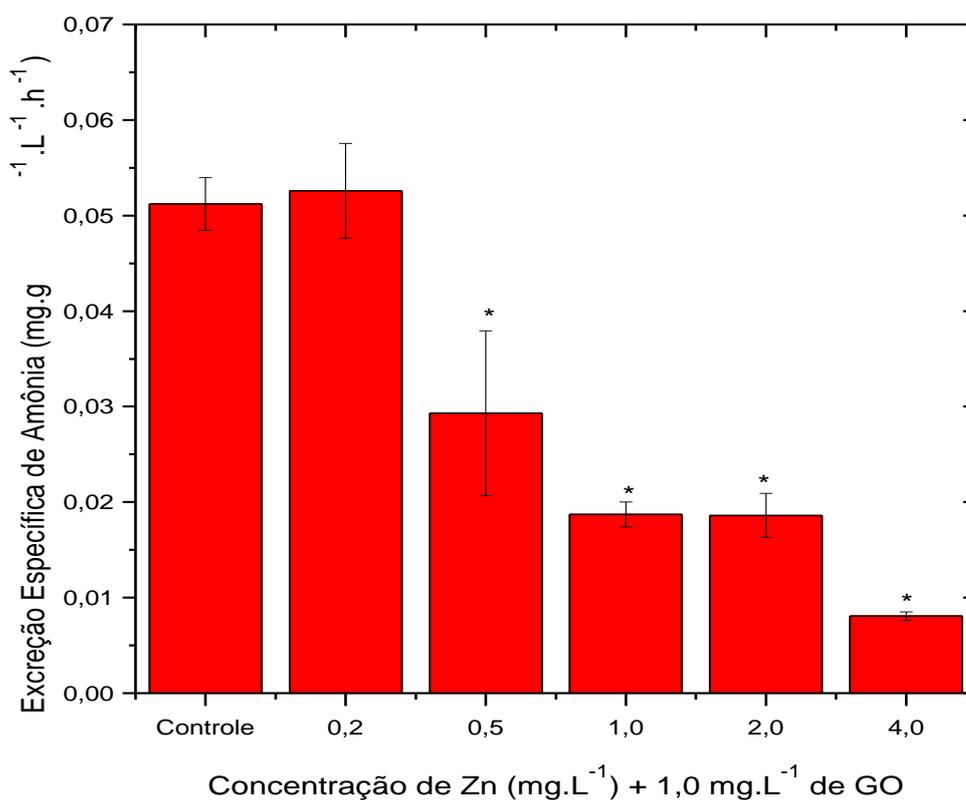


Figura 12: Média da excreção específica de amônia em relação à concentração de Zn + GO * Diferença significativa em relação ao controle (0,0 mg.L⁻¹).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo de toxicidade aguda e de metabolismo de rotina indicam que a espécie de camarão, *Palaemon pandaliformis*, foi sensível ao GO, ao Cd, ao Zn e ao GO associado a estes ETs, assim como outros invertebrados demonstraram sensibilidade ao GO e aos ETs em estudos anteriores (Barbieri, 2009; Baun et al., 2008a; Durán et al., 2015a; Guo e Mei, 2014; Mesarič et al., 2013; Tavares et al., 2014).

Ao avaliar a nanoecotoxicidade do GO, Duran et al. (2015a) observaram que este NM não causou letalidade aos nematódeos *Caenorhabditis elegans*, assim como aos crustáceos *Daphnia similis* e *P. pandaliformis*. Segundo estes autores, não foram notados efeitos de toxicidade ao expor espécimes de *P. pandaliformis* ao GO ($3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por 24h, assim como ao submeter os espécimes de *C. elegans* e de *D. similis* a diferentes concentrações de GO ($0,1-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Similarmente, no presente estudo, ao expor camarões da mesma espécie a diferentes concentrações de GO (até $5,0 \text{mg.L}^{-1}$), também não foi observada toxicidade nos períodos de 24, 48, 72 e 96h ($\text{CL}_{50}96\text{h}$). No entanto, Durán et al. (2015a) observaram que a partir das concentrações de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de GO, houve encurtamento de tentáculos do organismo *Hydra attenuata* após 72h de exposição, além de morte e desintegração após exposição a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por 96h.

Ao investigar os efeitos de toxicidade do Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas (NTCPM), do Óxido de Grafeno Reduzido (GOr) e do GO, Liu et al (2014) concluíram que estes três nanomateriais foram tóxicos ao peixe, *Danio rerio*, pois houve redução do tamanho larval e da eclosão dos embriões, mesmo não sendo observadas evidências de mal formação ou mortalidade nos testes de toxicidade aguda. Gollavelli e Ling (2012) não observaram anomalias ou alterações significantes na taxa de sobrevivência dos embriões do *D. rerio*, ao expô-los ao grafeno multifuncionalizado (revestido de ácido poliacrílico e fluoresceína o-metacrilato), mesmo constatando distribuição do grafeno da cabeça à cauda do peixe zebra. Já Mesarič et al. (2013) observaram efeitos de toxicidade ao expor os náuplios dos cirripédios, *Anphibalanus amphitrite*, a

diferentes concentrações (0,01, 0,1 e 0,5 mg.mL⁻¹) de GO de camada simples, evidenciados pelo LC₅₀48h de 0,56 mg.mL⁻¹.

Os resultados de CL₅₀ do presente estudo demonstram que o GO de camada simples influenciou na toxicidade do Cd e do Zn sobre o *P. pandaliformis*, visto que quando o GO foi associado a estes ETs, suas CL₅₀96h foram 1,7 e 1,8 menores, respectivamente. Martinez et al. (2013b), observaram efeitos de potenciação ao expor a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao nanotubo de carbono associado ao Pb. Da mesma forma, Campos-Garcia et al. (2015) constataram potenciação na interação dos NTCPM com o carbofurano, ao estudar os efeitos da toxicidade aguda na tilápia do Nilo, *O. niloticus*. Baun et al. (2008) revelaram absorção consideravelmente mais rápida do fenantreno na presença de fulereno pela *Daphnia magna*, provavelmente por causa da capacidade de transporte destas NPs. Zhang et al. (2007) relataram aumento da assimilação do Cd quando as carpas, *Cyprinus carpio* foram expostas concomitantemente ao Cd e às nanopartículas de TiO₂.

Em estudos de adsorção do GO aos elementos químicos bivalentes, Stiko et al. (2013) observaram grande capacidade de adsorção do GO ao Cd e ao Zn, com maior afinidade ao Cd que ao Zn (Sitko et al., 2013). Foi observado ainda que a capacidade de adsorção do GO ao Cd e ao Zn se mantém constante na faixa de pH 5-8, visto que é também neste intervalo de pH que mais de 99% do Cd e mais de 90% do Zn são solubilizados na forma iônica livre (Depci et al., 2012; Sitko et al., 2013; Zhao et al., 2011). A complexação do GO ao Cd e ao Zn sucede quando o GO partilha os pares de elétrons, disponíveis nos grupos funcionais de oxigênio dos seus planos basais e arestas, com os íons dos ETs, ocorrendo sorção química (Deng et al., 2010; He et al., 2011; Sitko et al., 2013). Nos experimentos deste trabalho, os *P. pandaliformis* foram expostos ao GO e ao GO associado ao Cd e ao Zn em água mineral com pH 7,28, indicando que a capacidade de adsorção do GO a estes ETs foi constante, como observados nos estudos de Sitiko et al. (2013).

