

**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**

**EFEITO SINÉRGICO DO CARBOFURANO E NANOTUBOS DE CARBONO  
DE PAREDES MÚLTIPLAS EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*,  
Linnaeus, 1758)**

**Janaina Campos Garcia**

**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**  
**Setembro – 2013**

**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**

**EFEITO SINÉRGICO DO CARBOFURANO E NANOTUBOS DE CARBONO  
DE PAREDES MÚLTIPLAS EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*,  
Linnaeus, 1758)**

**Janaina Campos Garcia**

**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**  
**Setembro - 2013**

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

C198e Campos, Janaina  
Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) / Janaina Campos -- São Paulo, 2013.  
v, 104f. ; 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. Efeito sinérgico. 2. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas. 3. Carbofurano. 4. Nanotoxicologia. I. Barbieri, Edison. II Título.

CDD 639.3

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

“EFEITO SINÉRGICO DO CARBOFURANO E NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS EM TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758)”

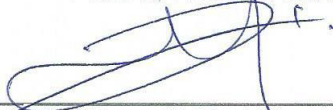
**AUTOR:** Janaína Campos Garcia

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. 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. Diego Stéfani Teodoro Martinez



Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Data da realização: 20 de setembro de 2013



Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dr. Edison Barbieri

## **Agradecimentos**

A todas as pessoas que participaram de alguma forma para a elaboração deste trabalho, seja pelo compartilhamento de conhecimentos, pela companhia e pelo apoio em todas as etapas vencidas.

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

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

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Usp por todo conhecimento compartilhado e por toda ajuda dispendida neste trabalho. Em especial agradeço o Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva por ter me recebido em seu laboratório, a Emília Ribeiro e a Karina Fernandes por terem compartilhado experiências e conhecimentos essenciais para a realização deste trabalho.

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

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

Aos queridos amigos pelo companheirismo em todas as horas, por todos risos, lágrimas e desabafos sem os quais não seria possível superar todos os desafios e dificuldades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao CNPq pela bolsa de produtividade do Dr. Edison Barbieri.

## Sumário

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	ii
Índice de Tabelas e Figuras.....	iv
Resumo geral.....	1
General abstract.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
Objetivos.....	5
Apresentação da Dissertação.....	6
Referências Bibliográficas.....	7

### **CAPÍTULO 1: Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas no consumo de oxigênio e na atividade natatória em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758).....**

Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Materiais e Métodos.....	15
Reagentes químicos.....	15
CL <sub>50</sub> .....	16
Consumo de oxigênio.....	17
Tempo de natação até o cansaço.....	17
Resultados.....	19
Mortalidade e CL <sub>50</sub> .....	19
Consumo de oxigênio.....	20
Tempo de natação até o cansaço.....	22
Discussão.....	25
Conclusões.....	28
Referências bibliográficas.....	30

### **CAPÍTULO 2: Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas nos tecidos branquiais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758).....**

Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Materiais e Métodos.....	39
Reagentes químicos.....	39
Histologia.....	40
Resultados.....	44
Mensuração do comprimento e largura das lamelas secundárias das brânquias.....	44
Análise morfométrica das células de mucosa e células de cloreto.....	46
Análise das alterações histológicas.....	49
Discussão.....	54
Conclusões.....	57
Referências bibliográficas.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
APÊNDICE.....	64
ANEXO 1 – Propriedades físico-químicas dos HNO <sub>3</sub> -NTCPM.....	64
ANEXO 2 – Análises estatísticas do capítulo 1.....	64
ANEXO 3 – Protocolo de inclusão de tecido branquial em parafina.....	76
ANEXO 4 – Protocolos de coloração de lâminas.....	76
ANEXO 5 – Protocolo de fixador de brânquias.....	78
ANEXO 6 – Análises estatísticas do capítulo 2.....	78

## Índice de Tabelas e Figuras

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de mortalidade (%) de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta a crescentes concentrações de carbofurano (mg/L) por 96 h e a dose letal média (CL <sub>50</sub> com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber.....	19
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de mortalidade (%) de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta a várias concentrações de HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L) por até 96 h e sua dose letal média (CL <sub>50</sub> com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber.....	19
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de mortalidade (%) de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta a várias concentrações de carbofurano acrescido de 1,0 mg/L de HNO <sub>3</sub> .NTCPM por até 96 h e sua dose letal média (CL <sub>50</sub> com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber.....	20
<b>Tabela 4.</b> Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	40
<b>Tabela 5.</b> Relação entre os valores de I e os efeitos nos órgãos.....	42
<b>Tabela 6.</b> Critérios para pontuação das lesões em função da ocorrência das alterações nas brânquias. Modificado de Schwaiger <i>et al.</i> (1997).....	42
<b>Tabela 7.</b> Comprimentos e larguras médias (µm) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L), além do controle.....	43
<b>Tabela 8.</b> Comprimentos e larguras médias (µm) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L), além do controle.....	43
<b>Tabela 9.</b> Comprimentos e larguras médias (µm) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L) e 1,0 mg/L de nanotubos de carbono, além do controle.....	44
<b>Tabela 10.</b> Comprimentos e larguras médias (µm) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L) e concentrações de carbofurano (mg/L) com 1,0 mg/L de nanotubos de carbono, além do controle.....	44
<b>Tabela 11.</b> Densidade e área média das células de cloreto (µm <sup>2</sup> ) e células de mucosa (µm <sup>2</sup> ) das lamelas primárias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L), além do controle.....	45
<b>Tabela 12.</b> Densidade e média da área das células de cloreto (µm <sup>2</sup> ) e células de mucosa (µm <sup>2</sup> ) das lamelas primárias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L), além do controle.....	46
<b>Tabela 13.</b> Densidade e média da área das células de cloreto (µm <sup>2</sup> ) e células de mucosa (µm <sup>2</sup> ) das lamelas primárias de indivíduos expostos a diferentes	



concentrações de carbofurano (mg/L) e 1,0 mg/L de nanotubos de carbono, além do controle.....	47
<b>Tabela 14.</b> Intensidade das alterações segundo o Índice de Alteração Histológica (IAH) e o Valor Médio de Alterações (VMA) para todas as amostragens realizadas.....	48
<b>Tabela 15.</b> Valores médios de alterações histológicas (VMA) observadas e classificação para as lesões em indivíduos provenientes de todas as amostragens de acordo com Schwaiger <i>et al.</i> (1997).....	49
<b>Figura 1.</b> Consumo específico de oxigênio (mLO <sub>2</sub> /g/h) conforme variação na concentração de Carbofurano (mg/L).....	21
<b>Figura 2.</b> Consumo específico de oxigênio (mLO <sub>2</sub> /g/h) conforme variação na concentração de HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L).....	21
<b>Figura 3.</b> Consumo específico de oxigênio (mLO <sub>2</sub> /g/h) conforme variação na concentração de carbofurano + 1 mg de HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L).....	22
<b>Figura 4.</b> Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de carbofurano (mg/L) em câmara de natação.....	23
<b>Figura 5.</b> Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L) em câmara de natação.....	23
<b>Figura 6.</b> Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de carbofurano e HNO <sub>3</sub> .NTCPM (mg/L) em câmara de natação.....	24
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia do corte histológico em parafina das lamelas secundárias do segundo arco branquial de <i>O. niloticus</i> .....	54

## RESUMO GERAL

A contaminação dos ambientes aquáticos é uma das consequências da pressão das atividades antrópicas sobre os recursos naturais e está comumente relacionada à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas. Peixes são sensíveis a essas mudanças no ambiente e efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em nível celular e tecidual, dentre eles, a tilápia são comercialmente importantes devido a seu potencial para aquicultura, que inclui alta taxa de crescimento, e aceitação pelo consumidor, entre outros fatores. Uma das classes de inseticidas mais comumente utilizados no Brasil são os carbamatos, e entre eles, o carbofurano merece destaque, sendo altamente tóxico para peixes, pássaros e humanos. No ambiente natural a toxicidade ocorre através da mistura de diversos contaminantes que podem interagir sob diversas formas, inclusive com o aumento de toxicidade através de interações sinérgicas. Além de agrotóxicos, nanopartículas manufaturadas estão entre as substâncias as quais os organismos aquáticos estão expostos. A grande área de superfície dos nanotubos de carbono podem levar outras moléculas se aderirem e potencialmente transportar poluentes pelo meio ambiente, além de serem biologicamente ativas por apresentarem maior área de superfície por unidade quando comparadas com partículas maiores. Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos toxicológicos dos nanotubos de carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como marcador biológico o consumo de oxigênio, o tempo de natação até o cansaço e alterações histológicas em tecidos branquiais sobre o modelo biológico selecionado, a tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Palavras chave: Efeito sinérgico; Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; Carbofurano; Nanotoxicologia.

