

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

**USO DO CAMARÃO “FANTASMA” *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871)
PARA AVALIAR OS EFEITOS DE POLUENTES AMBIENTAIS.**

Keila Nazaré de Oliveira Araújo

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
Julho-2015

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

USO DO CAMARÃO “FANTASMA” *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871)
PARA AVALIAR OS EFEITOS DE POLUENTES AMBIENTAIS

Keila Nazaré de Oliveira Araújo

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
Julho-2015

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

A663u Araújo, Keila Nazaré de Oliveira

Uso do camarão "fantasma" *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) para avaliar os efeitos de poluentes ambientais / Keila Nazaré de Oliveira Araújo : São Paulo, 2015.

v, 38f. ; il. ; gráf. ; tab.

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

Orientador: Edison Barbieri

1. Ecotoxicologia. 2. Organismos aquáticos. 3. Consumo de oxigênio.
4. Excreção de amônia. 5. *Palaemon pandaliformis*. I. Barbieri, Edison. II. Título.

CDD 639.512



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

“USO DO CAMARÃO “FANTASMA” *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871)
PARA AVALIAR OS EFEITOS DE POLUENTES AMBIENTAIS ”

AUTOR: Keila Nazaré de Oliveira Araújo

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

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Henriques

Prof. Dr. Oswaldo Campos Junior

Data da realização: 06 de julho de 2015

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Edison Barbieri

Agradecimentos

Especialmente a Deus, minha força maior, por não me abandonar em nenhum momento da minha vida.

À minha mãe por estar sempre ao meu lado mesmo quando estamos distantes e por tanto amor, dedicação e apoio sem o qual eu não saberia viver.

Ao meu pai pelo carinho e apoio contínuo durante toda minha vida.

Ao Dr. Edison Barbieri pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de pós-graduação do Instituto de Pesca de São Paulo pela oportunidade de realizar mais esta importante etapa para minha formação acadêmica.

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

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Antonio Fernando Gervásio Leonardo e Dra. Stefani Rossi pelas contribuições ao trabalho.

Ao Dr. Antônio Ostrensky pela orientação durante meu estágio docência, pelo apoio e recomendações para meu desenvolvimento pessoal e profissional e a todos do Grupo Integrado de Aquicultura (GIA) da UFPR.

À amiga Verena Nakano e família por toda amizade, força, apoio, incentivo, ajuda incondicional e acolhida.

Às amigas, Michelli Carvalho, Silvana Oliveira, Marília Santos, Flaviana Feiler e Alessandra Malcher pela amizade, apoio e incentivo.

Às amigas de pós-graduação Alessandra Tegon, Bianca Fukuda e Janaína Campos pela ajuda e disposição nos momentos em que precisei de auxílio.

Ao meu namorado Arthur Artemtchonque, por todo companheirismo, compreensão, apoio, amparo, amizade e carinho.

Agradeço a todos que sempre me apoiaram e acreditaram que eu superaria todos os obstáculos e chegaria ao fim.

Sumário

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	ii
Índice de Tabelas e Figuras.....	lii
Resumo geral.....	iv
General abstract.....	v
Introdução Geral.....	1
Objetivo geral.....	3
Referências Bibliográficas.....	4
Capítulo1- Efeitos da interação de nanotubos de carbono (NTC) com chumbo (Pb) no consumo de oxigênio e na excreção de amônia do camarão “fantasma” <i>Palaemon pandaliformis</i> (Stimpson, 1871).....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
1. Introdução.....	8
2. Materiais e métodos.....	11
2.1. Obtenção e manutenção dos organismos-teste.....	11
2.2. Reagentes químicos utilizados.....	11
2.3. CL50 e percentual de letalidade dos organismos.....	11
2.4. Consumo específico de oxigênio.....	12
2.5. Excreção de amônia.....	13
2.6. Análise estatística.....	13
3. Resultados.....	14
3.1. CL50 e letalidade dos indivíduos.....	14
3.2. Consumo específico de oxigênio.....	16
3.3. Excreção de amônia.....	18
4. Discussão.....	20
5. Conclusões.....	22
6. Agradecimentos.....	23
7. Referências bibliográficas.....	23
Considerações finais.....	27
Apêndice.....	28

Índice de Tabelas e Figuras

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ para <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos aos Nanotubos de Carbono.....	14
Tabela 2. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ para <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao chumbo (Pb).....	15
Tabela 3. Porcentagem de mortalidade (%) e CL ₅₀ para <i>Palaemon pandaliformis</i> expostos ao Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono (NTC).....	15
Figura 1. Consumo específico de oxigênio (mlO ₂ /g/h) conforme variação nas concentrações de Nanotubos de carbono (mg/L).....	16
Figura 2. Consumo específico de oxigênio (mlO ₂ /g/h) conforme variação nas concentrações de Pb (mg/L).....	17
Figura 3. Consumo específico de oxigênio (mlO ₂ /g/h) conforme variação nas concentrações de Pb (mg/L) com adição de 0,5 mg/L de NTC.....	17
Figura 4. Excreção de Amônia (mg/L/h) para organismos expostos em concentrações de Nanotubos de Carbono.....	18
Figura 5. Excreção de Amônia (mg/L/h) para organismos expostos em concentrações de Chumbo.....	19
Figura 6. Excreção de Amônia (mg/L/h) para organismos expostos em concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono.....	19

RESUMO GERAL

Estudos sobre metais pesados presentes nos ecossistemas aquáticos despertam interesse devido a características como a baixa biodegradabilidade e efeito cumulativo na cadeia trófica. Além disso, o aumento da utilização e a demanda de nanomateriais presentes no ambiente e os potenciais efeitos causados nos ecossistemas aquáticos tem gerado grandes preocupações, pois pouco se conhece sobre a nanotoxicidade destas substâncias nestes ambientes e nos processos fisiológicos dos organismos aquáticos. A avaliação da quantidade de oxigênio consumida e a amônia excretada por organismos aquáticos possibilita a obtenção de respostas sobre o comportamento desses organismos em situações de estresse no ambiente. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos causados por dois poluentes ambientais considerados tóxicos para organismos aquáticos, chumbo e nanotubos de carbono sobre o metabolismo do camarão fantasma (*Palaemon pandaliformis*). Com base nos resultados obtidos, é possível comprovar que esta espécie pode ser utilizada com eficiência em ensaios ecotoxicológicos por apresentarem condições favoráveis para sua manutenção em laboratório e por fornecerem respostas rápidas durante os ensaios onde foram avaliados os efeitos no consumo de oxigênio e excreção de amônia.

Palavras-chave: Poluentes ambientais. Nanotubos de carbono. Chumbo.
Palaemon pandaliformis.

ABSTRACT GENERAL

Studies about heavy metals in aquatic ecosystems arouse interest because of features such as low biodegradability and cumulative effect in the food chain. Moreover, the increased use and demand of nanomaterials present on the environment and the potential effects on aquatic ecosystems have generated great concern because little is known about the nanotoxicity of these substances in these environments and in the physiological processes of aquatic organisms. The consumed oxygen quantity and ammonia excreted by aquatic organisms' evaluations allows getting answers about the behavior of these organisms under stress in the environment. Thus, this study aimed to evaluate the effects of two environmental pollutants considered toxic to aquatic organisms, lead and carbon nanotubes on ghost shrimp metabolism (*Palaemon pandaliformis*). Based on the results obtained, it is possible to prove that this species can be used efficiently in ecotoxicological tests for presenting favorable conditions for their maintenance in the laboratory and for providing quick answers during tests which were evaluated the effects on oxygen consumption and ammonia excretion.

Keywords: Environmental pollutants. Carbon nanotubes. Lead. *Palaemon pandaliformis*.

INTRODUÇÃO GERAL

Os compostos tóxicos podem afetar os organismos aquáticos comprometendo seu estado comportamental, nutricional e fisiológico (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003; VAN DER OOST *et al.*, 2003), por este motivo o estudo do metabolismo de peixes e camarões pode auxiliar no monitoramento da qualidade ambiental onde estes organismos estão presentes, pois através deles é possível analisar o estado físico geral destes animais quando em contato com determinadas substâncias consideradas tóxicas (BARBIERI, 2007). As análises do consumo específico de oxigênio e da excreção de amônia podem fornecer respostas sobre o comportamento de organismos aquáticos quando em situações de estresse no ambiente (BARBIERI e PAES, 2011).

O aumento das atividades humanas envolvendo metais pesados contribui com a elevação das concentrações desses elementos nos corpos de água ameaçando a biota aquática, terrestre e a saúde humana (HUNN *et al.*, 1987; PEÁLEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2002). A contaminação ambiental por chumbo é registrada como a maior incidência de intoxicação por este metal, via alimentação, água e partículas em suspensão (KOSNETT, 2003). O chumbo é um elemento que pode ser encontrado naturalmente no ambiente através de ciclos biogeológicos e em ambientes aquáticos é incorporado na cadeia alimentar e bioconcentrado por organismos presentes na água e sedimento, sendo acumulado principalmente nas estruturas branquiais, fígado e rins de indivíduos das comunidades ictiológicas (SCHIFER, 2005) e apresenta elevada toxicidade para invertebrados aquáticos de água doce (PAOLIELLO, 200; BARBIERI *et al.*, 2013). Desta forma, o estudo da toxicidade de metais pesados nos ambientes aquáticos tem chamado à atenção de ambientalistas (TOREM e CASQUEIRA, 2003).

A escassez de conhecimento sobre os riscos que os nanomateriais podem causar em ecossistemas aquáticos é preocupante, pois seu uso e demanda no ambiente tem aumentado gerando preocupações sobre a nanotoxicidade dessas substâncias nos processos fisiológicos dos organismos aquáticos (BRITTO *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2015).

Devido ao grande potencial de alcance dos nanomateriais manufacturados em ambientes aquáticos, é necessário determinar quais os níveis de exposição que as espécies presentes nesses ambientes estão sendo impactadas (KLAPER *et al.*, 2010). Pesquisas revelam que características peculiares das nanopartículas como maior atividade biológica, reatividade química e absorção devido ao tamanho de sua superfície, facilitam a capacidade de penetração dessas substancias no corpo humano (OBERDORSTER *et al.*, 2005) e tornam as nanopartículas de carbono capazes de se aderir a moléculas de outras substâncias, possibilitando o transporte de poluentes para o meio ambiente (KLEINER e HOGAN, 2003; BARBIERI *et al.*, 2013).