São vários os fatores que podem influenciar a interação do GO com a biota, mas sabe-se que quanto menor o seu número de camadas, maior é a área de superfície e, teoricamente, maior a sua capacidade de interação biológica e,

consequentemente, de ser internalizado em nível celular (Das et al., 2013; Guo e Mei, 2014; Yue et al., 2012). O GO utilizado neste estudo apresenta camada simples, como demonstrado por microscopia de força atômica (AFM), indicando maior biodisponibilidade e capacidade de ser internalizado pelo *P. pandaliformis*.

A toxicidade e assimilação dos poluentes podem ser afetadas quando expostas concomitantemente com os NMs (Boncel et al., 2015; Campos-Garcia et al., 2016, 2015; Ferreira et al., 2014). Zhao et al (2014) concluíram que a associação dos grafenos com outros poluentes presentes no meio aquático pode alterar o transporte, acúmulo e toxicidade de ambos, visto que a biodisponibilidade de um poluente depende da capacidade e cinética de adsorção do NM associada à capacidade de assimilação do organismo estudado (Ferguson et al., 2008; Zhang et al., 2007; Zhao et al., 2014). Neste sentido, o aumento da toxicidade do Cd e do Zn, observado no atual estudo, ocorreu devido à capacidade de adsorção do GO a estes ETs (Deng et al., 2010; Sitko et al., 2013), assim como à capacidade de transporte do GO (Durán et al., 2015b; Liu et al., 2013), que alterou a toxicidade do Cd e do Zn sobre o *P. pandaliformis*.

Verificou-se que a $CL_{50}96h$ $0,0017 \text{ mg.L}^{-1}$ do Cd nestes estudos com o *P. pandaliformis* foi menor que as $CL_{50}96h$ observadas em outros trabalhos de toxicidade com este ET: *Exopalaemon carinicauda* $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$ (Zhang et al., 2014), *Litopenaeus vannamei* $1,07 \text{ mg.L}^{-1}$ (Wu e Chen, 2004), *Litopenaeus schmitti* $0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ (Barbieri, 2007), *Farfantepenaeus paulensis* $0,83 \text{ mg.L}^{-1}$ (Barbieri, 2009), *Penaeus monodon* $1,72 \text{ mg.L}^{-1}$ (Rajkumar et al., 2011) e *Xiphopenaeus kroyeri* $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ (Barbieri et al., 2013). Da mesma forma, observou-se maior toxicidade do Zn ($CL_{50}96h$ $0,22$) sobre o *P. pandaliformis*, ao compará-la com a de outras espécies de camarões estuarinos: *L. vannamei* $1,35 \text{ mg.L}^{-1}$ (Wu e Chen, 2004), *P. monodon* $2,36 \text{ mg.L}^{-1}$ (Rajkumar et al., 2011) e *F. paulensis* $3,31 \text{ mg.L}^{-1}$ (Barbieri, 2009). As diferenças dos valores de dose letal média, mesmo entre espécies filogeneticamente próximas, podem acontecer devido à relação tamanho-peso e ao fato de existirem diferentes respostas bioquímicas ou distintas condições fisiológicas, qualitativa e quantitativamente, entre as espécies (Klaassen, 2013). Essa variação grande

dos valores de CL₅₀ pode ser notada tanto inter quanto intraespecificamente, portanto as diferenças devem ser avaliadas e interpretadas com cautela, levando em consideração os diferentes fatores dos experimentos e dos espécimes utilizados (Hernández-Moreno et al., 2011). Outro fator importante a ser considerado ao comparar os valores de CL₅₀ é que a biodisponibilidade do Cd e do Zn diminui com o aumento da salinidade. Os experimentos deste estudo foram realizados com água mineral, visto que o *P. pandaliformis* é frequentemente encontrado em ambientes de água doce, ao passo que o *L. schimittii*, o *L. vannamei* e o *F. paulensis* são espécies marinhas.

Observou-se que o GO associado ao Cd exibiu maior toxicidade que o GO associado ao Zn, indicando maior sensibilidade do *P. pandaliformis* ao GO + Cd. Neste sentido, Wu e Chen (2004), Barbieri (2007) e Barbieri et al. (2013) perceberam maior toxicidade do Cd em relação ao Zn em estudos realizados com camarões. Os crustáceos decápodes não apresentam qualquer evidência de regulação interna do Cd (Pedersen e Bjerregaard, 2000; Soegianto et al., 1999; White e Rainbow, 1986), que é um elemento não essencial aos processos metabólicos, sem função fisiológica e podendo ser tóxico mesmo em concentrações muito baixas (Pinot et al., 2011; Playle et al., 1993; Wang e Rainbow, 2006). Somado a isso, o influxo de água é aumentado com a redução da salinidade, elevando os efeitos adversos do ETs aos organismos de água doce (Wright e Welbourn, 1994; Zanders e Rojas, 1996). Portanto, a maior toxicidade do Cd associado ao GO pode ser atribuída ao aumento de seu influxo pelo *P. pandaliformis* devido a três fatores: aumento de assimilação do Cd quando associado ao GO, incapacidade de osmoregulação deste ET e influxo de água elevado pelos organismos de água doce.

Já o Zn, um ET essencial à manutenção de funções biológicas importantes, é internamente regulado pelos crustáceos decápodes, exigindo maiores concentrações para desencadear efeitos adversos de toxicidade (Rainbow, 1997; Stefanidou et al., 2006; White e Rainbow, 1984). Brinkman e Johnston (2011) concluíram que os invertebrados bentônicos são mais tolerantes ao Zn. Ainda assim, notou-se que o efeito de toxicidade do Zn aumentou ao interagir com o GO, sugerindo também, aumento de sua biocompatibilidade e assimilação pelo *P. pandaliformis*.

A exposição dos crustáceos aos poluentes, assim como aos ETs, ocorre através de fontes alimentares e do meio circundante, que podem ser adsorvidos ao seu exoesqueleto e/ou assimilados via superfícies corporais permeáveis (Brinkman e Johnston, 2011; Ortega et al., 2014; Wright e Welbourn, 1994). A principal via de entrada dos ETs nos crustáceos ocorre através de vias paracelulares, junções ou entradas transcelulares branquiais (Pedersen e Bjerregaard, 2000), sendo que as proteínas presentes nas estruturas das células das membranas epiteliais são a chave para a entrada dos poluentes nos crustáceos (Rainbow, 1997). Visto que não houve oferta de alimento durante os experimentos, o GO pode ter elevado a biocompatibilidade do Cd e do Zn sobre as brânquias do *P. pandaliformis*, tornando-se necessárias futuras avaliações histológicas. Campos-Garcia et al. (2015, 2016) constataram alterações nas brânquias da tilápia do Nilo, além de potenciação da toxicidade do carbofurano quando associado com os nanotubos de carbono.