## GENERAL ABSTRACT

The aquatic environment contamination it's one of the consequences of anthropic activities on natural resources and it's generally related to domestic effluent, industrial and agricultural discharge. Fishes are sensitive to that environmental variation and pollutant toxic effects can be evident at cellular and tissue level. Among fishes, tilapias are commercially important due to their aquaculture potential, which includes high growth rate, consumer acceptance, among other factors. One of the more commonly used classes of insecticides on Brazil is the carbamates, among them, carbofuran noteworthy, being highly toxic to fishes, birds and humans. On natural environment the toxicity occur through contaminants mixture which may behave various forms, including toxicity increase through synergic interactions. Besides pesticides, manufactured nanoparticles are among the substances which aquatic organisms are exposed to. The carbon nanotubes large surface area may cause other molecules adhering and potentially carry pollutants through environment, besides being biologically active by presenting larger surface area per unity when compared to larger particles. Thus, the study aimed to evaluate carbon nanotubes, carbofuran and carbon nanotubes with carbofuran effects using as biomarker the oxygen consumption, the swimming time to exhaustion and histological alterations in gill tissues on selected biological model, Nile tilapia (*O. niloticus*).

Key words: Synergic effect; Multi walled carbon nanotubes; Carbofuran; Nanotoxicology.

## INTRODUÇÃO GERAL

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

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

Segundo Farias (2006), a demanda e a oferta dos recursos hídricos é cada vez mais comprometida na medida em que, em muitos lugares do mundo, as águas superficiais e as subterrâneas estão contaminadas com esgotos industriais, agrícolas e municipais. De acordo com a Comissão Mundial da água para o século XXI, mais de 50% dos principais rios do mundo estão contaminados, pondo em risco a saúde humana e dos ecossistemas (IPS, 1999).

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

Na aquicultura mundial uma das espécies mais utilizadas para o cultivo comercial são as tilápias. Naturais da África, Israel e Jordânia, tiveram sua distribuição expandida nos últimos cinquenta anos (Boscolo *et al.*, 2002) devido ao seu potencial para aquicultura, que inclui alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições de cultivo e a alta aceitação pelo consumidor (Bromage e Roberts, 1995).

O grande emprego de pesticidas orgânicos na agricultura desde 1940 promoveu, além de colheitas com qualidade, um aumento na produtividade possibilitando o atendimento da demanda alimentícia na maioria dos países (Brasco, 1988). No entanto, Bull e Hathaway (1986) relatam que, na medida em

que são aplicados em excesso, ou de maneira errônea, os agrotóxicos acentuam demasiadamente os problemas do meio ambiente.

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

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

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

Usualmente considera-se a toxicidade dos compostos químicos sobre organismos não-alvo de maneira individualizada, desconsiderando que no ambiente natural a toxicidade ocorre através da mistura de diversos contaminantes que podem interagir sob diversas formas, inclusive com o aumento de toxicidade através de interações sinérgicas (Prestes *et al.*, 2013).

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

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

combinados a outros materiais, como polímeros e fibras, servem como elementos de reforço formando compósitos com excelentes propriedades mecânicas (Dai, 2002).

No entanto, estudos epidemiológicos de poluição no ar sugerem que a matéria particulada tem uma forte associação com doenças cardio-pulmonares (Pope *et al.*, 2004). Pesquisas tem mostrado que nanopartículas podem entrar no corpo humano com maior facilidade e serem mais biologicamente ativas por apresentarem maior área de superfície por unidade quando comparadas a partículas maiores (Oberdorster *et al.*, 2005). Além disso, a grande área de superfície dos nanotubos de carbono podem levar outras moléculas se aderirem e potencialmente transportar poluentes pelo meio ambiente (Kleiner e Hogan, 2003).

Os testes de toxicidade possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas, além de avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (Bertoletti, 1990).

Devido à grande importância de se determinar a toxicidade do carbofurano e de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, bem como a toxicidade resultante da interação existente entre eles, utilizando como modelo biológico a tilápia do Nilo, elaboraram-se dois artigos, no qual o primeiro intitula-se “Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas no consumo de oxigênio e na atividade natatória em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758)” e o segundo, “Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas nos tecidos branquiais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758)”.

## **Objetivos**

Avaliar os efeitos dos nanotubos de carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como marcador biológico o consumo de oxigênio, o tempo de natação até o cansaço e alterações histológicas em tecidos branquiais sobre o modelo biológico selecionado, a tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

## **Apresentação da Dissertação**

Os resultados da presente dissertação são apresentados sob a forma de dois artigos científicos. Utilizou-se como marcador biológico o consumo de oxigênio, o tempo de natação até o cansaço e alterações nos tecidos branquiais no modelo biológico selecionado, a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) para avaliação dos efeitos do carbofurano, de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e dos dois reagentes em conjunto. Devido à importância da pesquisa dos efeitos que ocorrem no meio ambiente, onde misturas de poluentes se encontram e interagem.

**Capítulo 1:** Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas no consumo de oxigênio e na atividade natatória em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758).

O objetivo deste trabalho foi averiguar os efeitos dos nanotubos de carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como marcador biológico o consumo de oxigênio, o tempo de natação até o cansaço sobre *O. niloticus*. Este artigo seguiu as normas da revista “Water Research”.

**Capítulo 2:** Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas nos tecidos branquiais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758).

O objetivo deste trabalho foi averiguar os efeitos dos nanotubos de carbono, do carbofurano e de nanotubos de carbono e carbofurano utilizando-se como marcador biológico alterações histológicas em tecidos branquiais de *O. niloticus*. Este artigo seguiu as normas da revista “Water Research”.

## Referências bibliográficas

- ALVES, G.G., 2001. Agrotóxicos no Vale do Ribeira Coordenadoria de defesa agropecuária (CDA) – Escritório de defesa agropecuária de Registro.
- ARIAS, A.R.L., BUSS, D.F., ALBURQUERQUE, C., INÁCIO, A.F., FREIRE, M.M., EGLER, M., MUGNAL, R., BAPTISTA, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 12 (1): 61 – 72.
- BARBIERI, E., FERREIRA, L.A.A., 2011. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 on the freshwater fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pest. And physiology* 99:209-214.
- BERTOLETTI, E., 1990. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. São Paulo: Cetesb.
- BOSCOLO, W.R., HAYASHI, C., MEURER, F., 2002. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) *R. Brasileira de Zootecnia* 31 (2): 539 – 545.
- BRASCO, S.M., 1988. O Meio Ambiente em Debate. Ed. Moderna: São Paulo.
- BROMAGE, N.R. e ROBERTS, R.B., 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Oxford: *Blackwell Science*.
- BULL, D. e HATHAWAY, D., 1986. Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. Vozes, Petrópolis, 236.
- DAI, H.J., 2002. *Surf. Sci.*, 500: 218.
- DRESSELHAUS, M.S., DRESSELHAUS, G., AVOURIS, P., 2001. Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications Topics in Applied Physics. Springer-Verlag: Nova Iorque, vol.80.
- FARIAS, M.S.S., 2006. Monitoramento da qualidade da água na bacia hidrográfica do Rio Cabelo. Tese Doutorado – Universidade Federal de Campina Grande.
- FMC, 1977. Carbofuran data summary. Philadelphia: FMC Corporation: 97.
- GOULART, M. e CALLISTO, M., 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Revista da FAPAM, ano 2, n° 1.
- KLEINER, K., HOGAN, J., 2003. How safe is nanotech? *New Scientist* 177: 14 – 115.
- MARTINEZ, C.B.R., CÓLUS, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MOACYR, E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O.A., PIMENTA, J.A., A bacia do Rio Tibagi. Londrina: MC Gráfica: 551 – 577.



MOREIRA, M.R.S., MUCCI, J.L.N., ABAKERLI, R.B., 2004. Monitoramento dos resíduos de carbofurano em área de produção de arroz irrigado – Taubaté, São Paulo. *Arquivo Instituto Biológico* 71(2): 221 – 226.

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

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

PRESTES, E.B., CLEMENTE, Z., CASTRO, V.L.S.S., JONSSON, C.M., 2013. Avaliação da Toxicidade Aguda de Piraclostrobin, Epoxiconazol e sua Mistura em *Colossoma macropomum* (Tambaqui). *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8 (1): 125 – 128.

POPE, C.A., BURNETT, R.T., THURSTON, G.D., THUN, M.J., CALLE, E.E., KREWSKI, D., GODLESKI, J.J., 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109 (1): 71 – 77.

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

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

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

World Health Organization, 1996. Guidelines for drinking-water quality. 2ed. Geneva 2. Health criteria and other supporting information: 940 – 946.

## **CAPÍTULO 1**

Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas no consumo de oxigênio e na atividade natatória em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758).