Os organismos-teste cultiváveis em laboratório mais utilizados internacionalmente em ensaios ecotoxicológicos são as microalgas (*Pseudokirchneriella subcaptata*), os cladóceros (*Daphnia similis* ou *Ceriodaphnia dubia*) e peixes (*Danio rerio* e *Pimephales promelas*) (LOMBARDI, 2004). Na tentativa de testar a viabilidade de outros organismos que apresentem os princípios básicos para o uso em testes de toxicidade sugeridos por ZAGATTO e BERTOLETTI (2006) foram utilizados neste estudo camarões da espécie *Palaemon pandaliformis*, da família Palaemonidae, conhecidos popularmente como camarões fantasma ou potitinga, encontrados desde a Guatemala até a região sul do Brasil (DE MELO, 2003). São camarões de pequeno porte que vivem associados aos substratos das áreas marginais do mangue e representam importante papel ecológico por estarem envolvidos na ciclagem de nutrientes orgânicos e servindo de alimento para aves e peixes em ambientes estuarinos ou de água doce (COELHO, 1963; 1964; BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1999). Por não apresentarem um tamanho considerado adequado para comercialização, alguns autores não incluem esta espécie de camarão como parte de hábitos alimentares de populações humanas (HOLTHUIS, 1980; BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1989; TEIXEIRA e SÁ, 1998). Porém, na área onde as amostras deste estudo foram coletadas, estes camarões são consumidos pela comunidade local e são utilizados ainda como iscas para pescarias.

Para melhor apresentação dos resultados obtidos, esta dissertação é composta de um capítulo no formato de um artigo científico, como descritos a seguir:

Capítulo 1: “Efeitos da interação de nanotubos de carbono (NTC) com chumbo (Pb) no consumo de oxigênio e na excreção de amônia do camarão “fantasma” *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871)”, redigido de acordo com as normas da revista *Environmental Toxicology*.

Neste capítulo foram avaliadas as alterações metabólicas observadas na respiração e excreção de camarões quando expostos em nanotubos de carbono, chumbo e em contato com estas substâncias associadas.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta pesquisa foi testar a viabilidade do uso de camarões da espécie *Palaemon pandaliformis* nos ensaios realizados para avaliar os efeitos de dois poluentes ambientais (chumbo e nanotubos de carbono), observando o comportamento destes indivíduos quando em contato com estes xenobiontes, auxiliando na identificação destes efeitos no metabolismo destes animais utilizando como marcadores biológicos o consumo de oxigênio e excreção de amônia.

Referências bibliográficas

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

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

BARBIERI, E.; MOREIRA, P.; LUCHINI, L. A.; HIDALGO, K. R.; MUNOZ, A. 2013. Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at different temperature levels. *Toxicology and Industrial Health*. 0748233713484655. 29:1-8.

BARBIERI, E.; BRANCO, J. O.; FERRÃO, M. C.; HIDALGO, K. R. 2013. Effects of Cadmium and Zinc on Oxygen consumption and ammonia excretion of the sea-bob shrimp, according to temperature. *Boletim do Instituto de Pesca*. 39 (3): 299-304.

BHATTACHARYYA, S.; KLERKS, P. L.; NYMAN, J. A. 2003. Toxicity to fresh water organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environmental Pollution*. 122(2): 205-215.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia*. 49(4): 883-896 p.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1999. Caridea (pitos, camarões de água doce e marinhos): In: BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. (Eds.). *Os crustáceos do Rio Grande do Sul*. Ed. UFRGS, Porto Alegre. 300-318 p.

BRITTO, R. S.; GARCIA, M. L.; ROCHA, A. M.; FLORES, J. A.; PINHEIRO, M. V. B.; MONSERRAT, J. M.; FERREIRA, J. L. R. 2012. Effects of carbon nanomaterials fullerene C 60 and fullerol C 60(OH) 18–22 on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. *Aquatic Toxicology*. 114: 80-87.

COELHO, P. A. 1963/1964. Distribuição dos Crustáceos Decápodos na área de Barra da Jangadas. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*. 5/6: 159-173 p.

DE MELO, G. A. S. 2003. *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*. Edições Loyola. 376 p.

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

HOLTHUIS, L. B. 1980. *FAO Species Catalogue - Shrimps and Prawns of the World. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries Synopsis*. 34(1).125-261 p.

HUNN, J. B.; HAMILTON, S. J.; & BUCKLER, D. R. 1987, Toxicity of sodium selenite to rainbow trout fry. *Water Research*. 21(2): 233-238.

HYLANDER, L.D.; PINTO, F.N.; GUIMARÃES, J.R.D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L.J.; SILVA, E.C. 2000. Fish mercury concentration in the Alto Pantanal, Brazil: influence of season and water parameters. *The Science of the Total Environment*. 261(1): 9 – 20.

KLAPER, R.; ARNDT, D.; CHEN, J.; GOETZ, F. 2010. Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 100(2): 211-217.

KLEINER, K. e HOGAN, J. 2003. How safe is nanotech? *New Scientist*. 177 (2388): 14-15.

KOSNETT, M. J. 2003. Intoxicação por Metais Pesados & Quelantes. In: KATZUNG, Bertram G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 867-870.

LOMBARDI, J.V. 2004. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: *Sanidade de organismos aquáticos* (Ed. by Ranzani Paiva et al.) Ed. Varela. 263-272 p.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L.; BARBIERI, E. 2013. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics. Conference Series* (Print). 429(1): 012043.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*. 113(7): 823–839.

PAOLIELLO, M. B.; CHASIN, A. M. 2001. *Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos*. Salvador: CRA - Centro de Recursos Ambientais. Série Cadernos de Referência Ambiental. v.3. ISBN 85-88595-02-8. 144 p.

PEÁLEZ-RODRIGUEZ, M.; PERET, A. M.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O. 2002. Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Boher, A. L. Oliveira-Neto (ed.), *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RIMA Editora. São Carlos, SP. 95-114 p.

TEIXEIRA, R.L.; SÁ, H.S. 1998. Abundância de macrocrustáceos decápodos nas áreas rasas do complexo Lagunar Mundaú/ Manguaba, AL. Revista Brasileira de Biologia. 58(3): 398-404.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13(2): 57-149.

ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações. São Carlos: RIMA. 464 p.

CAPITULO 1

EFEITOS DA INTERAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO (NTC) COM CHUMBO (PB) NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E NA EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO CAMARÃO “FANTASMA” *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871).

EFEITOS DA INTERAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO (NTC) COM CHUMBO (PB) NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E NA EXCREÇÃO DE AMÔNIA DO CAMARÃO “FANTASMA” *Palaemon pandaliformis* (STIMPSON, 1871).

K. N. de Oliveira Araújo^(a) e E. Barbieri^(b)

^(a) Keila Nazaré de Oliveira Araújo – Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca – Instituto de Pesca – APTA – SAA/SP. E-mail: Keila_araujo15@yahoo.com.br

^(b) Edison Barbieri – Instituto de Pesca – APTA-SAA – SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, 11990-000, Brasil. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

RESUMO

Este trabalho avaliou a associação de nanopartículas de carbono (NTC) e chumbo (Pb) no metabolismo do camarão “fantasma” (*P. pandaliformis*). Para calcular a toxicidade aguda (CL50) foram utilizadas 7 concentrações de NTC (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 3 mg/L), chumbo (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 1 e 3 mg/L) e de Pb com 0,5 mg/L de NTC (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 3 mg/L). Não houve mortalidade dos organismos expostos ao NTC nas 24, 48 e 72 horas. A CL50 nas 24, 48, 72 e 96h foram respectivamente 0,40; 0,33; 0,24 e 0,20 mg/L para Pb (mg/L); e, 0,41; 0,21; 0,07 e 0,07 mg/L para NTC associado ao Pb. Os parâmetros metabólicos avaliados foram o consumo específico de oxigênio e a excreção de amônia durante a exposição destes organismos nas concentrações de NTC (0,0, 0,2, 0,4, 0,5 mg/L); Pb (0,0, 0,22, 0,60, 1,2 mg/L), e Pb (0,0, 0,22, 0,60 e 1,2 mg/L) com 0,5 mg/L de NTC. Os valores médios do consumo específico de O₂ nas concentrações de NTC (mg/L) foram 0,44; 0,49 e 0,56 mlO₂/g/h. Para Pb (mg/L) a média do consumo de O₂ foi 1,44; 1,55 e 1,74 mlO₂/g/h. Na associação de Pb com 0,5 mg/L de NTC os valores médios obtidos foram 0,56; 1,11 e 1,25 mlO₂/g/h respectivamente. Comparando estes valores com os valores médios das concentrações 0,0 mg/L em cada ensaio (Pb: 0,45; NTC: 0,55; Pb e NTC: 0,72 mlO₂/g/h), verifica-se aumento nos níveis metabólicos dos camarões tanto nos ensaios com Pb quanto na exposição dos xenobiontes associados nas maiores concentrações empregadas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Organismos aquáticos. Consumo de Oxigênio. Excreção de Amônia. *Palaemon pandaliformis*.

ABSTRACT

This study evaluated the carbon nanoparticles association (NTC) and lead (Pb) in "ghost" shrimp metabolism (*P. pandaliformis*). To determine the acute toxicity (CL50) were used NTC 7 concentrations (0,0, 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 and 3 mg / l), lead (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 1 and 3 mg / L) and Pb and 0,5 mg / L NTC (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5, 1 and 3 mg / l). Mortality was not observed for the organisms exposed to the NTC in 24, 48 and 72 hours. The CL50 in 24, 48, 72 and 96 hours were respectively 0,40; 0,33; 0,24 and 0,20 mg / L Pb (mg / L); and 0,41; 0,21; 0,07 and 0,07 mg / L for NTC associated with Pb. The evaluated metabolic parameters were specific oxygen uptake and ammonia excretion during exposure of these organisms in NTC concentrations (0,0; 0,2; 0,4; 0,5 mg/L); Pb (0,0; 0,22; 0,60 and 1,2 mg/L), and Pb (0,0; 0,22; 0,60 and 1,2 mg/L) with 0,5 mg/L of NTC. The mean values of O₂ specific consumption concentrations in the NTC (mg/L) were 0,44; 0,49 and 0,56 mlO₂/g/h. To Pb (mg/L), the average consumption of O₂ was 1,44; 1,55 and 1,74 mlO₂/g/h. In association with Pb 0,5 mg/L NTC average values were 0,55; 1,11 and 1,25 mlO₂/g/h respectively. Comparing these values with the concentration average values 0,0 mg/L in each test (Pb: 0,45; NTC: 0,55; NTC and Pb: 0,72 mlO₂/g/h), it was possible to verify increased metabolic levels in both tests with Pb as the exposure associated xenobiotics used in larger concentrations.