Quando os NMs carregam ou facilitam a entrada de elementos tóxicos para o interior das células, este mecanismo é denominado efeito “Trojan Horse” (Boncel et al., 2015; Ferreira et al., 2014). Em um estudo com carpas, a bioacumulação do Cd foi 2,5 vezes maior na presença das NPs de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (Zhang et al., 2007). Do mesmo modo, Fan et al. (2011), mostraram que as nano-TiO₂ aumentaram a bioacumulação e toxicidade do Cu sobre a *Daphnia magna*. No atual estudo, quando houve exposição concomitante do GO com o Cd e o Zn, a toxicidade do Cd foi 1,7 vezes maior e a do Zn foi 1,8 vezes maior, indicando efeito “Trojan Horse”. São poucos e recentes os estudos de nanoecotoxicidade que avaliam a interação dos NMs alótropos do carbono com outros poluentes no meio aquático (Baun et al., 2008b; Boncel et al., 2015; Campos-Garcia et al., 2015; Ferreira et al., 2014). O GO apresenta grupos funcionais em sua superfície que aumentam sua solubilidade, biocompatibilidade e capacidade de adsorção e de carrear elementos químicos para o interior das células (Chowdhury et al., 2013; Das et al., 2013; Durán et al., 2015b; Liu et al., 2013; Sanchez et al., 2012; Yang et al., 2013). Estes são fatores importantes a serem considerados, visto que o GO pode alterar a biodisponibilidade de elementos naturais e xenobióticos presentes no ecossistema aquático.

Os efeitos dos ETs na respiração de crustáceos decápodes vêm sendo amplamente estudados por vários pesquisadores, pois podem alterar o metabolismo destes organismos sob a influência de fatores físico-químicos (concentração, pH, temperatura, salinidade e tempo de exposição) e biológicos (peso e fase do ciclo de vida) (Barbieri et al., 2016, 2013; Barbieri e Doi, 2011; Chinni et al., 2002; Santos et al., 2014; St-Amand et al., 1999; Wu e Chen, 2004). No atual trabalho, constataram-se alterações no consumo de oxigênio à medida que as concentrações de Cd e Zn aumentaram, refletindo elevação e inibição do metabolismo do *P. pandaliformis*. A toxicidade de um ET pode ser observada em um organismo quando a taxa de captação é superada pelas taxas de excreção e desintoxicação combinadas, assim sendo, a concentração interna do ET metabolicamente disponível aumenta e desencadeia os efeitos tóxicos (Rainbow, 2002). Os efeitos tóxicos do Cd e do Zn nas superfícies branquiais dos crustáceos interferem em sua função respiratória e transporte iônico, acarretando em redução da transferência de gases e do consumo de oxigênio (Harris e Santos, 2000; Matsuo et al., 2005).

O consumo de oxigênio não foi afetado quando o *P. pandaliformis* foi exposto a diferentes concentrações de GO, isoladamente, por duas horas. Duran *et al.* (2015), também não observaram efeitos sobre o consumo de oxigênio ao expor o *P. pandaliformis* a $1\mu\text{m}.\text{mL}^{-1}$ de GO por 24 horas. Ao expor a tilápia do Nilo, *O. niloticus*, a diferentes concentrações (0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$) de NTCPM, Campos-Garcia et al. (2015) perceberam pequenas variações no consumo de oxigênio, mas sem diferença significativa quando comparadas ao controle. Já Martinez et al. (2013) constataram redução de 58% do consumo de oxigênio, em relação ao controle, ao expor a tilápia do Nilo a $1,0\text{ mg}.\text{L}^{-1}$ de NTCPM.

Notou-se aumento de até 105% e queda de até 27% do consumo de oxigênio, em relação ao controle, quando os espécimes de *P. pandaliformis* foram expostos ao Cd, ao Zn e ao Zn associado ao GO, indicando aumento e queda do metabolismo. Zhang et al. (2014) observaram que o Cd e o Cu diminuíram o consumo de oxigênio do *E. carinicauda* em 21,1% e 34,8%, respectivamente, em relação ao controle. Da mesma forma, Wu e Chen (2004) constataram que o consumo de oxigênio do *L. vannamei* foi 91,3% e 75,9%

menor que o controle, quando exposto ao Cd e Zn, respectivamente. Chinni et al. (2000, 2002) também constataram queda no consumo de oxigênio ao expor o *Penaeus indicus* ao alumínio. Neste sentido, Martinez et al. (2013) e Campos- Garcia et al. (2015) notaram redução do consumo de oxigênio ao expor a tilápia do Nilo, *O. niloticus*, ao NTCPM associado ao Pb e ao carbofurano. Segundo esses autores, a toxicidade dos contaminantes foi maximizada quando foram associados ao NM. Em revisão sobre os efeitos dos ETs sobre o consumo de oxigênio dos crustáceos, Spicer e Weber (1991) concluíram que quando o consumo de oxigênio diminui há indicações de danos patológicos com interferência em um ou vários processos respiratórios (ventilação, respiração celular, perfusão, trocas e transferências gasosas). O aumento do consumo de oxigênio indica compensação fisiológica imediata, ou de longo prazo, mas geralmente, quando os crustáceos são expostos de forma aguda aos ETs, o consumo de oxigênio diminui (Spicer e Weber, 1991).

Smith et al. (2007) estudaram os efeitos do Nanotubo de Carbono de Parede Simples (NTCPS) na truta (*Oncorhynchus mykiss*) e perceberam alterações em suas brânquias e redução de sua eficiência respiratória, evidenciando o efeito tóxico deste NM sobre a respiração. Portanto, a queda do consumo de oxigênio pelo *P. pandaliformis*, pode estar relacionada aos efeitos deletérios da interação do GO com o Cd e o Zn sobre as brânquias, um importante órgão de respiração dos crustáceos decápodes, assim como aos seus outros processos respiratórios, visto que pode ser constatada toxicidade do GO a diversos tipos celulares (Liu et al., 2014; Seabra et al., 2014; Singh, 2016; Zhao et al., 2014).

Duran et al. (2015), não evidenciaram alterações na excreção de amônia ao expor camarões desta mesma espécie a $1,0 \mu\text{m.L}^{-1}$ de GO, por 24 horas. Nestes estudos, os espécimes de *P. pandaliformis* foram expostos por duas horas a concentrações maiores e reduziram a excreção de amônia apenas nas concentrações $2,0$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$, chegando a uma queda de 95%. Portanto, o GO isoladamente alterou o metabolismo do *P. pandaliformis*, que só foi percebido através das análises da excreção de amônia, visto que os experimentos de toxicidade aguda, assim como os de consumo de oxigênio não demonstraram efeitos de toxicidade.

Neste trabalho, também foram observadas diminuição da excreção de amônia quando o *P. pandaliformis* foi exposto ao Cd, ao Zn e ao GO associado ao Zn, chegando a 93% de queda. No entanto, constatou-se aumento e queda da excreção de amônia quando exposto à interação do GO com o Cd. Santos *et al.* 2014, avaliaram o efeito do Pb no camarão branco, *Litopenaeus schimitti*, em diferentes salinidades e observou-se que na maior concentração empregada de Pb houve aumento de 88,2% da excreção específica de amônia, em relação ao controle. Wu e Chen (2004) e Barbieri *et al.* (2013b), também observaram aumento da excreção de amônia ao expor os camarões *L. vanamei* e *X. kroyeri* ao Cd e ao Zn. Wu e Chen (2004) consideraram que as elevações da excreção de amônia estariam relacionadas à queda da pressão osmótica da hemolinfa do *L. vanamei*. A redução da excreção de amônia de até 95% observada neste estudo sugere menor pressão osmótica na hemolinfa (Wu e Chen, 2004) e falência do sistema de osmoregulação dos organismos teste. A excreção de amônia dos crustáceos é originada do catabolismo de aminoácidos, provenientes de fontes alimentares ou musculares (Weihrauch, 2004). Normalmente, o aumento da excreção de amônia é uma resposta do aumento no catabolismo de aminoácidos, mas quando os organismos são expostos a concentrações letais de ETs, ocorrem lesões branquiais e a excreção de amônia é desregulada (Wu e Chen, 2004). Os primeiros órgãos afetados dos crustáceos pelos ETs são provavelmente as brânquias, podendo causar danos histológicos e citológicos (Chinni *et al.*, 2000; Wu e Chen, 2004).