# EFEITO SINÉRGICO DO CARBOFURANO E NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E NA ATIVIDADE NATATÓRIA EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758)

J. Campos-Garcia<sup>a</sup>, E. Barbieri<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação do Instituto de Pesca-SP. E-mail: jana.campos@yahoo.com.br

<sup>b</sup> Instituto de Pesca – APTA-SAA/SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, 11990-000, Brasil. (013) 97486496. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

## RESUMO

O estudo da toxicidade do carbofurano e de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM), bem como a interação entre esses dois compostos sobre tilápia apresenta grande relevância, devido ao crescente uso deste agrotóxico e de nanotubos. Como primeiro estudo a avaliar esta interação, o objetivo deste trabalho foi encontrar informações sobre a toxicidade do carbofurano, de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e da modulação de nanotubos de carbono e o carbofurano sobre a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) tendo por base o consumo de oxigênio e a atividade natatória. Os valores de CL50 para peixes expostos ao carbofurano (mg/L) nos períodos de 24, 48, 72 e 96h foram respectivamente 4,00; 3,25; 3,03 e 2,46. Nas concentrações de NTCPM amostradas o teste utilizado não foi sensível à toxicidade. E, para peixes expostos ao carbofurano e NTCPM foram 3,70; 1,68; 0,71 e 0,50 respectivamente. Para medição do consumo de oxigênio foram utilizadas três réplicas das concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2mg/L de carbofurano, de NTC nas concentrações 0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L e 0,5, 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L de carbofurano com 1 mg/L de nanotubos de carbono. Verificou-se o tempo de natação até o cansaço em três réplicas das seguintes concentrações de carbofurano: 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0mg/L; NTC: 0,5; 1,0 e 2,0mg/L e carbofurano com 1,0mg/L de NTC: 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg/L, além dos controles. Os resultados revelaram elevação do consumo específico de oxigênio até a concentração 1,5 mg/L de carbofurano e redução no consumo em exposição a carbofurano e NTC, além de contínua diminuição do tempo de natação até o cansaço em todos os tratamentos. Tais fatos permitem inferir que ocorreu um desvio no padrão metabólico dos organismos expostos ao carbofurano e NTC, no sentido de desintoxicação e estabilização de padrões metabólicos.

Carbofurano combinado a nanotubos de carbono apresentaram efeito tóxico maximizado em todos os testes realizados, em relação às substâncias separadas, indicando sinergia entre os dois compostos.

#### Destaques da pesquisa

- ▶ Encontrou-se efeito sinérgico na combinação carbofurano e HNO<sub>3</sub>-NTCPM. ▶ O consumo específico de oxigênio e o tempo de natação até o cansaço foram ferramentas sensíveis na mensuração de efeito agudo de agentes tóxicos. ▶ Observou-se uma tendência dose dependente na diminuição no consumo específico de oxigênio de *O. niloticus* exposta a HNO<sub>3</sub>-NTCPM.

Palavras-chave: Sinergia; nanotubos de carbono de paredes múltiplas; *O. niloticus*; ecotoxicologia aquática.

#### **ABSTRACT**

The study of toxicity of carbofuran and multi walled carbon nanotubes (MWCNT), as well the interaction between this two composts on tilapia presents great relevance, due to the crescent use of this pesticide and carbon nanotubes and evaluation of environmental impacts. As the first study of those interaction, the objective was to provide information about carbofuran and carbon nanoparticles toxicity on Nile tilapia (*O. niloticus*) based on oxygen consumption and swimming activity. The 96h LC<sub>50</sub> value of carbofuran was 2.46 and the LC<sub>50</sub> value of carbofuran with 1.0mg/L of CNT was 0.50. To measure oxygen consumption on routine metabolism three replicates of carbofuran concentrations: 0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg/L and carbofuran concentrations: 0; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg/L with 1.0 mg/L of CNT were used. Respirometric chambers were used for 60 minutes and the dissolved oxygen was determined through the Winkler Method. On active metabolism the time of swimming until exhaustion on three replicates of concentrations 0; 0.1; 0.25; 0.5; and 1.0 mg/L of carbofuran, 0; 0.5; 1.0; and 2.0 of CNT and 0; 0.5; 1.0; 1.5; and 2.0 of carbofuran with 1.0 mg/L of CNT were verified. The results revealed increase of oxygen consumption until 1.5 mg/L concentration of carbofuran and decrease on consumption when exposed to carbofuran and CNT. On active metabolism continuous decrease of swimming time until exhaustion on all treatments. Such results allow inferring that a deviation on metabolic pattern of the exposed organisms to carbofuran and CNT had occurred, towards detoxification and stabilization of metabolic patterns. Carbofuran combined with carbon

nanotubes presented maximized toxic effect on all tests when compared with the separate substances, indicating synergy between the two compounds.

## Research highlights

► A synergistic effect was found in the combination of carbofuran and HNO<sub>3</sub>-MWCNT. ► The oxygen specific consumption and of swimming time until exhaustion were sensitive tools to measure the acute effect of toxics. ► A dose dependent tendency decrease in oxygen specific consumption of *O. niloticus* exposed to HNO<sub>3</sub>-MWCNT was observed.

Keywords: Synergy; multi walled carbon nanotubes; *O. niloticus*; Aquatic ecotoxicology.

## 1. INTRODUÇÃO

O grupo de peixes que mais tem se destacado para a ampliação dos mercados interno e externo de produtos aquícolas é a tilápia (Embrapa, 2007). Fatores como fácil reprodução, carne branca de excelente qualidade, ótimo valor de mercado, baixo custo de produção, adaptação a diferentes salinidades e temperaturas fazem dessa espécie uma opção rentável para aquicultores.

Entretanto, as populações de peixes são suscetíveis aos impactos ambientais causados por resíduos industriais, vazamentos de óleo, pesticidas, herbicidas, e outros agentes que afetam diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies. Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados nos últimos anos para determinar a toxicidade aguda de diversos compostos químicos para espécies de organismos aquáticos (Barbieri *et al.* 2005). É frequente que áreas de cultivo de peixes e outros organismos aquáticos estejam sujeitos a receberem água contaminada por pesticidas por estarem próximos a campos de cultivo de vegetais tratados com essas substâncias (Hernández-Moreno *et al.* 2011; Barbieri *et al.* 2013).

Considerando que a tilápia é um recurso pesqueiro de alto valor econômico e crescente mercado, a avaliação da sensibilidade desta espécie à contaminação ambiental fornece subsídios importantes para a manutenção dos estoques populacionais.

Segundo Carvalho *et al.* (1998), pesticidas são produtos químicos intencionalmente introduzidos ao meio ambiente com o propósito de maximizar a produção agrícola protegendo-a de agentes que a comprometam, tais como roedores, fungos, ervas daninhas, entre outros, além de apresentarem ação preventiva contra as pragas (Oga, S., 1996).

Os inseticidas carbamatos são derivados de ésteres do ácido carbâmico, tendo a estrutura fundamental do ácido N-metilcarbâmico (Oga, 1996). Um dos principais representantes do grupo é o carbofurano.

O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) é um inseticida-nematicida com amplo espectro de ação e foi identificado como substituto químico registrado para usos problemáticos de clordane, heptachlor e aldrin, segundo EPA (Environmental Protection Agency, 1976). É considerado muito tóxico para peixes, com CL50 de 96h geralmente abaixo de 1,0 mg/L (Trotter *et al.*, 1991). Por apresentar efeitos nocivos para pássaros, peixes, mamíferos, insetos e invertebrados aquáticos, o carbofurano foi banido nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006), entretanto no Brasil ainda é comercializado nas formas líquida e granulada, com respectivo consumo anual de 4.000 L e 60.000 Kg no estado de São Paulo (Alves, 2001).

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

Além de agrotóxicos, nanopartículas manufaturadas estão entre as substâncias as quais os organismos aquáticos estão expostos (Paschoalino, 2010). Nanomateriais são materiais e produtos na escala que varia entre 1 e 100 nm (Masciangioli e Zhang, 2003; Roco, 2003; Moore, 2006; Smith, 2007) e tem beneficiado diversos segmentos, tais como alimentício, eletrônico,

farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar, entre outros (Handy, 2008; Paschoalino, 2010) e as propriedades das superfícies dos nanomateriais são de particular interesse no desenvolvimento de novos produtos com diferentes propriedades (Handy *et al.*, 2011).

Para a engenharia de aquicultura, nanomateriais permitem a confecção de materiais mais leves e fortes para a construção de gaiolas para peixes e novos filtros para a limpeza da água em empreendimentos aquícolas, segundo Handy *et al.* (2011).

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

Alguns estudos sugerem que os nanomateriais, por sua pequena dimensão podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, podendo ter seu efeito tóxico magnificado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido à sua grande área superficial por unidade quando comparada a partículas maiores (Oberdorster *et al.*, 2005; Paschoalino *et al.*, 2010).

A grande área superficial dos nanotubos de carbono pode proporcionar a adesão de outras moléculas e potencialmente captar poluentes e transportá-los pelo meio ambiente (Kleiner *et al.*, 2003).

Essas características únicas dos nanomateriais tem levantado questões sobre a ecotoxicidade dos nanomateriais manufaturados à vida selvagem, incluindo peixes e invertebrados (Handy *et al.*, 2011).