Keywords: Ecotoxicology. Aquatic organisms. Oxygen consumption. Excretion of ammonia.

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que tem sido bastante discutida atualmente, devido as suas propriedades como maior atividade biológica, maior reatividade química e maior absorção catalisadora em comparação as macropartículas de mesma composição química, e estas características se devem ao tamanho de sua superfície que é proporcional a sua massa, fazendo com que os nanomateriais possam apresentar toxicidade mais elevada que as macromoléculas de um mesmo composto (GUAZELLI e PEREZ, 2009). Embora as propriedades dos nanomateriais ainda sejam pouco estudadas, seus componentes e processos em escalas nanométricas tem gerado interesse em relação aos potenciais impactos que as nanopartículas podem causar a saúde humana e ao meio ambiente (ABDI, 2010).

O aumento da utilização e a demanda de nanomateriais presentes no ambiente e os potenciais efeitos causados nos ecossistemas aquáticos tem gerado grandes preocupações, pois pouco se conhece sobre a nanotoxicidade destas substâncias nesses ambientes e nos processos fisiológicos dos organismos aquáticos (BRITTO *et al.*, 2012). KLAPER *et al.* (2010), destacam que os nanomateriais manufaturados apresentam alto potencial de alcance em ambientes aquáticos, o que torna necessário determinar se estes materiais estão impactando as espécies presentes e em que níveis de exposição.

A compreensão das características de nanopartículas e seus efeitos tóxicos auxiliam na geração de novas pesquisas buscando controlar fontes poluidoras e amenizar as consequências aos ecossistemas receptores destes resíduos (BECARO, 2013).

Os metais pesados levados aos ecossistemas aquáticos pelos efluentes, chuva e atmosfera, despertam interesses devido à sua ação residual, com baixa biodegradabilidade, e efeito cumulativo na cadeia trófica (BARBIERI, 2011). A contaminação ambiental por chumbo é registrada como a maior incidência de intoxicação por este metal, via alimentação, água e partículas em suspensão (KOSNETT, 2003). Em ambiente natural, a concentração do chumbo é em torno de 0,2 µg/L (WHO, 1995). Este elemento encontra-se naturalmente presente no ambiente através de ciclos biogeológicos e em ambientes aquáticos é incorporado na cadeia alimentar e bioconcentrado por organismos presentes na água e sedimento, sendo acumulado principalmente nas estruturas branquiais, fígado e rins de indivíduos das comunidades ictiológicas (SCHIFER, 2013). Em forma de sais este elemento é altamente tóxico para invertebrados aquáticos de água doce apresentando toxicidade aguda com concentrações maiores que 0,1 mg/L para estes organismos (PAOLIELLO, 2001).

BARBIERI (2007) sugere que através do estudo do metabolismo e da capacidade natatória em peixes e camarões pode-se monitorar a qualidade do meio ambiente em que estes organismos se encontram, devido à capacidade que estes parâmetros possuem de refletir no estado físico geral destes animais. Dados do consumo de oxigênio e da amônia excretada em

determinadas situações podem fornecer respostas dos organismos frente a estressores ambientais (BARBIERI e PAES, 2011).

Os camarões da espécie *Palaemon pandaliformis*, pertencem à família Palaemonidae, popularmente conhecidos como camarões fantasma ou potitinga. Esta espécie pode ser encontrada desde a Guatemala até a região sul do Brasil (DE MELO, 2003). Vivem geralmente associados aos substratos próximos a raízes da vegetação de áreas marginais do mangue e, embora de pequeno porte, possui significativa importância ecológica estando envolvidos na ciclagem de nutrientes orgânicos e servindo de alimento para peixes e aves que habitam áreas estuarinas ou de água doce (COELHO, 1963; 1964; BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1999). Alguns autores não incluem esta espécie como parte de hábitos alimentares de populações humanas (HOLTHUIS, 1980; BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1989; TEIXEIRA e SÁ, 1998) devido a seu pequeno porte (até 5 cm). Porém, na área onde as amostras deste estudo foram coletadas (RESEX Mandira, Cananeia, São Paulo), estes camarões são consumidos pela comunidade local e são utilizados ainda como iscas para pescarias. Em buscas realizadas na internet, estes animais podem ser encontrados a venda como organismos de ornamentação para aquarismo.

Estudos com a finalidade de quantificar os efeitos de nanomateriais na fisiologia de organismos aquáticos ainda são incipientes (HANDY *et al*, 2011). Para contribuir com as investigações referentes à ação de nanomateriais e Pb nestes organismos, este estudo avaliou os efeitos da associação de nanopartículas de carbono (NTC) e chumbo (Pb) no metabolismo de rotina do camarão “fantasma” (*Palaemon pandaliformis*). A hipótese deste trabalho é que a interação de nanotubos de carbono e chumbo provocaria alterações no metabolismo dos camarões ao entrarem em contato com estas substâncias verificado pelo consumo específico de oxigênio e amônia excretada durante a exposição destes crustáceos em testes de laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e manutenção dos organismos-teste

Os organismos-teste utilizados foram camarões “fantasma” (*Palaemon pandaliformis*), provenientes do rio Mandira, localizado no município de Cananeia, São Paulo, Brasil. As capturas dos animais ocorreram sempre nas áreas marginais do rio durante a maré-baixa com o uso de uma pequena rede coletora de crustáceos. Os espécimes coletados foram encaminhados ao laboratório de Estudos Ecotoxicológicos do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul em Cananéia. Durante sete dias os camarões permaneceram em um tanque circular de 2000 L com aeração contínua e temperatura controlada. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial extrusada. Foi realizada uma triagem dos animais (tamanho) antes dos testes para evitar canibalismo entre os indivíduos. Os animais utilizados como organismos-teste foram escolhidos de acordo com as recomendações de EPA (2002).

2.2. Reagentes químicos utilizados

Durante os testes desta pesquisa foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM), de acordo com os procedimentos descritos em MARTINEZ *et al.* (2013) e fornecidos pelo laboratório de Química do Estado Sólido do Instituto de Química / Unicamp - e Cloreto de chumbo na forma de ($PbCl_2$) obtido comercialmente na Sigma-Aldrich. Previamente aos testes, as soluções estoques dos reagentes passaram por banho de ultrassom durante o período de 1 hora com o uso de Cole-parmer 8891.

2.3. CL50 e Percentual de letalidade dos organismos

Nos ensaios de toxicidade aguda foram utilizados 15 camarões por unidade experimental, tanto no grupo controle como nos demais tratamentos, totalizando 270 indivíduos por substância testada, distribuídos em 6 aquários

de 10 litros com 2L de água, aeração individual constante, e aclimatados durante 2h nestas condições antes de cada ensaio para atenuar estresse dos animais. Estes testes foram realizados em triplicatas.

Os métodos adotados para os ensaios de toxicidade aguda em camarões foram baseados no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA-American Public Health Association, 1998).

Os ensaios foram realizados em diferentes concentrações de Nanotubos de Carbono (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5, 1 e 3 mg/l), Chumbo (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 3 mg/l), e em associação destes contaminantes, Chumbo (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 3 mg/l) com a adição de 0,5 mg/l de Nanotubos de Carbono.

Ao longo de todo o período de experimento foi observado o comportamento dos animais para avaliar o índice de letalidade dos indivíduos em cada concentração, tomando-se o cuidado de retirar e contar os espécimes mortos nas 24, 48, 72 e 96 h. Após 96 horas de experimentos, com os dados obtidos, foi possível determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) – com 95% de limite de confiança – para os contaminantes nos camarões com o uso do método estatístico Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977).

2.4. Consumo Específico de Oxigênio

Para avaliar o Consumo Específico de Oxigênio, através do metabolismo de rotina, foram utilizados 72 camarões com massa úmida média de 0,55 g e comprimento total médio de 3,36 centímetros de comprimento. Os espécimes foram aclimatados durante 1 hora em três respirômetros com volumes conhecidos (R₁= 450, R₂= 500 e R₃= 500 ml) mantidos em um sistema com circulação contínua de água. Os animais utilizados foram mantidos em jejum de 24 horas com o objetivo de reduzir a demanda de oxigênio associada ao processo digestivo, como descrito em Spanopoulos-Hernández *et al.* (2005). Após a aclimação dos indivíduos, foi adicionado o contaminante aos respirômetros e estes foram fechados e mantidos assim por 2 horas para que houvesse o consumo de oxigênio pelos animais em confinamento.

Os animais foram expostos às seguintes concentrações de nanotubos de carbono: 0,2; 0,4 e 0,5 mg/L; chumbo nas seguintes concentrações: 0, 22; 0,60 e 1,2 mg/L, respectivamente, e 0,5 mg/L de NTC adicionado às respectivas concentrações de chumbo (0,22; 0,60 e 1,2 mg/L). Em todos os testes as soluções de contaminantes foram pipetadas diretamente nos respirômetros proporcionando contato imediato dos organismos com as concentrações testadas. Para cada teste, nas diferentes concentrações, foi adotado um controle. Nenhum camarão foi utilizado mais de uma vez.

A água dos respirômetros foi coletada para avaliar o oxigênio dissolvido e o método utilizado para esta avaliação foi feito pela técnica desenvolvida por WINKLER (1888). O cálculo do consumo específico de oxigênio ($\text{mlO}_2/\text{g/h}$) foi realizado através da diferença entre as concentrações de oxigênio dissolvido (água de entrada no sistema e água dos respirômetros) obtidas no início e no final do confinamento dos espécimes. Para o cálculo foi considerado ainda o volume dos respirômetros e o peso úmido de cada indivíduo.

2.5. Excreção de Amônia

Amostras de água também foram coletadas para quantificar a taxa de amônia total pelo método colorimétrico de KOROLEFF (1970). Para calcular a quantidade de amônia excretada, foram utilizados os valores de amônia total na água de entrada do sistema e em cada respirômetro, o volume dos respirômetros onde os animais foram mantidos em contato com os contaminantes, e, o peso dos indivíduos expostos.

2.6. Análises Estatísticas

Os testes estatísticos deste estudo foram feitos com uma confiabilidade de 95% e para verificar se os dados seguiam ou não normalidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para verificar diferenças significativas (quando houve normalidade) e teste de Kruskal Wallis (quando não houve normalidade). Na interpretação dos

resultados das análises, em ambos os testes, foi possível identificar quando houve diferença significativa com $p < 0,05$.