As brânquias são estruturas vitais de respiração, regulação osmótica e iônica assim como o balanço ácido/básico, que ao serem expostas a poluentes orgânicos e inorgânicos (maiores, menores e traço), podem sofrer danos morfológicos acarretando em deficiência respiratória e osmoregulatória (Freire *et al.*, 2003; Soegianto *et al.*, 1999). No entanto, as brânquias apresentam células específicas que realizam respiração e outras que realizam absorção e excreção de amônia (Castilho-Westphal *et al.*, 2008; Tsai e Lin, 2007). Vários estudos relacionam os efeitos fisiológicos adversos das concentrações de Cd e Zn sobre a respiração e osmoregulação dos crustáceos decápodes (Barbieri, 2007; Barbieri *et al.*, 2013; Barbieri e Doi, 2011; Chinni *et al.*, 2002; Pedersen e Bjerregaard, 2000; Soegianto *et al.*, 1999; Wang e Rainbow, 2006; Wu e Chen,

2004; Zhang et al., 2014). Os resultados deste estudo registraram os efeitos adversos dos ETs e do GO tanto no consumo de oxigênio quanto na excreção de amônia do *P. pandaliformis*. As quedas de até 95% da excreção de amônia e de até 58% do consumo de oxigênio indicam a necessidade de novas investigações para identificar os órgãos afetados, assim como sugerem outros autores em estudos de nanoecotoxicidade dos grafenos (Bianco, 2013; Jastrzębska e Olszyna, 2015).

Os resultados deste trabalho confirmaram a hipótese de que os grafenos podem alterar a toxicidade do Cd e do Zn, visto que houve aumento da toxicidade quando houve interação do GO com estes ETs, indicando cautela no uso de GO para remediações ambientais assim como o seu descarte no meio aquático.

Existem diferentes estudos que avaliaram e associaram as potenciais toxicidades do GO às suas propriedades funcionais de adsorver e carrear elementos químicos para o interior dos organismos (Durán et al., 2015a, 2015b; Guo e Mei, 2014; Jastrzębska e Olszyna, 2015; Liu et al., 2013, 2014; Seabra et al., 2014; Zhang et al., 2013), mas ainda são poucos os estudos que avaliam os seus efeitos sobre os organismos aquáticos, assim como sua interação com os elementos químicos presentes nestes ecossistemas (He et al., 2014; Moore, 2006; Zhao et al., 2014). Neste sentido, Guo e Mei (2014) ressaltaram a necessidade de esclarecimentos dos possíveis efeitos adversos dos grafenos sobre os organismos, visto que há um consenso de que estes NMs são citotóxicos e genotóxicos em pesquisas *in vitro* e *in vivo*.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o *P. pandaliformis* é um organismo que pode ser utilizado em testes de toxicidade por ser de ampla distribuição e sensível ao GO, ao Cd e ao Zn.

O GO interferiu na toxicidade do Cd e do Zn, provavelmente, por suas capacidades de adsorver e de entregar estes poluentes no interior dos organismos-teste.

A amônia foi um bom biomarcador para se avaliar o efeito do GO.

A toxicidade aguda e o consumo de oxigênio do GO isoladamente não demonstraram efeitos adversos ao *Palaemon pandaliformis*, no entanto, houve queda de 93 e 95% da excreção de amônia, em relação ao controle, evidenciando toxicidade deste nanomaterial.

Novas investigações deveriam ser realizadas para melhor entender os mecanismos e vias de assimilação do GO pela a espécie estudada, assim como seu destino e interação com outros elementos químicos nos diversos compartimentos biogeoquímicos do meio aquático.

6. AGRADECIMENTOS

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido ao projeto que deu origem a esta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Pesca de São Paulo – Base de Cananeia, pela disposição de suas dependências assim como de seus funcionários que contribuíram na elaboração e desenvolvimento deste estudo.

À comissão de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – SAA, que tornam possível esse mestrado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S.M.O.R.N.L., 1990. Status and Use of Biological Indicators for Evaluating the Effects of Stress on Fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8, 1–8.
- Baalousha, M., Ju-Nam, Y., Lead, J.R., 2011. Natural colloids and engineered nanoparticles, in: *Treatise on Water Science*. Frimmel F., Germany, pp. 2–41.
- Barbieri, E., 2009. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 18, 312–318. doi:10.1007/s10646-008-0285-y
- Barbieri, E., 2007. Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 79, 641–646.
- Barbieri, E., Branco, J.O., Santos, M. do C.F., Hidalgo, K.R., 2013. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption and ammonia excretion of the sea-bob shrimp, according to temperature. *Bol. Inst. Pesca São Paulo Braz.* 39, 299–309.
- Barbieri, E., Doi, S.A., 2011. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 44, 251–263. doi:10.1080/10236244.2011.617606
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008a. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 17, 387–395. doi:10.1007/s10646-008-0208-y
- Baun, A., Sørensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N.B., Koch, C.B., 2008b. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquat. Toxicol.* 86, 379–387. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.019
- Bianco, A., 2013. Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 52, 4986–4997. doi:10.1002/anie.201209099

- Boncel, S., Kyzioł-Komosińska, J., Krzyżewska, I., Czupioł, J., 2015. Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems – A review. *Chemosphere* 136, 211–221. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.095
- Bond-Buckup, G., Buckup, L., 1989. Os palamonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Rev. Bras. Biol.* 49, 883–896.
- Brinkman, S.F., Johnston, W.D., 2011. Acute Toxicity of Zinc to Several Aquatic Species Native to the Rocky Mountains. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 272–281. doi:10.1007/s00244-011-9698-3
- Brodie, B.C., 1859. On the Atomic Weight of Graphite. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 149, 249–259. doi:10.1098/rstl.1859.0013
- Byrne, R.H., Kump, L.R., Cantrell, K.J., 1988. The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.* 25, 163–181. doi:10.1016/0304-4203(88)90062-X
- Callahan, M.A., Standards, U.S.E.P.A.O. of W.P. and, Division, U.S.E.P.A.O. of W.P. and S.M. and D.S., 1979. Water-related environmental fate of 129 priority pollutants. Office of Water Planning and Standards, Office of Water and Waste Management, U.S. Environmental Protection Agency.
- Campos-Garcia, J., Martinez, D.S.T., Alves, O.L., Leonardo, A.F.G., Barbieri, E., 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 131–137. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.10.005
- Campos-Garcia, J., Martinez, D.S.T., Rezende, K.F.O., da Silva, J.R.M.C., Alves, O.L., Barbieri, E., 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 481–488. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.07.041
- Castilho-Westphal, G.G., Ostrensky, A., Pie, M.R., Boeger, W.A., 2008. Estado da arte das pesquisas com o caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*. *Arch. Vet. Sci.* 13, 151–166.
- Chabot, V., Higgins, D., Yu, A., Xiao, X., Chen, Z., Zhang, J., 2014. A review of graphene and graphene oxide sponge: material synthesis and