Segundo Soares (1990), as águas residuárias contêm misturas complexas de substâncias químicas cuja toxicidade não pode ser atribuída a um ou vários componentes isolados, de forma que, devido aos efeitos antagonísticos e sinérgicos, a toxicidade pode ser maior, menor, ou ainda igualar a soma da toxicidade de seus constituintes.

O consumo de oxigênio (Rand e Petrocelli, 1984) e o tempo de natação até o cansaço (Kaufmann, 1990) são ferramentas úteis na medição de efeitos subletais, uma vez que, processos energéticos são indicadores especiais de estado fisiológico (Barbieri 2007a; Barbieri 2007b). Desse modo, em animais aeróbios, a quantificação da taxa de consumo de oxigênio e tempo de natação até o cansaço estará diretamente associada à quantidade de energia liberada a partir da oxidação do substrato alimentar sendo degradado (Barbieri, 2009).

Por meio da quantidade de oxigênio consumido por um animal, em um determinado período, pode-se estimar a energia dispendida durante o mesmo período para a manutenção de seus processos vitais (Carvalho, 1992).

Pouco se compreende sobre a interação entre as substâncias liberadas pelo homem no ambiente aquático e o seu efeito nos organismos relacionados a esse ambiente. Visando ampliar esse conhecimento, o presente estudo foi o primeiro realizado com a finalidade de fornecer informações dos efeitos do carbofurano, dos nanotubos de carbono e da modulação entre os dois componentes utilizando como sistema biológico a tilápia do Nilo (*O. niloticus*), avaliando-se como resposta o consumo de oxigênio e o tempo de natação até o cansaço. A hipótese deste trabalho foi que o carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas interagiriam sinergicamente sobre o modelo biológico utilizado provocando diminuição no tempo de natação até o cansaço e alterações no consumo de oxigênio em relação ao grupo controle.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *2.1. Reagentes químicos*

Como padrão analítico foi utilizado carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) (99,5%, Sigma).

Utilizou-se nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) [*Ctube 100*, CNT Co. Ltd., Incheon – South Korea] oxidados com ácido nítrico com intento de gerar grupos oxigenados na superfície dos nanotubos e



melhorar sua dispersão em água, como descrito em Martinez *et al.* (2013). A amostra então foi seca em sistema a vácuo por 24 h. Para a preparação da solução estoque, 100 mg de HNO<sub>3</sub>-NTCPM foram dispersos em 200 mL de água deionizada e sonificado por 60 minutos em banho ultrassônico (Coleparmer 8891).

Os HNO<sub>3</sub>-NTCPM utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química – Unicamp.

## 2.2. CL<sub>50</sub>

Os experimentos foram realizados nas instalações do Instituto de Pesca na base de Cananéia, litoral sul de São Paulo, onde a toxicidade aguda do carbofurano, HNO<sub>3</sub>-NTCPM e carbofurano com HNO<sub>3</sub>-NTCPM foram avaliadas para juvenis de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações dessas substâncias por um período de até 96 horas. Um total de 180 indivíduos com massa úmida média 0,57 g ( $\pm$  0,60 g) e comprimento total médio 2,36 cm ( $\pm$  0,30 cm) foram utilizados. Grupos de 10 peixes foram dispostos em 18 aquários com capacidade para 20L preenchidos com 10L de água.

Os grupos foram expostos às seguintes concentrações de carbofurano: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L, HNO<sub>3</sub>-NTCPM nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0, e carbofurano nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L acrescidos de 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>-NTCPM, além dos respectivos controles.

Primeiramente adicionou-se as concentrações citadas de carbofurano nos aquários, em seguida, as concentrações de nanotubos de carbono.

Peixes mortos foram prontamente retirados dos aquários e contados em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição para os cálculos das respectivas concentrações letais. O pH e a temperatura da água de todos os aquários foram medidos a cada 24 h e se mantiveram dentro da faixa de conforto para os indivíduos, respectivamente 7,25 ( $\pm$  0,11) e 19,9 °C ( $\pm$  0,3).

### *2.3. Consumo de oxigênio*

Um total de 48 peixes com massa média 0,57 g ( $\pm$  0,65 g) e comprimento total médio 2,36 cm ( $\pm$  0,31 cm) foram empregados para a avaliação do metabolismo de rotina. Os indivíduos foram aclimatados em respirômetros cilíndricos de acrílico pelo período de 1 hora com circulação contínua de água para atenuar o estresse causado pelo manuseio. Posteriormente o fluxo de água foi interrompido e os respirômetros fechados para a avaliação do consumo de oxigênio em um volume conhecido de água.

Os respirômetros foram protegidos por anteparo para isolar os animais de possíveis movimentações no laboratório. A diferença entre as concentrações de oxigênio determinadas no início e ao final do confinamento foram utilizadas para o cálculo do consumo específico de oxigênio (ml/g/h) durante o período, considerando o volume do respirômetro e o peso úmido do animal. Para minimizar os efeitos da baixa concentração de oxigênio e acúmulo de metabólitos no metabolismo, a duração dos experimentos foi regulada de forma que a concentração de oxigênio ao final fosse maior que 70% da sua concentração inicial. O oxigênio dissolvido foi determinado segundo o método de Winkler (Winkler, 1888).

Para obtenção da concentração desejada de carbofurano e de HNO<sub>3</sub>.NTCPM, o volume necessário da substância principal: 1,0 mg/carbofurano/mL e 1,0 mg/ HNO<sub>3</sub>.NTCPM /mL respectivamente foi calculado para cada volume dos respirômetros e adicionado a eles com auxílio de micropipeta ao final da aclimação. Em seguida isolou-se o sistema pelo período de 1 hora.

Foram realizados dois controles com 3 indivíduos cada, utilizando respirômetros individuais. Tréplicas das doses de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L de carbofurano, das doses de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM e das doses 0,5; 1; 1,5 e 2,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM foram avaliadas.

### *2.4. Tempo de natação até o cansaço*

A fim de quantificar o efeito da exposição aguda ao carbofurano na atividade natatória dos peixes, um túnel hidrodinâmico foi construído e utilizado

no laboratório, baseado nas descrições de Brett (1964) e modificado para indivíduos de pequeno porte. O túnel natatório, de volume total 1,2L consistiu em uma câmara encaixada em uma caixa com água para auxiliar a estabilidade da temperatura. Individualmente, os peixes foram forçados a nadar contra uma corrente produzida por um propulsor ligado em um motor elétrico. Cada peixe pôde se ajustar e se orientar dentro da câmara a uma baixa velocidade do fluxo da água. A velocidade da corrente foi mensurada através de medidor de fluxo "Venturi". A velocidade do fluxo foi aumentada gradativamente até que o peixe pudesse manter sua posição.

Antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos no respirômetro ativo (túnel de natação) com circulação contínua de água pelo período mínimo de 1 hora para atenuar o estresse causado pelo manuseio. Em seguida, o suprimento de água foi suspenso e o respirômetro ativo fechado. O respirômetro foi protegido por anteparo para isolar os animais de possíveis movimentações no laboratório.

Após o período de 1 hora para a adaptação dos peixes, as concentrações definidas de carbofurano foram adicionadas ao respirômetro e a velocidade do fluxo de água foi aumentada gradativamente de  $1 \text{ cm.s}^{-1}$  até atingir  $15 \text{ cm.s}^{-1}$  ( $\pm 0,31$ ), então os peixes foram forçados a nadar a essa velocidade até a exaustão. Peixes foram considerados exaustos quando não conseguiam manter sua velocidade de natação em relação ao fluxo de água, sendo arrastados pela corrente à extremidade de saída do túnel de natação, permanecendo nessa posição por mais de 60 s.

Para obtenção da concentração desejada de carbofurano e de  $\text{HNO}_3$ -NTCPM, o volume necessário das substâncias foi calculado para cada respirômetro e adicionado a ele com auxílio de micropipeta ao final da aclimação dos peixes. Assim que as substâncias foram adicionadas, o orifício do respirômetro foi selado. Imediatamente após cada experimento, o comprimento total e massa úmida dos peixes foram mensurados. Nenhum indivíduo foi usado mais que uma vez.

Foram avaliadas réplicas das seguintes concentrações de carbofurano: 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/L, de  $\text{HNO}_3$ -NTCPM: 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L e 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de  $\text{HNO}_3$ -NTCPM, além de réplicas de controle para os três tratamentos.

Os dados foram avaliados em função das médias e desvios padrões obtidos por análises estatísticas do ANOVA, após a verificação das distribuições normais. Utilizou-se o programa estatístico Assistat 7.6 beta (2013). Diferenças foram consideradas significantes quando o  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Mortalidade e $CL_{50}$

A  $CL_{50}$  do carbofurano (Tabela 1) para 24h, 48h, 72h 96h foi respectivamente 4,00 mg/L, 3,25 mg/L, 3,03 mg/L e 2,46 mg/L.