As diferenças estatísticas entre as médias de mesmo tratamento foram submetidas ao teste de comparações múltiplas. Em todos os ensaios os dados são apresentados por média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. CL₅₀ e letalidade dos indivíduos

Os resultados da exposição de *P. pandaliformis* nas concentrações de Nanotubos de Carbono (NTC) utilizadas neste experimento por até 96 h e sua concentração letal média (CL₅₀ com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber, não demonstraram letalidade dos organismos (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ para *Palaemon pandaliformis* expostos aos Nanotubos de Carbono.

Tempo de Exposição (h)	Concentração de NTC (mg/L)							CL ₅₀ (mg/L)
	0,0	0,05	0,1	0,25	0,5	1	3	
24	0	0	0	0	0	0	0	Não Letal
48	0	0	0	0	0	0	0	Não Letal
72	0	0	0	0	0	0	0	Não Letal
96	0	0	0	0	0	0	26,6	Não Letal

Os resultados da CL₅₀ nas 24, 48, 72 e 96 horas quando os camarões foram expostos às concentrações de Pb e de Pb com adição de 0,5 mg/L de NTC podem ser visualizados nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ para *Palaemon pandaliformis* expostos ao chumbo (Pb).

Tempo de Exposição (h)	Concentração de Pb (mg/L)								
	0,0	0,05	0,1	0,25	0,5	1	3	CL ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confiança
24	0	6,6	0	60	60	100	100	0,40	0,31 – 0,51
48	0	6,6	0	86,6	86,6	100	100	0,33	0,27 – 0,41
72	0	26,6	0	100	100	100	100	0,24	0,19 – 0,31
96	0	46,6	0	100	100	100	100	0,20	0,15 – 0,26

Tabela 3: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ para *Palaemon pandaliformis* expostos ao Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono (NTC).

Tempo de Exposição (h)	Concentração de chumbo (mg/L) com 0.5 mg/L NTC								
	0,0	0,05	0,1	0,25	0,5	1	3	CL ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confiança
24	0	6,6	13,3	40	26,6	100	100	0,41	(0,29 - 0,57)
48	0	6,6	26,6	46,6	86,6	100	100	0,21	(0,15 - 0,30)
72	0	20	86,6	86,6	86,6	100	100	0,07	(0,06 - 0,08)
96	0	20	93,3	93,3	93,3	100	100	0,07	(0,06 - 0,08)

Ao compararmos os valores da CL₅₀ quando os camarões foram expostos ao Pb com a combinação de Pb + 0,5 mg/L de NTC podemos observar que a CL₅₀ diminuiu após 48, 72 e 96 horas. Esse resultado evidencia um aumento da toxicidade quando os poluentes foram associados.

3.2. Consumo Específico de Oxigênio

A figura 1 mostra os valores da média do consumo específico de oxigênio dos organismos expostos às diferentes concentrações de nanotubos de carbono (NTC). Foi identificada diferença estatística em relação ao controle (0,0 mg/L) na concentração 0,2 mg/L.

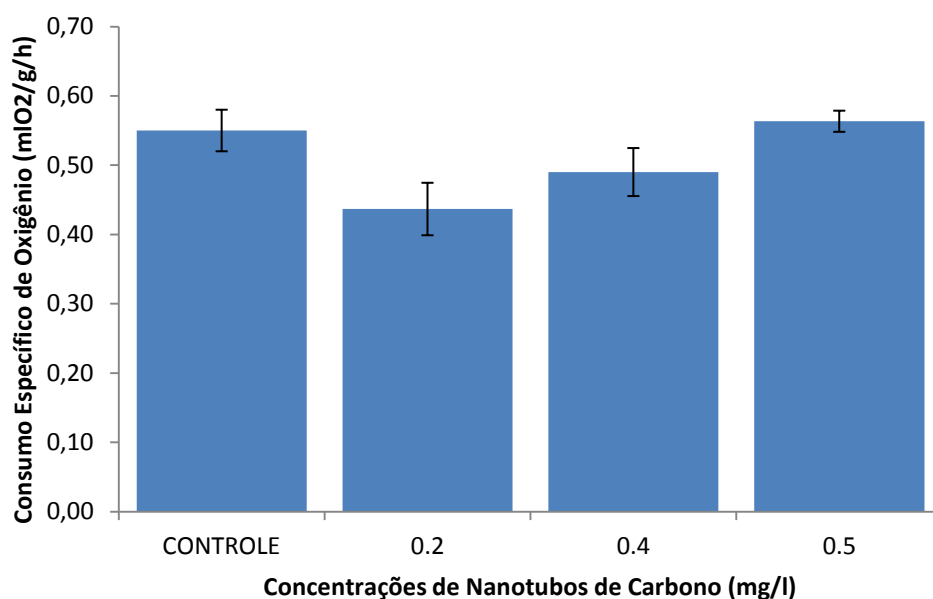


Figura 1 - Consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/h) conforme variação na concentração de Nanotubos de carbono (mg/L).

Quando os camarões foram expostos às concentrações de Pb (Figura 2) e concentrações de Pb com adição de 0,5 mg/L de NTC (Figura 3), em ambos os ensaios, pode-se observar que os valores médios obtidos foram estatisticamente diferentes em relação ao controle em todas as concentrações empregadas.

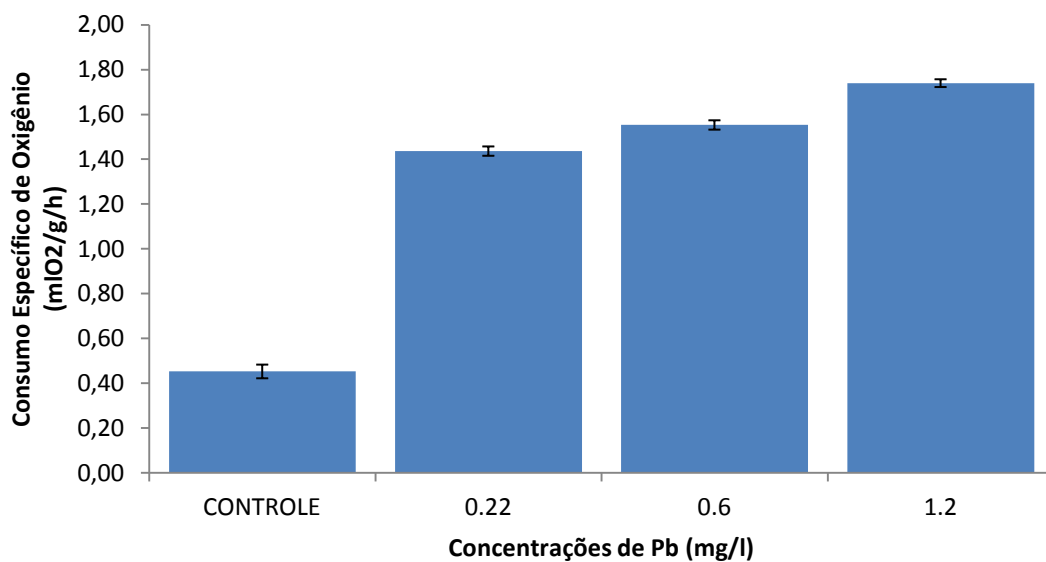


Figura 2 - Consumo específico de oxigênio (mLO2/g/h) conforme variação na concentração de chumbo (mg/L).

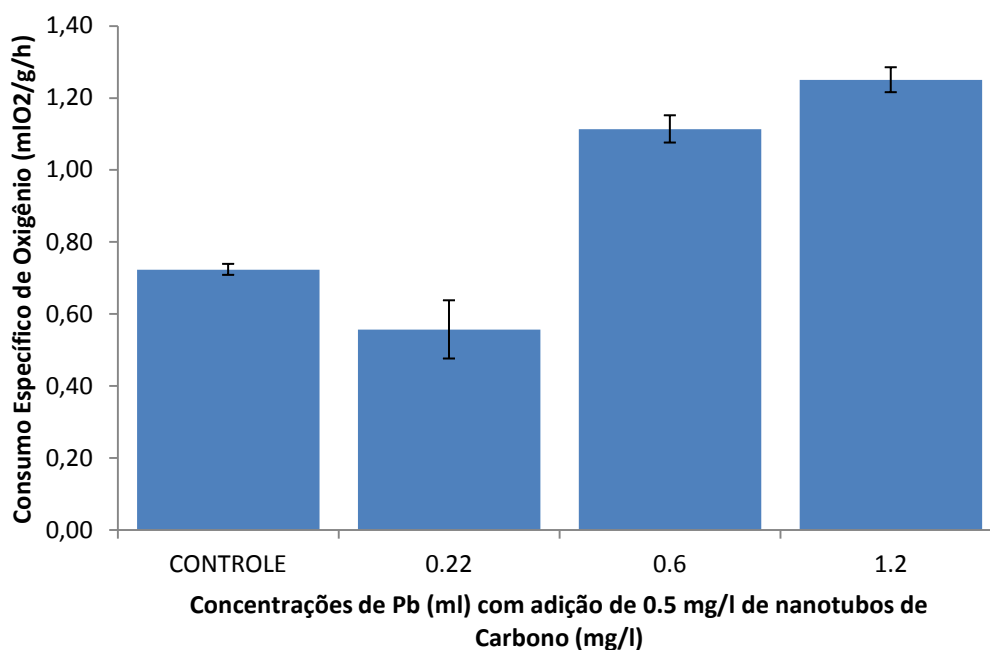


Figura 3 - Consumo específico de oxigênio (mLO2/g/h) conforme variação nas concentrações de Pb (mg/L) com adição de 0,5 mg/L de NTC.

3.3. Excreção de amônia

As médias de excreção de amônia nas concentrações de nanotubos de carbono (0,2, 0,4 e 0,5 mg/L) empregadas nos experimentos demonstraram diferença estatística em relação ao controle em todas as concentrações aplicadas (Figura 4).