- applications to energy and the environment. *Energy Environ. Sci.* 7, 1564–1596. doi:10.1039/C3EE43385D
- Charlesworth, S., Everett, M., McCarthy, R., Ordóñez, A., de Miguel, E., 2003. A comparative study of heavy metal concentration and distribution in deposited street dusts in a large and a small urban area: Birmingham and Coventry, West Midlands, UK. *Environ. Int.* 29, 563–573. doi:10.1016/S0160-4120(03)00015-1
- Chinni, S., Khan, R.N., Yallapragada, P.R., 2002. Acute toxicity of lead on tolerance, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in *Penaeus indicus* postlarvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 79–84. doi:10.1006/eesa.2000.2019
- Chinni, S., Khan, R.N., Yallapragada, P.R., 2000. Oxygen Consumption, Ammonia-N Excretion, and Metal Accumulation in *Penaeus indicus* Postlarvae Exposed to Lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 144–151. doi:10.1007/s001289910022
- Choi, W., Lahiri, I., Seelaboyina, R., Kang, Y.S., 2010. Synthesis of Graphene and Its Applications: A Review. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 35, 52–71. doi:10.1080/10408430903505036
- Chowdhury, I., Duch, M.C., Mansukhani, N.D., Hersam, M.C., Bouchard, D., 2013. Colloidal Properties and Stability of Graphene Oxide Nanomaterials in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6288–6296. doi:10.1021/es400483k
- Chowdhury, S., Balasubramanian, R., 2014. Recent advances in the use of graphene-family nano-adsorbents for removal of toxic pollutants from wastewater. *Adv. Colloid Interface Sci.* 204, 35–56. doi:10.1016/j.cis.2013.12.005
- Coelho, P.A., 1964. Algumas observações sobre a biologia e a ecologia dos camarões *Palaemon northropi* e *P. pandaliformis* no estado de Pernambuco (Decapoda - Palaemonidae). *Trab Inst Ocean. Univ Fed Pernamb. Recife* 5–6, 69–72.
- Collaço, F.L., Sartor, S.M., Barbieri, E., 2015. Uso do geoprocessamento para definição de áreas para o cultivo de ostras na região estuarina de Cananéia/SP. *Rev. Gest. Costeira Integrada* 15, 193–207. doi:10.5894/rgci527

- Costa, M.F., Landing, W.M., Kehrig, H.A., Barletta, M., Holmes, C.D., Barrocas, P.R.G., Evers, D.C., Buck, D.G., Claudia Vasconcellos, A., Hacon, S.S., Moreira, J.C., Malm, O., 2012. Mercury in tropical and subtropical coastal environments. *Environ. Res., Mercury in Marine Ecosystems: Sources to Seafood Consumers* 119, 88–100. doi:10.1016/j.envres.2012.07.008
- Damato, M., Barbieri, E., 2011. Determinação da toxicidade aguda de cloreto de amônia para uma espécie de peixe (*Hyphessobrycon callistus*) indicadora regional. *O Mundo Saúde São Paulo* 35, 401–407.
- Das, S., Singh, S., Singh, V., Joung, D., Dowding, J.M., Reid, D., Anderson, J., Zhai, L., Khondaker, S.I., Self, W.T., Seal, S., 2013. Oxygenated Functional Group Density on Graphene Oxide: Its Effect on Cell Toxicity. *Part. Part. Syst. Character.* 30, 148–157. doi:10.1002/ppsc.201200066
- de Melo, G.A.S., 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Gustavo Augusto S. de Melo & Editora Loyola.
- Deng, X., Lü, L., Li, H., Luo, F., 2010. The adsorption properties of Pb(II) and Cd(II) on functionalized graphene prepared by electrolysis method. *J. Hazard. Mater.* 183, 923–930. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.117
- Depci, T., Kul, A.R., Önal, Y., 2012. Competitive adsorption of lead and zinc from aqueous solution on activated carbon prepared from Van apple pulp: Study in single- and multi-solute systems. *Chem. Eng. J.* 200–202, 224–236. doi:10.1016/j.cej.2012.06.077
- Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., 2010. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* 39, 228–240. doi:10.1039/B917103G
- Durán, N., Martinez, D.S.T., Justo, G.Z., de Lima, R., de Castro, V.L., Umbuzeiro, G.A., Barbieri, E., Durán, M., Melo, P.S., Alves, O.L., Fávaro, W.J., 2015a. Interlab study on nanotoxicology of representative graphene oxide. *J. Phys. Conf. Ser.* 617, 12019. doi:10.1088/1742-6596/617/1/012019
- Durán, N., Martinez, D.S.T., Silveira, C.P., Durán, M., de Moraes, A.C.M., Simões, M.B., Alves, O.L., Fávaro, W.J., 2015b. Graphene oxide: a carrier for pharmaceuticals and a scaffold for cell interactions. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 309–327.
- Ferguson, P.L., Chandler, G.T., Templeton, R.C., DeMarco, A., Scrivens, W.A., Englehart, B.A., 2008. Influence of sediment-amendment with single-

- walled carbon nanotubes and diesel soot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3879–3885.
- Ferreira, J.L.R., Lonné, M.N., França, T.A., Maximilla, N.R., Lugokenski, T.H., Costa, P.G., Fillmann, G., Antunes Soares, F.A., de la Torre, F.R., Monserrat, J.M., 2014. Co-exposure of the organic nanomaterial fullerene C60 with benzo[a]pyrene in *Danio rerio* (zebrafish) hepatocytes: Evidence of toxicological interactions. *Aquat. Toxicol.* 147, 76–83. doi:10.1016/j.aquatox.2013.12.007
- Ferreira, R.S., Vieira, R.R.R., D’Incao, F., 2010. The marine and estuarine shrimps of the Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from Brazil. *Zootaxa* 2606, 1–24.
- Flick, D.F., Kraybill, H.F., DImitroff, J.M., 1971. Toxic effects of cadmium: A review. *Environ. Res.* 4, 71–85. doi:10.1016/0013-9351(71)90036-3
- Frassinetti, S., Bronzetti, G., Caltavuturo, L., Cini, M., Croce, C.D., 2006. The role of zinc in life: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer* 25, 597–610.
- Freire, C.A., Cavassin, F., Rodrigues, E.N., Torres, A.H., McNamara, J.C., 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 136, 771–778. doi:10.1016/j.cbpb.2003.08.007
- Gamba, A.L., 1998. The Larval Development of a Fresh-Water Prawn, *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871), Under Laboratory Conditions (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 71, 9–35. doi:10.1163/156854098X00743
- Gao, W., 2015. The Chemistry of Graphene Oxide, in: Gao, W. (Ed.), *Graphene Oxide*. Springer International Publishing, pp. 61–95.
- Gautam, R.K., Chattopadhyaya, M.C., 2016. *Nanomaterials for Wastewater Remediation*. Butterworth-Heinemann.
- Geim, A.K., Novoselov, K.S., 2007. The rise of graphene. *Nat. Mater.* 6, 183–191. doi:10.1038/nmat1849
- Greenberg, A.E. (Ed.), 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition. ed. Amer Public Health Assn, Washington, DC.