Tabela 1 – Porcentagem de mortalidade (%) de *Oreochromis niloticus* exposta a crescentes concentrações de carbofurano (mg/L) por 96 h e a dose letal média ( $CL_{50}$  com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber.

Tempo de exposição (h)							$CL_{50}$ (mg carbofurano/L)
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	
24	0,0	0,0	20	10	20	100	<b>4,00 (3,02-5,30)</b>
48	0,0	0,0	20	20	40	100	<b>3,25 (2,34-4,51)</b>
72	0,0	0,0	20	20	50	100	<b>3,03 (2,18-4,22)</b>
96	0,0	0,0	20	40	80	100	<b>2,46 (1,73-3,50)</b>

O teste de  $CL_{50}$  não resultou toxicidade para nenhuma das concentrações de nanotubos de carbono amostradas nos quatro tempos de exposição (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem de mortalidade (%) de *Oreochromis niloticus* exposta a várias concentrações de  $HNO_3$ -NTCPM (mg/L) por até 96 h e sua dose letal média ( $CL_{50}$  com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber.

Tempo de exposição(h)							$CL_{50}$ ( $HNO_3$ -NTCPM /L)
	0	0.1	0,5	1.0	2.0	3.0	

<b>24</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3,33	<b>Sem toxicidade</b>
<b>48</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.33	<b>Sem toxicidade</b>
<b>72</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.33	<b>Sem toxicidade</b>
<b>96</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	3.33	3.33	<b>Sem toxicidade</b>

A tabela 3 apresenta os resultados da CL<sub>50</sub> para concentrações de carbofurano acrescidas de 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. Comparando-se com a tabela 1, com as mesmas concentrações de carbofurano, verifica-se diminuição nos valores de CL<sub>50</sub> em todos os tempos de exposição, de 2,46 para 0,50 em CL<sub>50</sub> 96h, uma redução de quase 5 vezes no CL<sub>50</sub> no maior tempo de exposição amostrado. O que evidência um efeito sinérgico entre o carbofurano e HNO<sub>3</sub>.NTCPM aumentando a toxicidade em mais de 5 vezes.

Tabela 3 – Porcentagem de mortalidade (%) de *Oreochromis niloticus* exposta a várias concentrações de carbofurano acrescido de 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM por até 96 h e sua dose letal média (CL<sub>50</sub> com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber.

<b>Tempo de exposição (h)</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>4,0</b>	<b>8,0</b>	<b>CL<sub>50</sub> (mg carbofurano/L)</b>
<b>24</b>	0,0	0,0	10	30	20	100	<b>3,70 (2,25-4,76)</b>
<b>48</b>	0,0	0,0	20	30	50	100	<b>1,68 (0,72-3,92)</b>
<b>72</b>	0,0	0,0	20	30	60	100	<b>0,71 (0,41-1,33)</b>
<b>96</b>	0,0	0,0	20	50	80	100	<b>0,50 (0,31-0,65)</b>

### 3.2. Consumo de oxigênio

O consumo específico de oxigênio em indivíduos expostos ao carbofurano aumentou de forma dose dependente até a concentração 1,5 mg/L, sendo este aumento correspondente a 9 vezes em relação ao controle (Figura 1). Da concentração 1,5 mg/L para 2,0 mg/L de carbofurano houve uma queda no consumo específico de oxigênio, sendo este nesta concentração 3 vezes maior em relação ao controle. A partir da concentração 1,5 mg/L de

carbofurano, houve aumento estatisticamente significativo no consumo específico de oxigênio em relação ao controle (ANOVA,  $P < 0.001$ ).

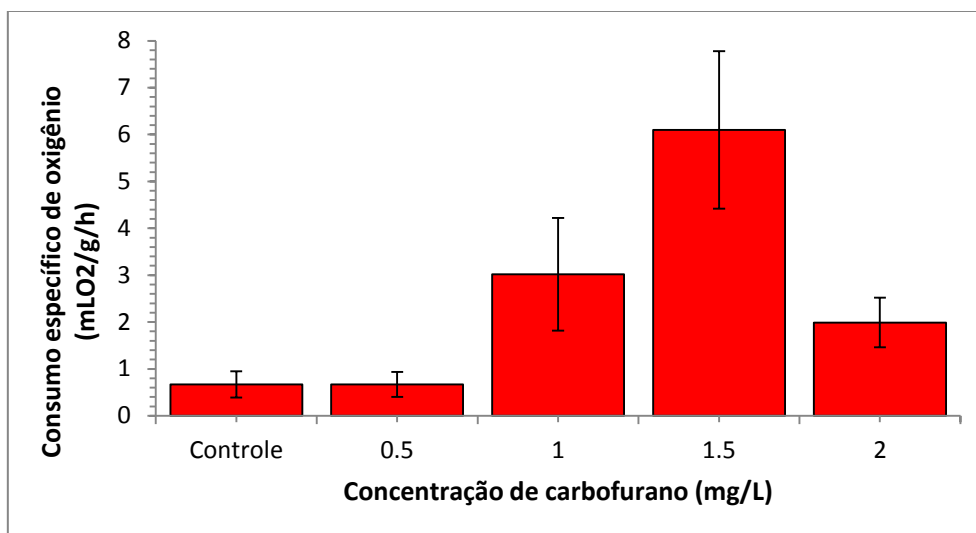


Figura 1 - Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/h) conforme variação na concentração de Carbofurano (mg/L).

O consumo específico de oxigênio variou pouco nos organismos expostos a concentrações de HNO<sub>3</sub>-NTCPM, não diferindo estatisticamente em relação ao controle (Figura 2).

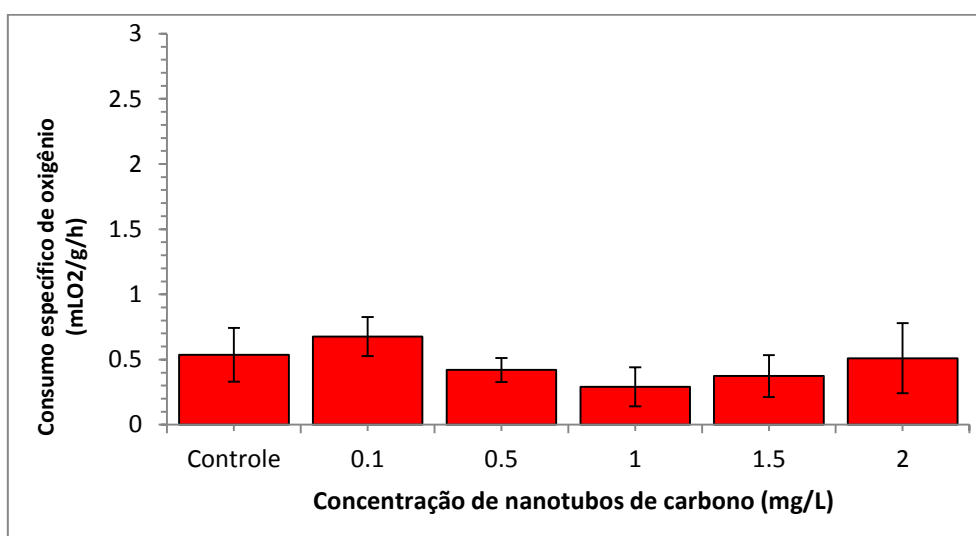


Figura 2 – Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/h) conforme variação na concentração de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L).

A figura 3 apresenta diminuição dose dependente no consumo específico de oxigênio em organismos expostos ao carbofurano e a HNO<sub>3</sub>.NTCPM. Em relação ao controle, a concentração 2,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg de HNO<sub>3</sub>.NTCPM diminuiu 9,5 vezes. A partir da concentração 1,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM, todas as concentrações apresentaram valores de consumo específico de oxigênio estatisticamente menores em relação ao controle (ANOVA,  $P < 0.001$ ).

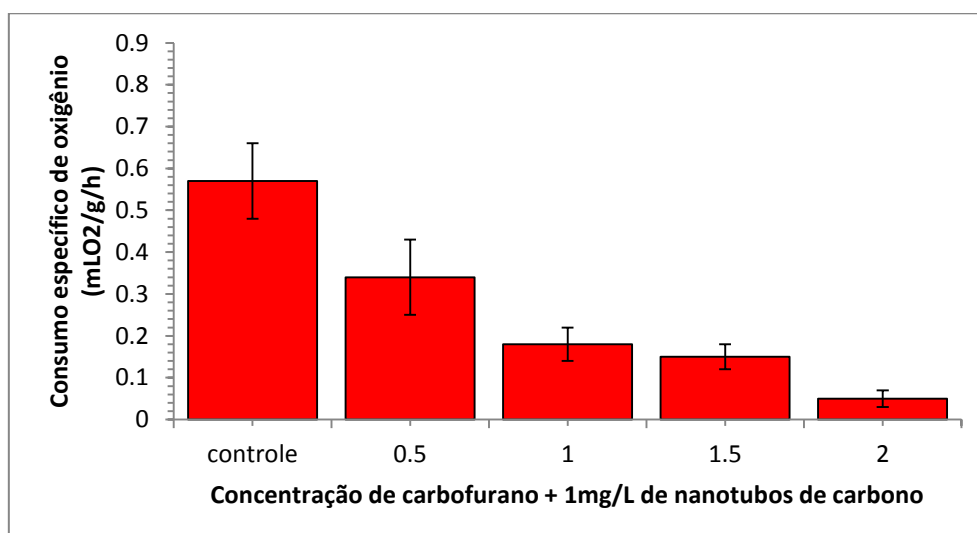


Figura 3 – Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/h) conforme variação na concentração de carbofurano + 1,0 mg de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L).