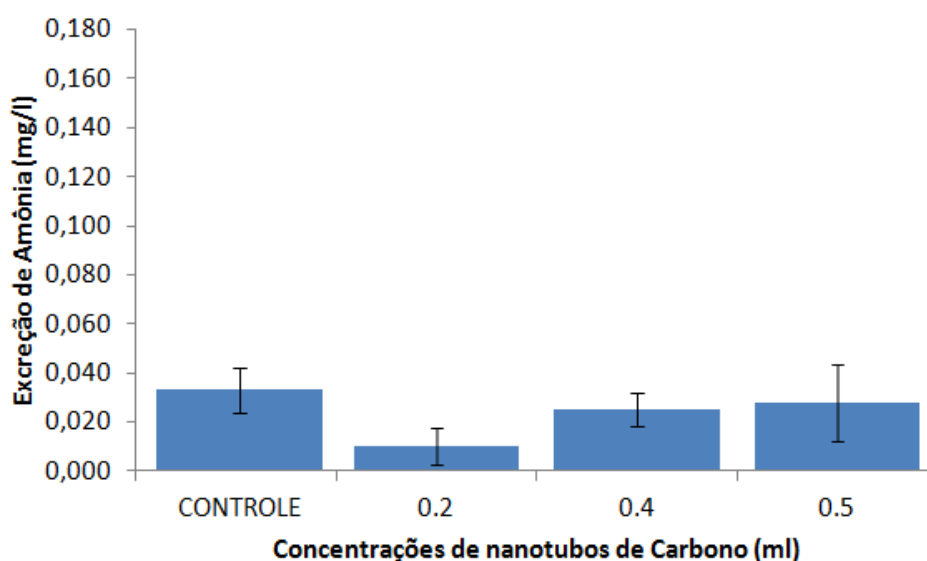


Figura 4: Excreção de Amônia (mg/L/h) para organismos expostos em concentrações de Nanotubos de Carbono.

Nos experimentos com chumbo nas concentrações 0,22; 0,6 e 1,2 mg/L, houve diferença significativa em relação ao controle nas concentrações 0,6 e 1,2 mg/L (Figura 5).

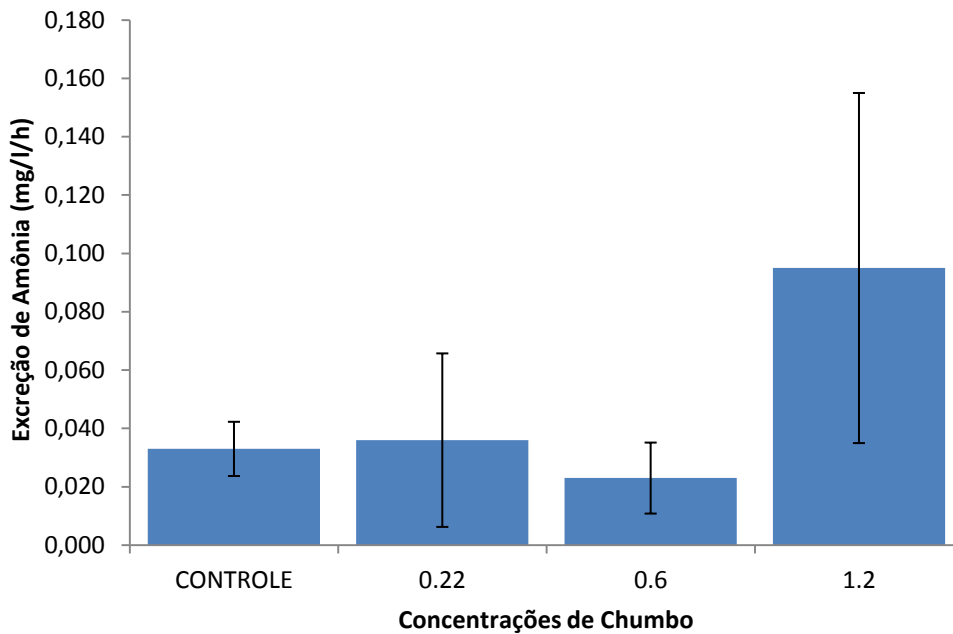


Figura 5: Excreção de Amônia (mg/L/h) para organismos expostos em concentrações de Chumbo.

Nas concentrações de Pb em que foram adicionadas 0,5 mg/L de NTC, todas as concentrações aplicadas (0,22; 0,6 e 1,2 mg/L) diferem estatisticamente do controle.

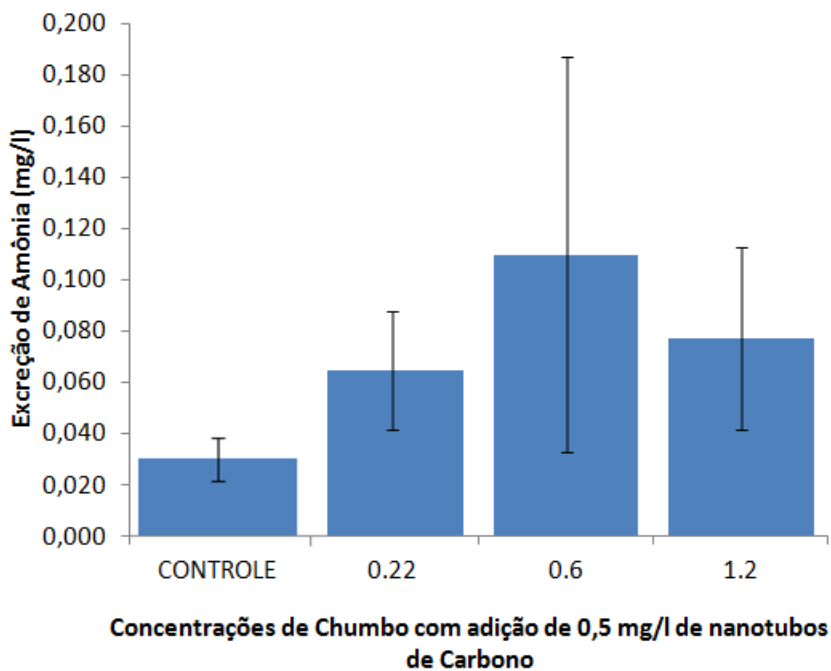


Figura 6: Excreção de Amônia (mg/L/h) para organismos expostos em concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono.

4. DISCUSSÃO

A avaliação dos efeitos de poluentes em organismos vivos é de alta complexidade devido às interferências físico-químicas no meio externo e nas atividades vitais destes animais, assim, para monitorar a qualidade de um ambiente são avaliados os efeitos em organismos de importantes implicações ecológicas, com isso, para quantificar as alterações nas taxas de mortalidade dos organismos, testes de CL50 são empregados com esta finalidade (BARBIERI *et al.*, 2000).

PERALTA-VIDEA *et al.* (2011) destaca a importância do uso de invertebrados aquáticos em ensaios de toxicidade aguda e crônica de nanopartículas devido estes animais serem os destinatários finais da maioria dos contaminantes lançados no meio ambiente.

Desta forma, os resultados obtidos nos testes de toxicidade foram essenciais para verificar a sensibilidade desta espécie na presença dos xenobiontes utilizados e para calcular as concentrações aplicadas nos testes do consumo específico de oxigênio e excreção de amônia. Os ensaios de toxicidade realizados neste estudo são considerados testes agudos que envolvem caráter letal e objetivaram aferir a sensibilidade de camarões da espécie *Palaemon pandaliformis* em contato com substâncias consideradas tóxicas.

A concentração de Pb e o tempo de exposição utilizados são alguns dos fatores relacionados com a absorção e retenção deste metal no trato respiratório (BARBIERI *et al.*, 2013). SANTOS *et al.* (2014) ao estudar os efeitos do Pb no metabolismo do camarão *Litopenaeus schmitti* em diferentes salinidades, destacam que a menor quantidade de oxigênio consumido pode ter relação com os danos citológicos provocados nas brânquias, pois estas são o alvo inicial da contaminação por metais.

De acordo com estudos realizados por SPICER e WEBER (1991), a diminuição da taxa do consumo de oxigênio em crustáceo é geralmente predominante na presença de metais pesados. Em testes com o camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) no estudo realizado por DOI *et al.* (2012), os

resultados apresentaram diminuição do consumo específico de oxigênio. Outros estudos também obtiveram resultados onde o consumo de oxigênio foi inibido quando camarões foram expostos a metais pesados (AMAND *et al.*, 1999; CHINNI *et al.*, 2002; WU e CHEN, 2004; BARBIERI *et al.*, 2004).

Nos ensaios do metabolismo de rotina com *P. pandaliformis* expostos ao chumbo, os resultados demonstraram que os camarões passaram a consumir mais oxigênio à medida que as concentrações aplicadas foram elevadas. O mesmo ocorreu em testes com camarões da espécie *Litopenaeus schmitti* expostos a concentrações de chumbo em diferentes salinidades onde o aumento no consumo de oxigênio foi predominante na salinidade 5 (SANTOS *et al.*, 2014).

Devido a sua grande área superficial, os nanotubos de carbono podem captar e transportar moléculas de poluentes ambientais aderidos em sua superfície (KLEINER *et al.*, 2003). As nanopartículas demonstraram provável capacidade de transporte de outras substâncias no estudo realizado por BAUN *et al.* (2008), onde a captação do fenantreno por *Daphnia magna* foi mais rápida na presença de nanopartículas de carbono. Tal comportamento comprova o que foi declarado por HANDY (2008), onde o autor considera que poluentes encontrados no meio ambiente tem sua toxicidade agravada ao interagirem com nanopartículas de carbono.

Durante os experimentos da interação de Pb com nanotubos de carbono o consumo específico de oxigênio não foi superior ao controle apenas na menor concentração aplicada, entretanto nas duas maiores concentrações os animais apresentaram comportamento semelhante ao ocorrido nos experimentos que continham apenas chumbo. Nestas condições houve maior consumo específico de oxigênio e isto pode evidenciar um aumento no metabolismo dos camarões que durante os experimentos não apresentaram nenhum indicio de baixa mobilidade quando expostos às maiores concentrações.

Em camarões, a amônia é um dos produtos finais do catabolismo (SANTOS *et al.*, 2014). O aumento da excreção de amônia nas maiores concentrações demonstra o aumento do catabolismo de ácidos aminados. No presente estudo a excreção de amônia por *P. pandaliformis* aumentou quando

os organismos foram expostos à maior concentração do Pb e também quando o Pb recebeu a adição de 0,5 mg/L de nanotubos de carbono, demonstrando uma provável tentativa de estabilização dos padrões metabólicos dos camarões na presença dos dois xenobiontes. Embora não haja uma análise mais aprofundada que confirme esta evidencia, podemos atribuir o aumento na excreção de amônia na presença de contaminantes a um aumento da taxa metabólica dos animais.

Em estudos com camarões da espécie *P. paulensis* em sedimentos contaminados, MORAES *et al.* (1999) verificou aumento na taxa de excreção de amônia. A excreção de amônia foi inibida em estudos realizados por CHINNI *et al.* (2002) utilizando pós larvas de *Penaeus indicus* expostas a concentrações de Pb e acredita-se que esta diminuição na excreção esteja associada a redução da taxa metabólica ou uma interação de ligação com as vias que produzem a amônia (BARBIERI *et al.*, 2013).