- Guo, X., Mei, N., 2014. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *J. Food Drug Anal.* 22, 105–115. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.009
- Hansen, B., Fotel, F.L., Jensen, N.J., Wittrup, L., 1997. Physiological effects of the detergent linear alkylbenzene sulphonate on blue mussel larvae (*Mytilus edulis*) in laboratory and mesocosm experiments. *Mar. Biol.* 128, 627–637. doi:10.1007/s002270050129
- Harris, R.R., Santos, M.C.F., 2000. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 137, 691–703. doi:10.1007/s002270000382
- He, X., Aker, W.G., Leszczynski, J., Hwang, H.-M., 2014. Using a holistic approach to assess the impact of engineered nanomaterials inducing toxicity in aquatic systems. *J. Food Drug Anal., Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications* 22, 128–146. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.011
- He, Y.Q., Zhang, N.N., Wang, X.D., 2011. Adsorption of graphene oxide/chitosan porous materials for metal ions. *Chin. Chem. Lett.* 22, 859–862. doi:10.1016/j.cclet.2010.12.049
- Hernández-Moreno, D., Pérez-López, M., Soler, F., Gravato, C., Guilhermino, L., 2011. Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): study of biomarkers and behaviour alterations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1905–1912. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.016
- Heugens, E.H., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 247–284.
- Hirner, A.V., Hippler, J., 2011. Trace Metal(loid)s (As, Cd, Cu, Hg, Pb, PGE, Sb, and Zn) and Their Species, in: *Treatise on Water Science*. Elsevier, Germany, pp. 31–57.
- Jastrzębska, A.M., Olszyna, A.R., 2015. The ecotoxicity of graphene family materials: current status, knowledge gaps and future needs. *J. Nanoparticle Res.* 17, 1–21. doi:10.1007/s11051-014-2817-0

- Kabata-Pendias, A., 2010. Trace Elements in Soils and Plants, 4 edition. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Khan, M.B., Masiol, M., Hofer, A., Pavoni, B., 2014. Harmful Elements in Estuarine and Coastal Systems, in: Bini, C., Bech, J. (Eds.), PHEs, Environment and Human Health. Springer Netherlands, pp. 37–83.
- Klaassen, C.D., 2013. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 8th ed, Casarett & Doull's Toxicology. McGraw-Hill Professional, New York (NY).
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825–1851. doi:10.1897/08-090.1
- Kyzas, G.Z., Deliyanni, E.A., Matis, K.A., 2014. Graphene oxide and its application as an adsorbent for wastewater treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 196–205. doi:10.1002/jctb.4220
- Li, F., Jiang, X., Zhao, J., Zhang, S., 2015. Graphene oxide: A promising nanomaterial for energy and environmental applications. *Nano Energy* 16, 488–515. doi:10.1016/j.nanoen.2015.07.014
- Liu, J., Cui, L., Losic, D., 2013. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* 9, 9243–9257. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.016
- Liu, X.T., Mu, X.Y., Wu, X.L., Meng, L.X., Guan, W.B., Ma, Y.Q., Sun, H., Wang, C.J., Li, X.F., 2014. Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos. *Biomed. Environ. Sci. BES* 27, 676–683. doi:10.3967/bes2014.103
- Luo, J., Cote, L.J., Tung, V.C., Tan, A.T.L., Goins, P.E., Wu, J., Huang, J., 2010. Graphene oxide nanocolloids. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 17667–17669. doi:10.1021/ja1078943
- Maia, C.B., Almeida, A.C.M., Moreira, F.R., 2006. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 1, 195–198. doi:10.5132/jbse.2006.02.020
- Mance, G., 1987. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments, 1st ed, Pollution Monitoring Series. Springer Science & Business Media.

- Marasinghe Wadige, C.P.M., Taylor, A.M., Maher, W.A., Krikowa, F., 2014. Bioavailability and toxicity of zinc from contaminated freshwater sediments: linking exposure-dose-response relationships of the freshwater bivalve *Hyridella australis* to zinc-spiked sediments. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 156, 179–190. doi:10.1016/j.aquatox.2014.08.012
- Martinez, D.S.T., Alves, O.L., 2013. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. *Ciênc. E Cult.* 65, 32–36.
- Matsuo, A.Y.O., Wood, C.M., Val, A.L., 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 74, 351–364. doi:10.1016/j.aquatox.2005.06.008
- Mesarič, T., Sepčič, K., Piazza, V., Gambardella, C., Garaventa, F., Drobne, D., Faimali, M., 2013. Effects of nano carbon black and single-layer graphene oxide on settlement, survival and swimming behaviour of *Amphibalanus amphitrite* larvae. *Chem. Ecol.* 29, 643–652. doi:10.1080/02757540.2013.817563
- Ministério do Ambiente, 2007. Decreto-Lei n.º 306/2007, Diário da República.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32, 967–976. doi:10.1016/j.envint.2006.06.014
- Mortari, R.C., Negreiros-Fransozo, M.I., 2007. Composition and abundance of the caridean prawn species in two estuaries from the northern coast of São Paulo State, Brazil. *Acta Limnologica Bras.* 19, 211–219.
- Müller, Y.M.R., Nazari, E.M., Bressan, C.M., Ammar, D., 1996. Aspectos da reprodução de *Palaemon pandaliformis* (Stimpson) (Decapoda, Palaemonidae) no manguezal de Ratoles, Florianópolis, Santa Catarina. *Rev. Bras. Zool.* 13, 633–642. doi:10.1590/S0101-81751996000300013
- Nanda, S.S., Papaefthymiou, G.C., Yi, D.K., 2015. Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 40, 291–315. doi:10.1080/10408436.2014.1002604
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. doi:10.1289/ehp.7339

- Ortega, P., Santos, R.A., Lacouth, P., Rozas, E.E., Custódio, M.R., Zanotto, F.P., 2014. Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. *Iheringia Sér. Zool.* 104, 347–354. doi:10.1590/1678-476620141043347354
- Pedersen, null, Bjerregaard, null, 2000. Cadmium influx and efflux across perfused gills of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 48, 223–231.
- Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S., 2011. Cadmium in the Environment: Sources, Mechanisms of Biototoxicity, and Biomarkers. *Rev. Environ. Health* 15, 299–324. doi:10.1515/REVEH.2000.15.3.299
- Pinto, A.M.T.P., Hirdes, I.M., Sanches Filho, P.J., 2013. Determinação de metais pesados nos camarões (*Farfantepenaeus paulensis*) consumidos na cidade de Pelotas-RS. *EEC Pelotas Rio Gd. Sul Bras.* 8, 129–134. doi:10.5132/eec.2013.01.019
- Playle, R.C., Dixon, D.G., Burnison, K., 1993. Copper and Cadmium Binding to Fish Gills: Estimates of Metal–Gill Stability Constants and Modelling of Metal Accumulation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2678–2687. doi:10.1139/f93-291
- Poleto, C., Merten, G.H., Minella, J.P., 2009. The identification of sediment sources in a small urban watershed in southern Brazil: An application of sediment fingerprinting. *Environ. Technol.* 30, 1145–1153. doi:10.1080/09593330903112154
- Pueyo, M., Rauret, G., Lück, D., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, P., López-Sánchez, J.F., 2001. Certification of the extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a freshwater sediment following a collaboratively tested and optimised three-step sequential extraction procedure. *J. Environ. Monit. JEM* 3, 243–250.
- Pusceddu, A., Gambi, C., Manini, E., Danovaro, R., 2007. Trophic state, ecosystem efficiency and biodiversity of transitional aquatic ecosystems: analysis of environmental quality based on different benthic indicators. *Chem. Ecol.* 23, 505–515. doi:10.1080/02757540701760494

- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507. doi:10.1016/S0269-7491(02)00238-5
- Rainbow, P.S., 1997. Ecophysiology of Trace Metal Uptake in Crustaceans. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 44, 169–176. doi:10.1006/ecss.1996.0208
- Rajkumar, J.S.I., John Milton, M.C., Ulthiralingam, M., Azhaguaraj, R., Ganesh, J., Ambrose, T., 2011. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium, copper, lead and zinc in post larval stages of *Penaeus monodon*. *Int. J. Dev. Res.* 1, 01–05.
- Rosa, L.C., Passos, A.C., Corrêa, M.F.M., 2015. Aspectos populacionais e reprodutivos de *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea: Palaemonidae), em uma marisma subtropical no sul do Brasil. *Bol. Inst. Pesca São Paulo Braz.* 41, 849–857.
- Sanchez, V.C., Jachak, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., 2012. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 15–34. doi:10.1021/tx200339h
- Santos, D.B., Barbieri, E., Bondioli, A.C.V., de Melo, C.B., 2014. Effects of lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *O Mundo Saúde São Paulo* 38, 16–23. doi:10.15343/0104-7809.20143801016023
- Seabra, A.B., Paula, A.J., de Lima, R., Alves, O.L., Durán, N., 2014. Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 159–168. doi:10.1021/tx400385x
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian J. Pharmacol.* 43, 246–253. doi:10.4103/0253-7613.81505
- Singh, Z.S., 2016. Applications and toxicity of graphene family nanomaterials and their composites. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2016, 15–28. doi:10.2147/NSA.S101818
- Sitko, R., Turek, E., Zawisza, B., Malicka, E., Talik, E., Heimann, J., Gagor, A., Feist, B., Wrzalik, R., 2013. Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide. *Dalton Trans.* 42, 5682–5689. doi:10.1039/C3DT33097D

- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.-P., Charmantier, G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp (Crustacea: Decapoda). *Aquat. Living Resour.* 12, 57–70. doi:10.1016/S0990-7440(99)80015-1
- Spacie, A., McCarty, L.S., Rand, G.M., 1995. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems, in: *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment*. Gary M. Rand and Ed. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 493–521.
- Spicer, J.I., Weber, R.E., 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 100, 339–342. doi:10.1016/0742-8413(91)90005-E
- Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A., Spiliopoulou, C., 2006. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.* 80, 1–9. doi:10.1007/s00204-005-0009-5
- Tavares, K.P., Caloto-Oliveira, Á., Vicentini, D.S., Melegari, S.P., Matias, W.G., Barbosa, S., Kummrow, F., 2014. Acute toxicity of copper and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis*. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 9, 43–50. doi:10.5132/eec.2014.01.006
- Thurberg, F.P., Dawson, M.A., Collier, R.S., 1973. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Mar. Biol.* 23, 171–175. doi:10.1007/BF00389481
- Tsai, J.-R., Lin, H.-C., 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.* 210, 620–627. doi:10.1242/jeb.02684
- USEPA, U.S.E.P.A., 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*, Fifth Edition. ed. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC: Office of Research and Development.
- Vilas, C., Drake, P., Pascual, E., 2006. Oxygen consumption and osmoregulatory capacity in *Neomysis integer* reduce competition for resources among mysid shrimp in a temperate estuary. *Physiol. Biochem. Zool.* PBZ 79, 866–877. doi:10.1086/506001

- Virga, R.H.P., Geraldo, L.P., Santos, F.H. dos, 2007. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. *Ciênc. E Tecnol. Aliment.* 27, 779–785. doi:10.1590/S0101-20612007000400017
- Wang, W., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular Partitioning and the Prediction of Cadmium Toxicity to Aquatic Organisms. *Environ. Chem.* 3, 395–399.
- Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J., Lin, Y., 2011. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 29, 205–212. doi:10.1016/j.tibtech.2011.01.008
- Weihrauch, D., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491–4504. doi:10.1242/jeb.01308
- White, S.L., Rainbow, P.S., 1986. Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* 32, 17–25.
- White, S.L., Rainbow, P.S., 1984. Regulation of zinc concentration by *Palaemon elegans*(Crustacea: Decapoda): Zinc flux and effects of temperature, zinc concentration and moulting. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Oldendorf 16, 135–147.
- Winkler, L.W., 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 21, 2843–2854. doi:10.1002/cber.188802102122
- Wright, D.A., Welbourn, P.M., 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.* 2, 187–214. doi:10.1139/a94-012
- Wu, H., He, D., Wang, Y., Fu, M., Liu, Z., Wang, J., Wang, H., 2011. Graphene layers from reduction of exfoliated graphite oxide. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 9456–9459.
- Wu, J.P., Chen, H.-C., 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere* 57, 1591–1598. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.033
- Xu, Y., Shi, D., Aristilde, L., Morel, F.M.M., 2012. The effect of pH on the uptake of zinc and cadmium in marine phytoplankton: Possible role of weak complexes. *Limnol. Oceanogr.* 57, 293–304. doi:10.4319/lo.2012.57.1.0293

- Yang, K., Li, Y., Tan, X., Peng, R., Liu, Z., 2013. Behavior and Toxicity of Graphene and Its Functionalized Derivatives in Biological Systems. *Small* 9, 1492–1503. doi:10.1002/smll.201201417
- Yang, S.-T., Chang, Y., Wang, H., Liu, G., Chen, S., Wang, Y., Liu, Y., Cao, A., 2010. Folding/aggregation of graphene oxide and its application in Cu²⁺ removal. *J. Colloid Interface Sci.* 351, 122–127. doi:10.1016/j.jcis.2010.07.042
- Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Wang, B., Luo, N., Gao, Y., Ma, D., Ma, G., Su, Z., 2012. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials* 33, 4013–4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.021
- Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*, 1st ed. Rima.
- Zanders, I.P., Rojas, W.E., 1996. Salinity effects on cadmium accumulation in various tissues of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Environ. Pollut.* 94, 293–299. doi:10.1016/S0269-7491(96)00095-4
- Zhang, C., Li, F., Xiang, J., 2014. Acute effects of cadmium and copper on survival, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in juvenile *Exopalaemon carinicauda*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 209–214. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.008
- Zhang, N., Qiu, H., Si, Y., Wang, W., Gao, J., 2011. Fabrication of highly porous biodegradable monoliths strengthened by graphene oxide and their adsorption of metal ions. *Carbon* 49, 827–837. doi:10.1016/j.carbon.2010.10.024
- Zhang, X., Sun, H., Zhang, Z., Niu, Q., Chen, Y., Crittenden, J.C., 2007. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere* 67, 160–166. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.003
- Zhang, Y., Wu, C., Guo, S., Zhang, J., 2013. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. *Nanotechnol. Rev.* 2, 27–45. doi:10.1515/ntrev-2012-0078
- Zhao, G., Li, J., Ren, X., Chen, C., Wang, X., 2011. Few-Layered Graphene Oxide Nanosheets As Superior Sorbents for Heavy Metal Ion Pollution

Management. Environ. Sci. Technol. 45, 10454–10462.
doi:10.1021/es203439v

Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the Aquatic Environment: Adsorption, Dispersion, Toxicity and Transformation. Environ. Sci. Technol. 48, 9995–10009. doi:10.1021/es5022679

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há de se considerar que os ambientes aquáticos são suscetíveis à dinâmica da interação de vários elementos naturais (orgânicos e inorgânicos) com potenciais contaminantes. Estas interações podem expressar-se sobre os organismos antagonizando ou potencializando os efeitos tóxicos dos poluentes. Já em laboratório, os organismos teste são expostos a contaminantes isoladamente ou em combinações menos complexas das que realmente ocorrem *in situ* do ecossistema aquático. Somado a estes fatores, os organismos com capacidade de locomoção podem migrar das áreas contaminadas.