### 3.3. Tempo de natação até o cansaço

O tempo de natação até o cansaço diminuiu de forma dose dependente para os três tratamentos realizados, com indivíduos expostos a carbofurano (Figura 4), HNO<sub>3</sub>.NTCPM (Figura 5) e carbofurano com 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (Figura 6).

Com 56,8 minutos de natação até o cansaço no controle, na concentração 2,0 mg/L de carbofurano a média de tempo foi reduzida 91% até

5,05 minutos. A partir da dose de exposição 1,0 mg/L de carbofurano o tempo de natação foi reduzido com significância estatística em relação ao controle representado na figura 4 (ANOVA,  $P < 0.001$ ).

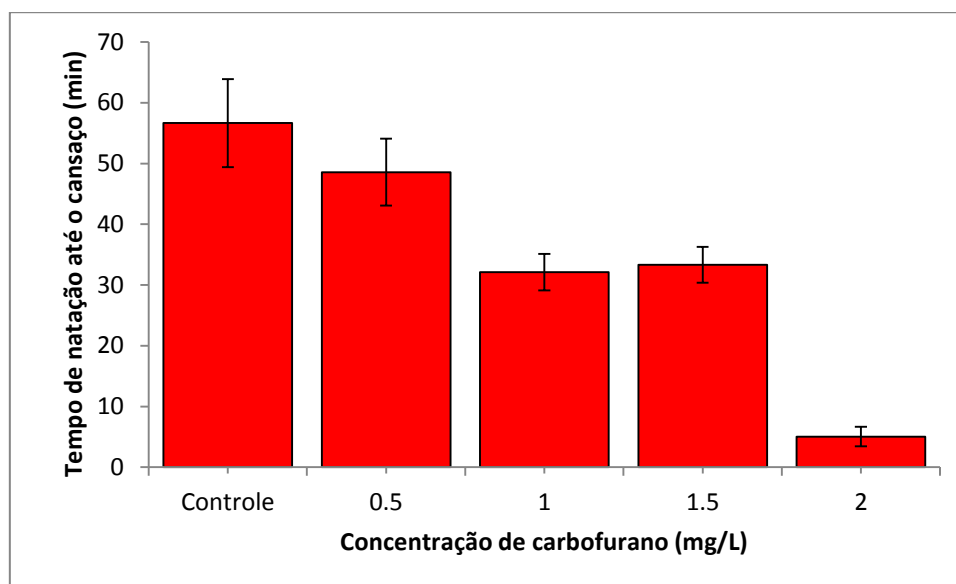


Figura 4 – Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de carbofurano (mg/L) em câmara de natação.

O tempo de natação até o cansaço foi reduzido de 56,8 minutos no controle para 29,2 minutos na concentração 2,0 mg/L de  $\text{HNO}_3\text{-NTCPM}$  (Figura 5). A partir da concentração 1 mg/L de  $\text{HNO}_3\text{-NTCPM}$ , o tempo de natação até o cansaço teve diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA,  $P < 0.001$ ).



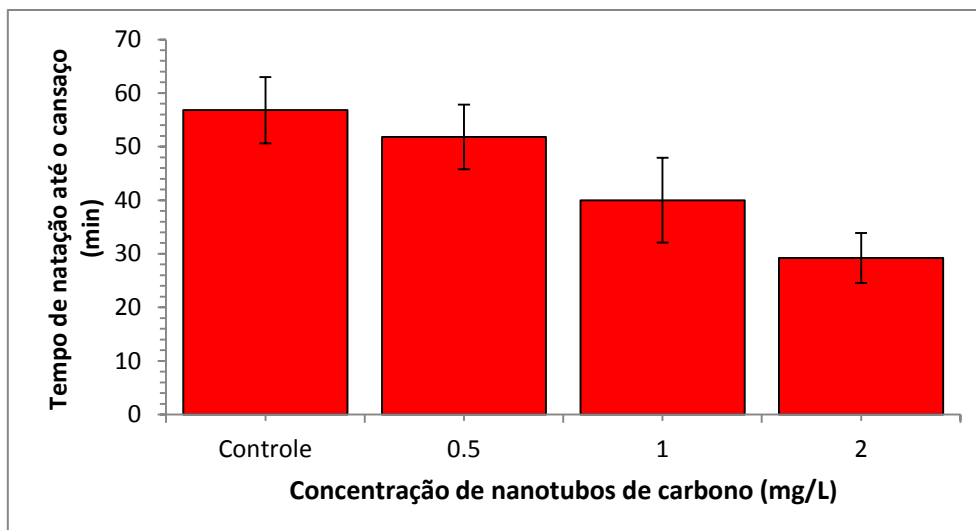


Figura 5 – Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L) em câmara de natação.

Em exposição à carbofurano e HNO<sub>3</sub>.NTCPM, o tempo de natação até o cansaço foi reduzido em 93,6%, de 56 minutos no controle para 3,6 minutos na concentração 2 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (Figura 6). Em relação ao controle, todos os tratamentos resultaram diminuição estatística significativa no tempo de natação até o cansaço (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

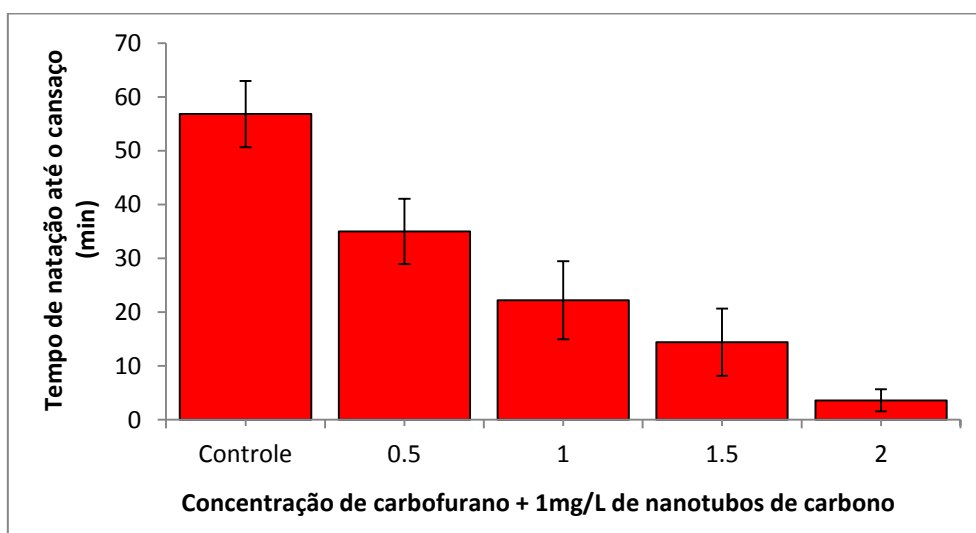


Figura 6 – Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de carbofurano e HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L) em câmara de natação.

Comparando-se as mesmas concentrações (0,5 mg/L e 1,0 mg/L) de carbofurano e carbofurano com HNO<sub>3</sub>.NTCPM, houve diferença estatística, sendo o tempo de natação estatisticamente menor nos tratamentos com HNO<sub>3</sub>.NTCPM em relação aos tratamentos com carbofurano apenas.

#### 4. DISCUSSÃO

A CL<sub>50</sub> 96h 2,46 mg/L para o carbofurano encontra-se acima do valor encontrado por Stephenson *et al.* (1984), Liong *et al.* (1988) e Soufy *et al.* (2007), de 0,48 mg/L, 0,46 mg/L e 0,4 mg/L respectivamente para juvenis de *O. niloticus* e do intervalo de valores de CL<sub>50</sub> 96h para peixes de água doce calculado pela USEPA (2004), de 0,088 a 1,99 mg/L. Pessoa *et al.* (2011) comparou os resultados de CL<sub>50</sub> para a forma pura do carbofurano e a formulada comercial e encontrou grande similaridade, 0,214 mg/L e 0,220 mg/L respectivamente para larvas de *O. niloticus*. O autor concluiu que o potencial tóxico do ingrediente ativo na formulação comercial não é afetada pelas substâncias inertes adicionadas.