A aparente maximização da toxicidade do Pb com nanotubos de carbono sobre *P. pandaliformis* evidenciada neste estudo não causou diminuição no consumo específico de oxigênio e na excreção de amônia, pois os camarões passaram a consumir ainda mais oxigênio durante a associação dos dois compostos. Este comportamento pode estar relacionado ao tempo de exposição ao contaminante, ao ciclo de vida no qual o animal se encontra ou ainda ao tipo de espécie utilizada.

Devemos considerar ainda que as condições laboratoriais aplicadas neste estudo diferem daquelas encontradas em ambiente natural onde os camarões encontram-se expostos aos diversos parâmetros ambientais, e que sob influência dos contaminantes estudados aqui poderiam causar alterações em outros padrões metabólicos destes animais como ciclo reprodutivo, taxa de crescimento e atividade natatória.

5. CONCLUSÕES

Nos ensaios de toxicidade aguda com NTC, Pb e Pb com adição de 0,5 mg/L de NTC, a toxicidade foi mais elevada quando em contato com os contaminantes associados no maior tempo de exposição.

As concentrações testadas neste estudo causaram maior consumo de O₂ e excreção de NH₄ pelos camarões, nos experimentos em que o Pb recebeu a adição de 0,5 mg/L de nanotubos de carbono. Estes resultados reforçam as evidências de que os nanotubos de carbono quando associados tendem a alterar o comportamento de outras substâncias tóxicas.

A avaliação da sensibilidade de *P. pandaliformis* a estes poluentes fornece informações para o conhecimento dos efeitos e reações provocadas nestes crustáceos presentes nas regiões estuarinas quando em contato com estas substâncias, dando subsídios importantes para manutenção dos estoques naturais.

Novas investigações precisam ser realizadas sobre os mecanismos da modulação de nanotubos de carbono com outras substâncias que podem afetar os ambientes aquáticos e os organismos presentes. Para que possamos entender como estes organismos reagem quando em contato com estas substâncias é preciso que se desenvolvam pesquisas voltadas para as diferentes espécies da cadeia presentes em um determinado ambiente, possibilitando a obtenção de melhores resultados quando surgirem situações de riscos ambientais.

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. Processo número 2012/50184-8.

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 para a elaboração e desenvolvimento deste projeto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). 2010. Panorama nanotecnologia. (Série Cadernos da Indústria ABDI XIX). Brasília. 180 p.

AMAND, L.ST.; GAGNON, R.; PACKARD, T.T.; SAVENKOFF. C. 1999. Effects of inorganic mercury on the respiration and the swimming activity of shrimp larvae, *Pandalus borealis*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C. 122(1): 33-43.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 Ed. Washington, D.C.

BARBIERI, E.; PHAN, V.N.; GOMES, V. 2000. Effects of LAS-C12, Linear Alkybenzene Sulphonate, on Metabolic rate and Swimming Capacity of *Cyprinus carpio*. Ecotoxicology Environmental Restoration. 3(2): 60-75.

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

BARBIERI, E.; MOREIRA, P.; LUCHINI, L. A.; HIDALGO, K. R.; MUÑOZ, A. 2013. Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at different temperature levels. Toxicology and Industrial Health: 0748233713484655.

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

- BARBIERI, E. 2007. Use of Oxygen Consumption and Ammonium Excretion to Evaluate the Sublethal Toxicity of Cadmium and Zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *Water Environment Research*. 79(1): 324-330.
- BAUN, A., SORENSEN, S.N., RASMUSSEN, R.F., HARTMANN, N.B., KOCH, C.B. 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology*. 86(3): 379-387.
- BECARO, A. A.; PUTI, F. C.; CORREA D. S; FERREIRA, M. D. 2013. Avaliação toxicológica de nanopartículas de prata. VII Workshop de Nanotecnologia Aplicado ao Agronegócio. São Carlos. Artigo em anais de congresso.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia*. 49(4): 883-896.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1999. Caridea (pitos, camarões de água doce e marinhos). In: BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. (Eds.). Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Ed. UFRGS. Porto Alegre. 300-318 p.
- BRITTO, R. S.; GARCIA, M. L.; MARTINS DA ROCHA, A.; FLORES, J. A.; PINHEIRO, M. V. B.; MONSERRAT, J. M.; FERREIRA, J. L. R. 2012. Effects of carbon nanomaterials fullerene C 60 and fullerol C 60(OH) 18–22 on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. *Aquatic Toxicology*. 114: 80-87.
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51(2): 79-84.
- COELHO, P. A. 1963/1964. Distribuição dos Crustáceos Decápodes na área de Barra da Jangadas. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*. 5/6: 159-173 p.
- DE MELO, G. A. S. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Edições Loyola. 376 p.
- DOI, A. S.; COLLAÇO, F. L.; STURARO, L. G. R.; BARBIERI, E. 2012. Efeito do chumbo em nível de oxigênio e amônia no camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) em relação à salinidade. *O Mundo da Saúde*. 36(4): 594-601.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2002. EPA-821-R-02-1: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Washigton. U.S.A. 5º edição.
- GUAZZELLI, M.J.; PEREZ, J. 2009. Nanotecnologia: a manipulação do invisível. Rio Grande do Sul: Copyleft. Disponível em

<http://www.boellalatioamerica.org/downloads/RevistaNanotecnologia.pdf>.
Acesso em 25 de 08 de 2013.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. 1977/1978. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Correction Environmental Science Technology*. 11(7): 714-719.

HANDY, R.D.; AI-BAIRUTY, G.; AI-JUBORY, A.; RAMSDEN, C.S.; BOYLE, D.; SHAW, B.J.; HENRY, T.B. 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*. 79(4): 821 – 853.

HOLTHUIS, L. B. 1980. FAO Species Catalogue. Shrimps and Prawns of the World. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries Synopsis. 125(1): 1-26.

KLAPER, R.; ARNDT, D.; CHEN, J.; GOETZ, F. 2010. Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 100(2): 211-217.

KLEINER, K.; HOGAN, J. 2003. How safe is nanotech? *New Scientist*. 177(2388):14-15.

KOROLEFF, F. 1970. Determination of total phosphorus in natural waters by means of persulfate oxidation. International Council for the Exploration of the Sea (ICES). Report No. 3.

KOSNETT, M. J. 2003. Intoxicação por Metais Pesados & Quelantes. In: KATZUNG, Bertram G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 867-870 p.

MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2013. Carbon nanotubes enhanced the toxicity of lead on freshwater fish. *Journal of Physics: Conference Series* 429, doi:10.1088/1742-6596/429/1/012043.

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

PAOLIELLO, M. B.; CHASIN, A. M. 2001. *Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos*. Salvador: CRA - Centro de Recursos Ambientais. Série Cadernos de Referência Ambiental. v. 003. 144 p.

PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPES-MORENO, M.; DE LA ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. 2011. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *Journal of Hazardous Materials*. 1(186):1-15.

SANTOS, D. B.; BARBIERI, E.; BONDIOLI, A. C. V.; DE MELO, C. B. 2014. Effects of Lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *O Mundo da Saúde*. 36(4) 594-601.

SCHIFER, S., T. ; S. B. JUNIOR. 2013. Aspectos toxicológicos do chumbo. *Infarma*. 17(5/6): 67-72.

SPANOPOULOS-HERNÁNDEZ, M.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; VANEGAS-PÉREZ, R. C.; ROSAS, C.; ROSS, L. G. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture*. 244(1): 341-348.

SPICER, J.I. e WEBER, R.E. 1991. Respiratory impairment in crustaceans and mollusks due to exposure to heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 100(3): 339–342 p.

TEIXEIRA, R.L.; SÁ, H.S. 1998. Abundância de macrocrustáceos decápodos nas áreas rasas do complexo Lagunar Mundaú/ Manguaba, AL. *Revista Brasileira de Biologia*. 58(3): 398-404.

U.S. Environmental Protection Agency. USEPA. 2000. Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System Program. EPA/833/R-00/003. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Wastewater Management, Washington, D.C.

WINKLER, L. 1888. Methods for measurement of dissolved oxygen. *Ber Deutsch Chem Ges*. 21:2843-5.

WU, J.P. e CHEN, H.C. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*. 57(11): 1591-1598.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os organismos aquáticos normalmente correm risco de exposição a diversos tipos de poluentes de origem naturais ou antropogênicas, como os metais pesados e as nanopartículas de carbono que são consideradas poluentes emergentes, e estes podem trazer algum tipo de prejuízo para espécies aquáticas.

Várias espécies de camarões de água doce habitam a área onde os *Palaemon pandaliformis* foram coletados (Rio Mandira), porém ainda é desconhecido o comportamento destes animais quando entram em contato com substâncias tóxicas que possam afetar o funcionamento de suas atividades metabólicas podendo levá-los a morte e prejudicando o equilíbrio da cadeia alimentar onde estão presente.

Desta maneira, é importante obter informações sobre o comportamento de espécies que habitam essas regiões dando subsídios para uma melhor compreensão dos níveis em que substâncias tóxicas podem afetar os organismos aquáticos presentes.

No entanto, ainda é desconhecido o comportamento de várias espécies aquáticas quando em contato com substâncias químicas e dessa forma sugere-se que sejam avaliados os efeitos de diversos poluentes em diferentes organismos presentes nas regiões estuarinas para obtenção de dados importantes para facilitar o monitoramento de áreas sujeitas a perturbações ambientais.

APÊNDICE

ANEXO 1 – Propriedades físico-químicas dos HNO₃-NTCPM utilizadas no Capítulo 1.

Propriedades físico-químicas	HNO ₃ -NTCPM	Técnica utilizada
Diâmetro (nm)	10-40	TEM
Comprimento (µm)	<10	FEG-SEM
Área de superfície (m ² /g)	264	BET method
Carga de superfície (mV)	-27	Zeta-potential
Temperatura de oxidação (°C)	587	TGA
Iron oxide metallic residue (%)	<2.0	Analytical microbalance
Defects (I _D /I _G ratio)	1.02	Raman

ANEXO 2 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS CAPÍTULO 1

O software utilizado para as análises estatísticas foi o **IBM SPSS Statistics**, versão 21.