Compreender as dinâmicas de interação física e química dos NMs com a biota, assim como com os elementos químicos que podem influenciar sua biodisponibilidade, assimilação e toxicidade são fundamentais para fazer avaliações de seu destino, transporte e efeitos adversos no ambiente aquático.

Embora seja difícil extrapolar os resultados obtidos em laboratório para o ecossistema aquático, avaliações de toxicidade são fontes de informações imprescindíveis para elucidar os potenciais riscos dos xenobióticos lançados ao meio. Os resultados de estudos de toxicidade contribuem para definir normas de segurança estabelecendo valores máximos de concentrações de potenciais poluentes e minimizar os riscos nos ecossistemas.

APÊNCIDE

ANEXO 1 – Controles dos experimentos de metabolismo de rotina.

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos controles de consumo específico de oxigênio, realizados para cada tratamento (Figura 6), (ANOVA).

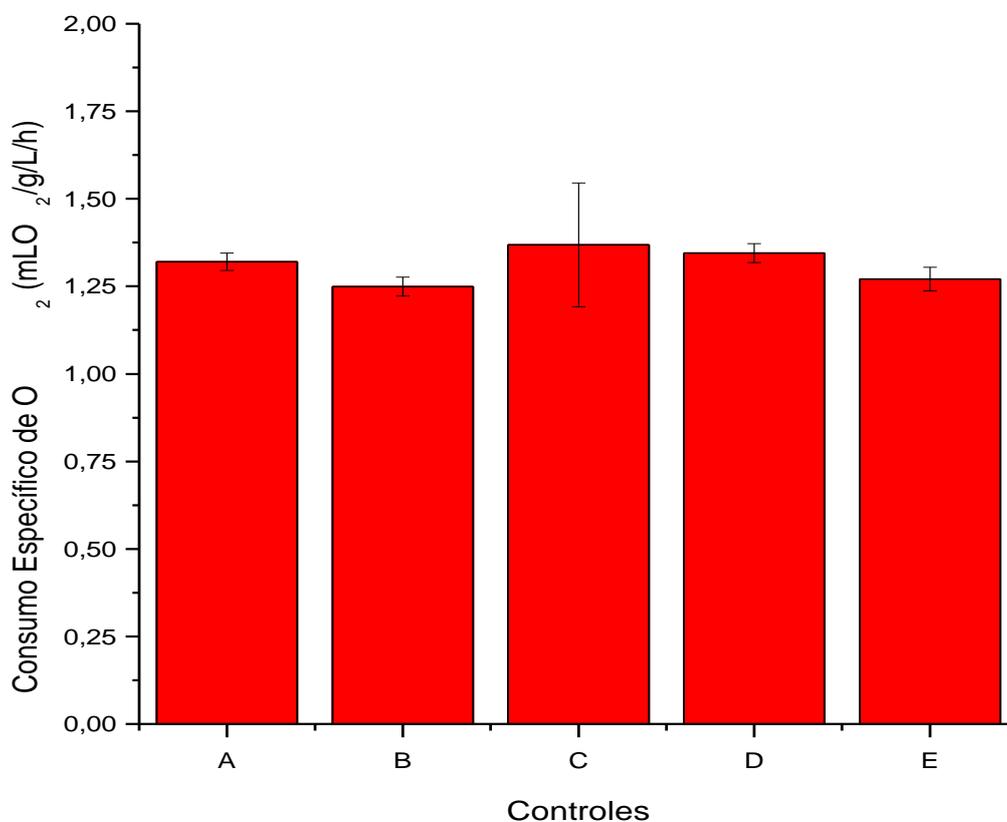


Figura 1: Média dos controles dos experimentos de Consumo Específico de Oxigênio (mLO₂.g⁻¹.L⁻¹.h⁻¹). A: Óxido de Grafeno, B: Cádmio, C: Cádmio + 1,0 mg de Óxido de Grafeno, D: Zinco e E: Zinco + 1,0 mg de Óxido de Grafeno. Barras são os respectivos desvios padrões.

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos controles de excreção específica de amônia, realizados para cada tratamento (Figura 12), (ANOVA).

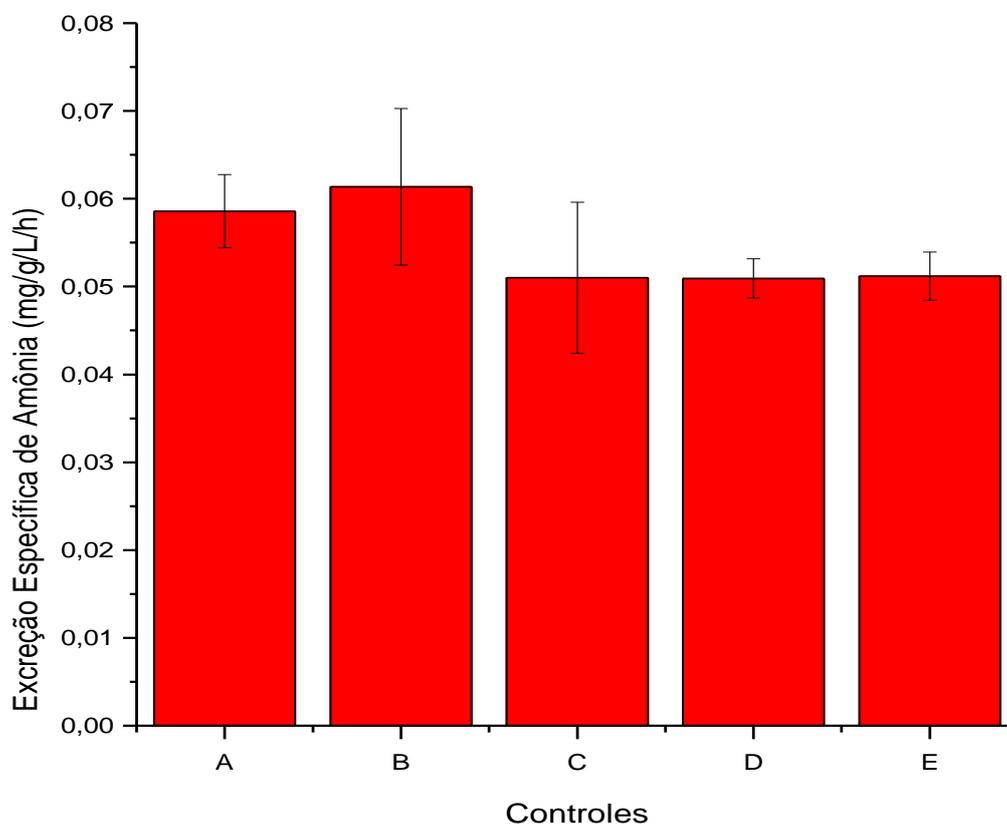


Figura 2: Médias dos controles dos experimentos de Excreção Específica de Amônia ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). A: Óxido de Grafeno, B: Cádmio, C: Cádmio + 1,0 mg de Óxido de Grafeno, D: Zinco e E: Zinco + 1,0 mg de Óxido de Grafeno. Barras são os respectivos desvios padrões.

ANEXO 2 – FOTOS: Coleta de espécimes de *Palaemon pandaliformis* na Reserva Extrativista do Mandira.



ANEXO 3 – Fotos de manutenção e dos experimentos do atual estudo realizados no laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Pesca de São Paulo – Base Cananeia.