Hernández-Moreno *et al.* (2011) discutem que há uma grande variabilidade nos resultados de CL<sub>50</sub> encontrados para diferentes espécies e mesmo na mesma espécie, portanto, comparações de resultados devem ser interpretados com cautela para evitar conclusões errôneas devido possivelmente ao teste aplicado, as condições do teste, estágio de vida dos organismos expostos, entre outros fatores.

Macek e Krzeminski (1975) reportaram que testes com peixe lua (*Lepomis macrochirus*) através de combinações químicas de organoclorados, organofosfatos, e carbamatos mostraram toxicidade maximizada em mais de 1/3 das interações entre estes pesticidas. Além disso, Martinez *et al.* (2013) também encontraram efeito sinérgico pesquisando HNO<sub>3</sub>.NTCPM interagindo com chumbo, o que resultou, entre outros dados, toxicidade superior na modulação Pb + HNO<sub>3</sub>.NTCPM em relação ao controle com Pb apenas e diminuição no consumo de oxigênio em mais de 20% em relação às duas substâncias separadamente.

Segundo Rand e Petrocelli (1984), peixes podem absorver pesticidas diretamente da água, sendo a principal via de absorção direta e passiva, através das brânquias e pele. Há contínua absorção do pesticida até que um nível de equilíbrio entre o organismo e o meio em que ele se encontra seja atingido, dessa forma, os indivíduos expostos às maiores concentrações de carbofurano tendem a serem os que mais absorvem passivamente o contaminante, o que pode explicar sua maior mortalidade.

A diminuição do consumo específico de oxigênio está intimamente associada à diminuição do metabolismo, visualmente observado durante os experimentos através da baixa mobilidade dos indivíduos expostos a concentrações maiores de carbofurano e HNO<sub>3</sub>-NTCPM em relação aos expostos a concentrações mais baixas dos reagentes.

Segundo Vargas *et al.* (1991), xenobióticos afetam os processos de respiração dos organismos induzindo-os a usar outras fontes de energia, que pode ser empregada para as reações de desintoxicação e estabilização de padrões metabólicos, o que pode explicar a redução no consumo específico de oxigênio à medida em que a concentração de carbofurano e HNO<sub>3</sub>-NTCPM foi elevada. Os testes aplicados não foram sensíveis à toxicidade dos HNO<sub>3</sub>-NTCPM, o consumo específico de oxigênio também teve pouca variação, não significativa, na presença dos HNO<sub>3</sub>-NTCPM apenas.

Baun *et al.* (2008) mostraram que a captação de fenantreno por *Daphnia magna* foi consideravelmente mais rápida na presença de nanopartículas de carbono C50, provavelmente devido à capacidade das nanopartículas transportarem o fenantreno ao organismo teste.

Segundo Handy (2008b) há claras interações entre nanopartículas de carbono com os poluentes existentes no meio ambiente, agravando sua toxicidade. Dessa forma, o carbofurano em conjunto com as nanopartículas maximizou sua toxicidade sobre a tilápia, visto os resultados mais severos de toxicidade, diminuição de consumo específico de oxigênio e tempo de natação até o cansaço, quando as duas substâncias estavam presentes em comparação as duas separadamente caracterizando efeito sinérgico.

Estudando o efeito tóxico de nanotubos de carbono de parede simples em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), Smith *et al.* (2007) sugerem que as alterações nas brânquias observadas ao final do experimento poderiam

reduzir a eficiência respiratória, concluindo que nanotubos de carbono tem efeito tóxico na respiração, o que poderia explicar a tendência dose dependente de diminuição no consumo específico de oxigênio em indivíduos expostos a nanopartículas de carbono e carbofurano com nanopartículas de carbono.

Kashiwada (2006) observou a distribuição de nanopartículas fluorescentes pelo corpo transparente do peixe arroz (*Oryzias latipes*). Este experimento mediu a fluorescência nos órgãos desse peixe, mostrando maior concentração de nanopartículas aderidas à superfície branquial, o que, segundo Smith *et al.* (2007) é mais uma evidência das nanopartículas de carbono agindo como um tóxico para peixes, tendo como principal órgão afetado, ao primeiro contato, as brânquias.

Estudos realizados nos últimos anos encontraram diversos contaminantes capazes de prejudicar o desempenho de natação em peixes (Kennedy e Farrell, 2006; Barbieri, 2007a; Barbieri, 2007b), incluindo a tilápia do nilo nos primeiros estágios de vida (Pessoa *et al.*, 2011) e robalo (Hernández-Moreno *et al.*, 2011) expostos a carbofurano.

A redução do tempo de natação até o cansaço pode resultar de mudanças na distribuição de energia que o peixe precisa alocar para a manutenção da homeostase (Kerr, 1971), de modo que o peixe para de gastar energia em natação e a redireciona para a operação de órgãos vitais para sua sobrevivência (Barbieri, 2007a).

Além disso, em função da ação inibitória da acetilcolinesterase, há o acúmulo de acetilcolina na sinapse colinérgica central e junções neuromusculares, levando a super estimulação das células alvo (Sanglio *et al.*, 1998a). Como consequência, esse distúrbio pode afetar a locomoção e o equilíbrio dos organismos expostos (Sanglio & Trijasse, 1998b; Barbieri e Ferreira 2011).

De acordo com a classificação de comportamentos de peixes como indicadores de toxicidade de Rand (1984), a atividade natatória é considerada um bom indicador de poluição, inclusive quando essas substâncias são encontradas em níveis subletais. O tempo de natação até a exaustão foi apropriado para o estudo dos efeitos agudos de tóxicos no meio ambiente por esse parâmetro proporcionar respostas rápidas e fáceis de serem mensuradas

para diferentes espécies de peixes em atividade natatória (Little e Finger, 1990. Kolak, 1999).

A natação prejudicada pode afetar diretamente a sobrevivência do peixe no ambiente aquático, uma vez que é essencial para a detecção e captura da presa devido à redução da área de busca (Laurence, 1972), bem como fuga do predador, migração, reprodução e comportamento de dominância-hierarquia, fazendo do desempenho de locomoção um parâmetro ecológico relevante (Sanglio, 1996; Baganz *et al.*, 1998; Barbieri *et al.* 2000; Fuiman *et al.*, 2006; Barbieri 2007).

Avaliando por um ano a qualidade da água em localidades de suprimento para 10 cidades do Ribeira do Iguape, São Paulo, Nogueira Marques *et al.* (2002) encontraram 20% das amostras de água superficial com resíduos de pesticidas, dentre os quais o carbofurano representou 50%. Já nas amostras de água potável, 20% das amostras continham resíduos e dentre eles o carbofurano representou 60%. Os autores chegaram à conclusão que o carbofurano foi um dos pesticidas estudados que apresentou maior mobilidade disperso em água superficial e subterrânea por sua elevada meia-vida. O crescente uso de nanopartículas aumenta a possibilidade dessas duas substâncias interagirem no ambiente aquático, maximizando a toxicidade do carbofurano.

Ainda há muito a ser elucidado acerca dos mecanismos de interação entre nanopartículas manufaturadas e outras substâncias presentes no ambiente aquático e a forma pela qual os organismos em contato com este meio são afetados, de forma que, outros estudos precisam ser realizados com a finalidade de entendermos melhor os riscos ambientais.

## **5. CONCLUSÕES**

A elevação das doses de carbofurano amostradas resultou em um aumento das taxas metabólicas dos indivíduos estudados representados por aumento no consumo específico de oxigênio.

O tempo de natação até o cansaço foi uma ferramenta mais sensível para mensurar o efeito tóxico agudo do carbofurano em relação ao consumo de oxigênio.

Em conjunto com HNO<sub>3</sub>.NTCPM, o carbofurano apresentou maior toxicidade, levando mais indivíduos à morte e em menor tempo, reforçando as evidências de nanopartículas de carbono em ação sinérgica com poluentes.