Estatísticas descritivas

Dados do Consumo de oxigênio

Concentrações de Nanotubos de Carbono (mg/L)

Grupo		Controle	0,2	0,4	0,5
Média		0,550	0,437	0,490	0,563
Intervalo de confiança de 95% para média	Limite inferior	0,475	0,343	0,404	0,525
	Limite superior	0,625	0,531	0,576	0,601
Mediana		0,550	0,420	0,510	0,560
Variância		0,001	0,001	0,001	0,000
Desvio padrão		0,030	0,038	0,035	0,015
Mínimo		0,520	0,410	0,450	0,550
Máximo		0,580	0,480	0,510	0,580
Range		0,060	0,070	0,060	0,030

Concentrações de Chumbo (mg/L)

Grupo		Controle	0,22	0,6	1,2
Média		0,453	1,437	1,553	1,740
Intervalo de confiança de 95% para média	Limite inferior	0,377	1,385	1,502	1,697
	Limite superior	0,529	1,488	1,605	1,783
Mediana		0,460	1,430	1,560	1,730
Variância		0,001	0,000	0,000	0,000
Desvio padrão		0,031	0,021	0,021	0,017
Mínimo		0,420	1,420	1,530	1,730
Máximo		0,480	1,460	1,570	1,760
Range		0,060	0,040	0,040	0,030

Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono.

Grupo		Controle	0,22	0,6	1,2
Média		0,723	0,557	1,113	1,250
Intervalo de confiança de 95% para média	Limite inferior	0,685	0,356	1,019	1,164
	Limite superior	0,761	0,757	1,207	1,336
Mediana		0,720	0,570	1,130	1,230
Variância		0,000	0,007	0,001	0,001
Desvio padrão		0,015	0,081	0,038	0,035
Mínimo		0,710	0,470	1,070	1,230
Máximo		0,740	0,630	1,140	1,290
Range		0,030	0,160	0,070	0,060

Dados da Excreção de amônia

Concentrações de Nanotubos de Carbono (mg/L)

Grupo		Controle	0,2	0,4	0,5
Média		0,033	0,010	0,025	0,028
Intervalo de confiança de 95% para média	Limite inferior	-	-0,009	0,009	-0,010
	Limite superior	-	0,029	0,042	0,067
Mediana		-	0,012	0,022	0,022
Variância		-	0,000	0,000	0,000
Desvio padrão		-	0,008	0,007	0,016
Mínimo		-	0,002	0,021	0,017
Máximo		-	0,017	0,033	0,046
Range		-	0,015	0,012	0,029

Concentrações de Chumbo (mg/L)

Grupo		Controle	0,22	0,6	1,2
Média		0,033	0,036	0,023	0,095
Intervalo de confiança de 95% para média	-	-	-0,038	-0,007	-0,054
	-	-	0,110	0,053	0,244
Mediana		-	0,032	0,017	0,066
Variância		-	0,001	0,000	0,004
Desvio padrão		-	0,030	0,012	0,060
Mínimo		-	0,009	0,015	0,055
Máximo		-	0,068	0,037	0,164
Range		-	0,059	0,022	0,109

Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono

Grupo	Controle	0,22	0,6	1,2
Média	0,033	0,065	0,110	0,077
Intervalo de confiança de 95% para média	-	0,008	-0,082	-0,011
	-	0,121	0,301	0,165
Mediana	-	0,052	0,100	0,096
Variância	-	0,001	0,006	0,001
Desvio padrão	-	0,023	0,077	0,036
Mínimo	-	0,051	0,038	0,036
Máximo	-	0,091	0,191	0,099
Range	-	0,040	0,153	0,063

Testes de Normalidade dos dados

Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

Grupos		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Consumo de oxigênio	Concentrações de Nanotubos de Carbono (ml)	0,168	12	0,200	0,917	12	0,265
	Concentrações de Chumbo	0,344	12	0,000	0,741	12	0,002
	Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono	0,218	12	0,122	0,884	12	0,098
Excreção de amônia	Concentrações de Nanotubos de Carbono (ml)	0,166	12	0,200	0,876	12	0,078
	Concentrações de Chumbo	0,260	12	0,025	0,738	12	0,002
	Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono	0,240	12	0,055	0,789	12	0,007

Testes aplicados entre as médias dos grupos

Grupos		Teste de comparação de médias aplicado
Consumo de oxigênio	Concentrações de Nanotubos de Carbono	ANOVA
	Concentrações de Chumbo	Kruskal Wallis
	Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono	ANOVA
Excreção de amônia	Concentrações de Nanotubos de Carbono	ANOVA
	Concentrações de Chumbo	Kruskal Wallis
	Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono	Kruskal Wallis

Diferenças significativas encontradas pelos testes:

Consumo de oxigênio

Concentrações de Nanotubos de Carbono (mg/L)

ANOVA

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	P-Valor
Entre Grupos	0,03	3,00	0,01	10,86	0,00**
Nos grupos	0,01	8,00	0,00		
Total	0,04	11,00			

****Significativo ao nível de confiança de 95%**

Teste de comparações múltiplas

(I) Grupo		Diferença média (I-J)	Modelo padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%			
					Limite inferior	Limite superior		
Tukey HSD	Controle	0,2	0,11333*	0,03	0,01	0,03	0,19	
		0,4	0,06	0,03	0,16	-0,02	0,14	
		0,5	-0,01	0,03	0,95	-0,09	0,07	
	0,2	Controle	-0,11333*	0,03	0,01	0,01	-0,19	-0,03
		0,4	-0,05	0,03	0,22	0,22	-0,13	0,03
		0,5	-0,12667*	0,03	0,00	0,00	-0,21	-0,05
	0,4	Controle	-0,06	0,03	0,16	0,16	-0,14	0,02
		0,2	0,05	0,03	0,22	0,22	-0,03	0,13
		0,5	-0,07	0,03	0,07	0,07	-0,15	0,01
	0,5	Controle	0,01	0,03	0,95	0,95	-0,07	0,09
		0,2	0,12667*	0,03	0,00	0,00	0,05	0,21
		0,4	0,07	0,03	0,07	0,07	-0,01	0,15

*A diferença média é significativa no nível de confiança de 95%

Concentrações de Chumbo (mg/L)

Teste de Kruskal Wallis

Qui-quadrado	Graus de liberdade	P- Valor
10,42105263	3	0,0153**

**Significativo ao nível de confiança de 95%

Teste de comparações múltiplas

(I) Grupo		Diferença média (I-J)	Modelo padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%			
					Limite inferior	Limite superior		
Tukey HSD	Controle	0,22	-0,98333 [~]	0,02	0,00	-1,04	-0,92	
		0,6	-1,10000 [~]	0,02	0,00	-1,16	-1,04	
		1,2	-1,28667 [~]	0,02	0,00	-1,35	-1,23	
	0,22	Controle	0,98333 [~]	0,02	0,00	0,00	0,92	1,04
		0,6	-0,11667 [~]	0,02	0,00	0,00	-0,18	-0,06
		1,2	-0,30333 [~]	0,02	0,00	0,00	-0,36	-0,24
	0,6	Controle	1,10000 [~]	0,02	0,00	0,00	1,04	1,16
		0,22	0,11667 [~]	0,02	0,00	0,00	0,06	0,18
		1,2	-0,18667 [~]	0,02	0,00	0,00	-0,25	-0,13
	1,2	Controle	1,28667 [~]	0,02	0,00	0,00	1,23	1,35
		0,22	0,30333 [~]	0,02	0,00	0,00	0,24	0,36
		0,6	0,18667 [~]	0,02	0,00	0,00	0,13	0,25

* A diferença média é significativa no nível de confiança de 95%

Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono

Anova

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	P-Valor
Entre Grupos	0,95	3,00	0,32	134,74	0,00**
Nos grupos	0,02	8,00	0,00		
Total	0,97	11,00			

**Significativo ao nível de confiança de 95%

Teste de comparações múltiplas

(I) Grupo		Diferença média (I-J)	Modelo padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%		
					Limite inferior	Limite superior	
Tukey HSD	Controle	0,22	0,16667*	0,04	0,01	0,04	0,29
		0,6	-0,39000*	0,04	0,00	-0,52	-0,26
		1,2	-0,52667*	0,04	0,00	-0,65	-0,40
	0,22	Controle	-0,16667*	0,04	0,01	-0,29	-0,04
		0,6	-0,55667*	0,04	0,00	-0,68	-0,43
		1,2	-0,69333*	0,04	0,00	-0,82	-0,57
	0,6	Controle	0,39000*	0,04	0,00	0,26	0,52
		0,22	0,55667*	0,04	0,00	0,43	0,68
		1,2	-0,13667*	0,04	0,04	-0,26	-0,01
	1,2	Controle	0,52667*	0,04	0,00	0,40	0,65
		0,22	0,69333*	0,04	0,00	0,57	0,82
		0,6	0,13667*	0,04	0,04	0,01	0,26

*A diferença média é significativa no nível de confiança de 95%

Excreção de amônia

Concentrações de Nanotubos de Carbono (mg/L)

Anova

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	P-Valor
Entre Grupos	0,001	3	0,000	3,293	0,079NS
Nos grupos	0,001	8	0,000		
Total	0,002	11			

NS: Não significativo ao nível de confiança de 95%

Concentrações de Chumbo (mg/L)

Teste de Kruskal Wallis

Qui-quadrado	Graus de liberdade	P- Valor
4,914894	3	0,178136 ^{NS}

NS: Não significativo ao nível de confiança de 95%

Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono

Teste de Kruskal Wallis

Qui-quadrado	Graus de liberdade	P- Valor
1,358974	3	0,715179 ^{NS}

NS: Não significativo ao nível de confiança de 95%

Grupos		Teste utilizado	Estatística de teste	Graus de liberdade	P - Valor
Consumo de oxigênio	Concentrações de Nanotubos de Carbono (ml)	ANOVA	F = 10,86	11	0,00**
	Concentrações de Chumbo	Kruskal Wallis	X ² = 10,42	3	0,015**
	Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono	ANOVA	F = 134,74	11	0,00**
Excreção de amônia	Concentrações de Nanotubos de Carbono (ml)	ANOVA	X ² = 3,293	3	0,079**
	Concentrações de Chumbo	Kruskal Wallis	X ² = 4,915	3	0,178**
	Concentrações de Chumbo com adição de 0.5 mg/L de Nanotubos de Carbono	Kruskal Wallis	X ² =6,995	3	0,072**

***A diferença média é significativa no nível de confiança de 95%.**

ANEXO 3 – Figuras ilustrativas

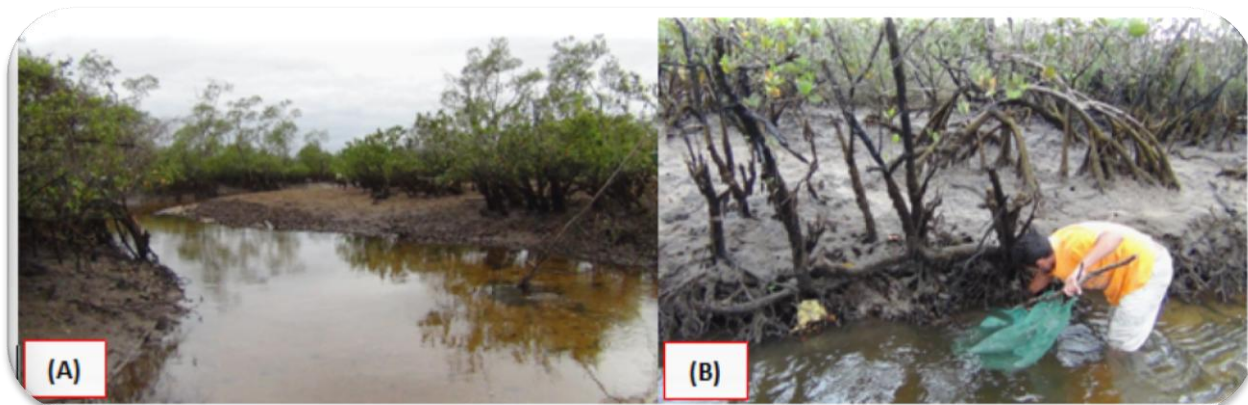


Figura 1: Local de captura das amostras de *P. pandaliformis*. (A): Trecho do Rio Mandira onde foram feitas as coletas dos espécimes utilizados. (B): Coleta dos camarões nas áreas marginais do mangue.

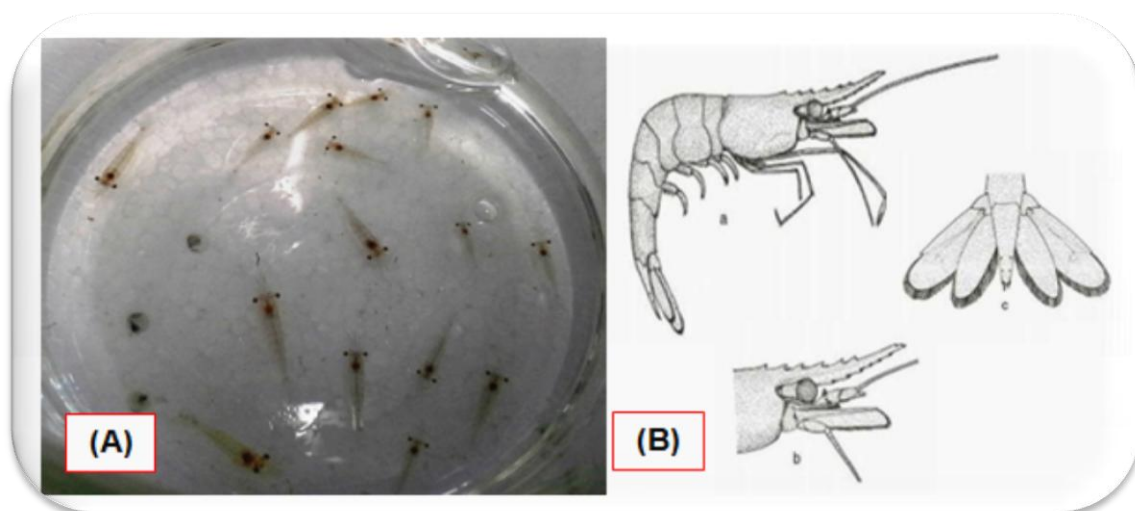


Figura 2: Camarões utilizados como organismo-teste nos experimentos. (A): Recipiente com camarões durante exposição aguda. (B): Ilustração da espécie (*P. pandaliformis*) retirada de De Melo (2003).



Figura 3: Tanques de aclimação dos camarões.

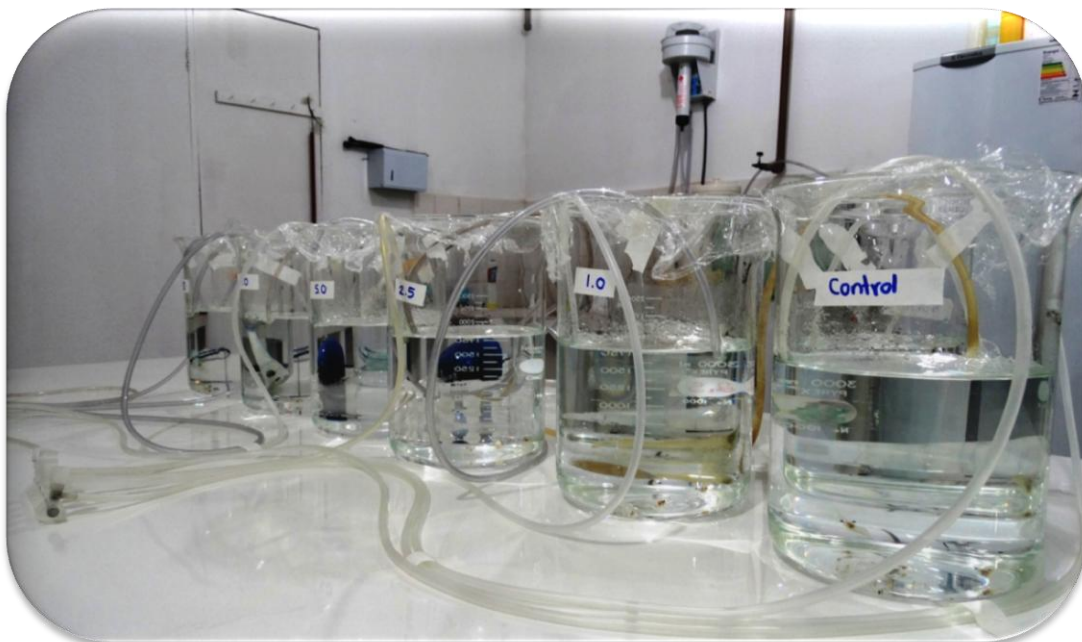


Figura 4: Delineamento experimental dos testes de exposição aguda

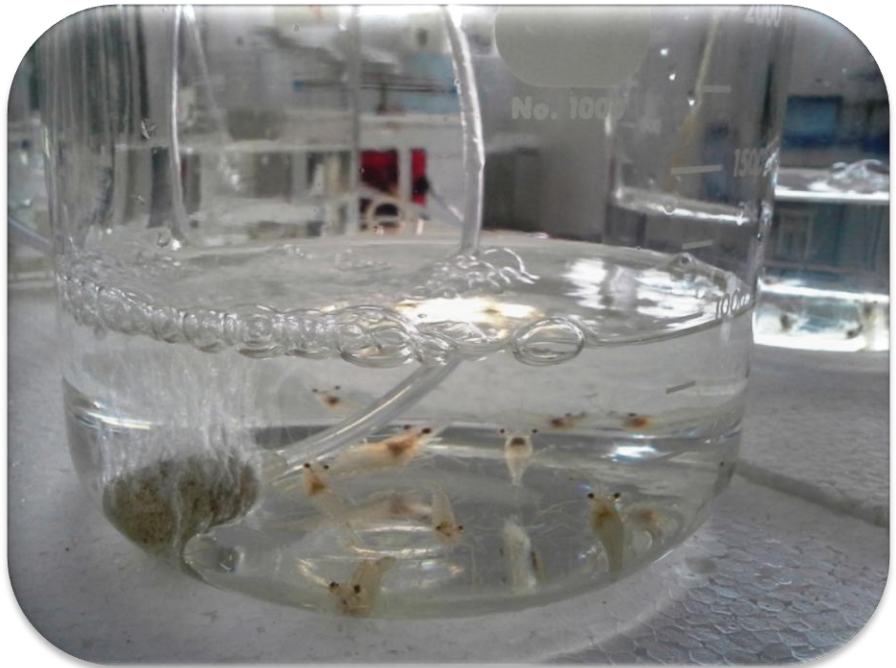


Figura 5: Vista aproximada do aquário pertencente ao teste de exposição aguda.

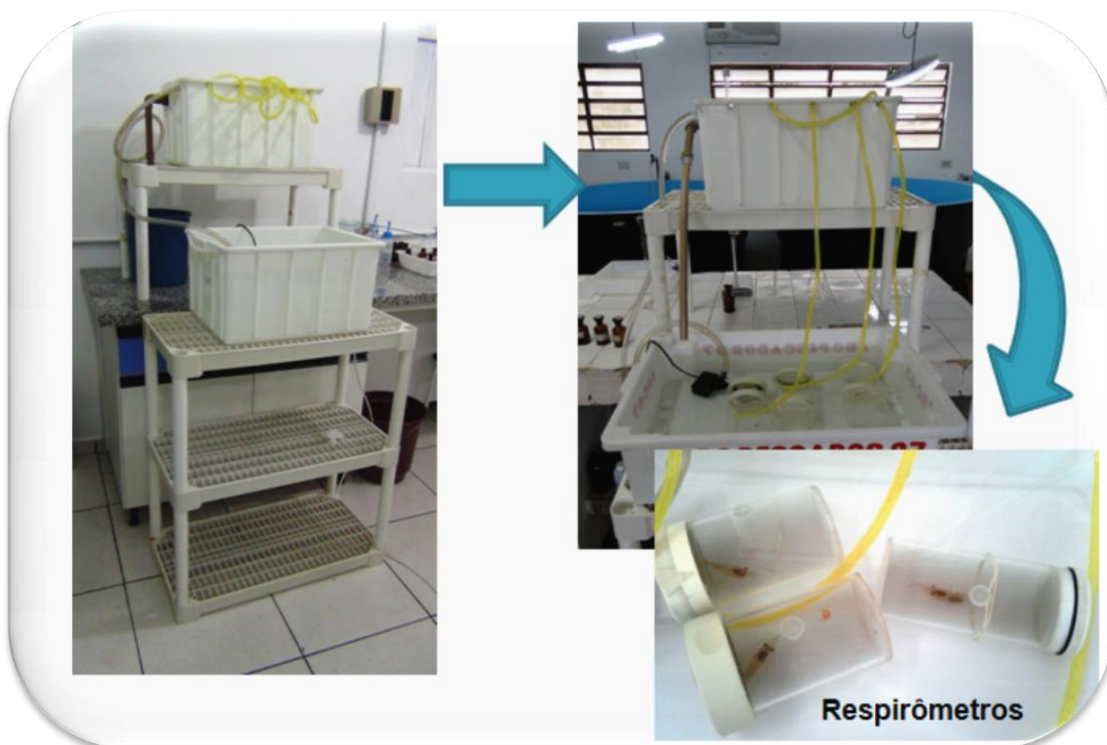


Figura 6: Sistema para exposição dos camarões nos testes de respirometria e excreção (ênfase aos animais confinados nos respirômetros cilíndricos).