*O. niloticus* apresentou uma tendência dose dependente na diminuição no consumo específico de oxigênio, corroborando com os resultados obtidos em outros estudos da exposição à nanopartículas de carbono reduzindo a eficiência respiratória em peixes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.G., 2001. Agrotóxicos no Vale do Ribeira Coordenadoria de defesa agropecuária (CDA) – Escritório de defesa agropecuária de Registro.
- BARBIERI, E., PHAN, V.N., GOMES, V., 2000. Effects of LAS-C12, Linear Alkybenzene Sulphonate, on Metabolic rate and Swimming Capacity of *Cyprinus carpio*. *Ecotox. Environ. Rest.* 3 (2): 60 – 75.
- BARBIERI, E., PASSOS, A. E., GARCIA, C. A. B., 2005. Use of metabolism to evaluate the sublethal toxicity of mercury on *Farfantepenaeus brasiliensis* larvae. *Journal of Shellfish Research*, 24 (4): 608 – 611.
- BARBIERI, E., 2007a. Use of Metabolism and Swimming Activity to Evaluate the Sublethal Toxicity of Surfactant (LAS-C12) on *Mugil platanus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50 (1): 101 – 112.
- BARBIERI, E., 2007b. The use of active metabolism and swimming activity to evaluate the toxicity of dodecyl benzene sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (Mullet) according to temperature and salinity. *Water environment research* 79 (7): 707 – 719.
- BARBIERI, E., 2009. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pe´rez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicology* 18 (3): 312 – 318.
- BARBIERI, E., FERREIRA, L.A.A., 2011. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 on the freshwater fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pest. And physiology* 99:209-214.
- BARBIERI, E., PAES, T. E., 2011. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere* 84: 9 – 16.
- BARBIERI, E., MOREIRA, P., LUCHINI, L.A., HIDALGO, K.R., MUÑOZ, A., 2013. Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at different temperature levels. *Toxicology and Industrial health* 29: 1 – 8.
- 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-C<sub>60</sub>. *Aquatic Toxicology* 86(3): 379-387.
- BRETT, J. R., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of Young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd Can.* 21: 183 – 226.
- CARVALHO, F.P., NHAN, D.D., TAVARES, T., KLAINE, S., 1998. Tracking pesticides in the tropics. *IAEA Bulletin* 40 (3): 24 – 28.

EMBRAPA, 2007. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABZicAl/producao-tilapia-mercado-especie-biologia-recrta-embrapa>> acessado em 18/05/2012 às 16h.

EPA (US Environmental Protection Agency), 1976. Substitute chemical program: Initial scientific and minieconomic review of carbofuran. EPA 540/ 1-76-009.

FUIMAN, L.A., ROSE, K.A., COWAN, J.H., SMITH, E.P., 2006. Survival skills required for predator evasion by fish larvae and their relation to laboratory measures of performance. *Animal Behavior* 71:1389-1399.

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

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

HANDY, R.D., 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: 821 – 853.

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

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

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

KASHIWADA, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the see-through Medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Health Perspect* 114: 1697 – 1702.

KAUFMANN, R., 1990. Respiratory cost of swimming in larval and juvenile cyprinids. *J. exp. Biol.* 150: 343 – 366.

KENNEDY, C.J., FARRELL, A.P., 2006. Effects of exposure the water-soluble fraction of crude oil on the swimming performance and the metabolic and ionic recovery postexercise in Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 2715 – 2724.

KERR, S.R., 1971. Analysis of laboratory experiments on growth efficiency of fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 28: 801 – 808.



KLEINER, K., HOGAN, J., 2003. How safe is nanotech? *New Scientist* 177:14 – 15.

KOLAK, A. S., 1999. Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofauna methodologies and a brief review of the recent fish literature. *Can. J. Fish Aqua. Sci.* 56: 708 – 710.

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

LIONG, P.C., HAMZAH, W.P., MURUGAN, V., 1988. Toxicity of some pesticides towards freshwater fishes. *Fish. Bull. Dep. Fish.* 57: 13.

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

MACEK, J.K., KRZEMINSKI, S.F., 1975. Susceptibility of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) to nonionic surfactants. *Bullet. Environ. Contamin. & Toxic.* 13(3): 377-384.

MARQUES, M.N., 2005. Avaliação do impacto de agrotóxicos em áreas de proteção ambiental, pertencentes à Bacia Hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Uma contribuição à análise crítica da legislação sobre o padrão de potabilidade. Tese doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

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

MASCIANGIOLI, T., ZHANG, W., 2003. Environmental nanotechnology: Potential and pitfalls. *Environ. Sci. Technol.* 37, 102A – 108A.

MOORE, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32: 967 – 976.

MORAN, J.M., MORGAN, M.D., WIERSMA, D., JAMES, H., 1980. Introduction to environmental science, 2 Ed. WH Freeman, Nova Iorque, NY.

NOGUEIRA MARQUES, M., BARBOZA COTRIM, M. E., BELTRAME, O., 2002. Pesticide monitoring in Ribeira Valley, southeastern Brazilian.

OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E., OBERDORSTER, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113: 823 – 830.

OGA, S., 1996. Fundamentos de toxicologia, São Paulo: 477 – 486.

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

PESSOA, P.C., LUCHMANN, K.H., RIBEIRO, A.B., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquatic Toxicol.* 105(3-4): 312-20.

RAND, G. M, PETROCCELI, S.R., 1984. Fundamentals of Aquatic Toxicology 335 – 373.

ROCO, M.C., 2003. Broader societal issues of nanotechnology. *J. Nanopart. Res.* 5(3 – 4): 181 – 189.

SANGLIO, P., OLSEN, K. H., BERTAUD, S., 1998a. Behavior and ofactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron contaminated flows in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 4 – 491.

SANGLIO, P., TRIJASSE, S., 1998b. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 484 – 491.

SMITH, C.J., SHAW, B.J., HANDY, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 82: 94 – 109.

SOARES, A.M.V.M., 1990. Ecotoxicologia e Determinação de Riscos Ecológicos. Prática e Perspectivas. In: 2<sup>a</sup> Conferência nacional sobre a qualidade do ambiente. Lisboa 1:B43-B52.

SOUFY, H., SOLIMAN, M.K., EI-MANAKHLY, E.M., GAAFAR, A.Y., 2007. Some Biochemical and Pathological Investigations on Monosex Tilapia Following Chronic Exposure to Carbofuran Pesticide. *Global Veterinaria* 1 (1): 46.

STEPHENSON, R.R., CHOI, S.Y., OLMOS-JEREZ, A., 1984. Determining the toxicity and hazard to fish of a rice insecticide. *Crop Prot.* 3 (2): 151 – 165.

TROTTER, D.M., KENT, R.A., WONG, P., 1991. Aquatic fate and effect of carbofuran. *Critic. Rev. Environ. Contr.* 21: 137 – 176.

USEPA, 2004. Analysis of Risks Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. U.S. Environment Protection Agency (EPA): 69.

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

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

WINKLER, L. W., 1888, Die Bertimmung des im wasser gelösten Sauerstoffs. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 21: 2843 – 2854.

## **CAPÍTULO 2**

Efeito sinérgico do carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas nos tecidos branquiais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758).

# EFEITO SINÉRGICO DO CARBOFURANO E NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS NOS TECIDOS BRANQUIAIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758)

J. Campos-Garcia<sup>a</sup>, E. Barbieri<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação do Instituto de Pesca-SP. E-mail: jana.campos@yahoo.com.br

<sup>b</sup> Instituto de Pesca – APTA-SAA/SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, 11990-000, Brasil. (013) 97486496. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

## RESUMO

Misturas complexas de poluentes cuja toxicidade não pode ser atribuída a um ou vários compostos isolados estão presentes no meio ambiente aquático. Entre eles, está o inseticida-nematicida carbofurano, amplamente utilizado no Brasil e nanotubos de carbono, nanoestruturas promissoras para muitas aplicações na indústria de materiais e biotecnologia. Dessa forma, o estudo sobre a interação entre nanopartículas e outros poluentes presentes no meio ambiente se faz necessário. Neste primeiro estudo de interação de nanotubos de carbono e carbofurano nós avaliamos alterações de tecidos branquiais de *O. niloticus* expostas às concentrações 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de nanotubos de carbono de paredes múltiplas tratados com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>- NTCPM); 0,1; 0,5; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano e 0,1; 0,5; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano com nanotubos de carbono, além dos seus respectivos controles. Os comprimentos e larguras das lamelas secundárias dos organismos expostos a cada concentração dos compostos foram mensurados, bem como a densidade e área média ( $\mu\text{m}^2$ ) das células de cloreto e muco. Foi calculado o índice de alteração histológica (IAH) e analisou-se de forma semiquantitativa as alterações histopatológicas para cada brânquia pelo valor médio de alteração (VMA). Verificou-se hipertrofia na área média das células de muco em todos os grupos de exposição em relação ao controle e hiperplasia das células de cloreto nos grupos expostos a carbofurano e carbofurano com NTC. Quanto às alterações branquiais, o VMA e o IAH apresentaram valores superiores para os grupos expostos a concentrações de carbofurano e NTC em relação aos expostos às concentrações correspondentes de carbofurano apenas, evidenciando um efeito sinérgico destas substâncias. Outros estudos precisam ser desenvolvidos no sentido de elucidar os processos de interação entre nanopartículas e os poluentes presentes no ambiente aquático.

Destaques da pesquisa

► Os valores encontrados para o IAH indicam efeito sinérgico entre carbofurano e HNO<sub>3</sub>- NTCPM. ► O desarranjo de capilares foi a alteração histológica de maior severidade para os grupos expostos aos dois compostos. ► Nenhum dos grupos de exposição apresentou pontuação de IAH para classificação como órgão com danos irreversíveis.

Palavras chave: Sinergia; nanotubos de carbono de paredes múltiplas; *O. niloticus*; ecotoxicologia aquática.

## ABSTRACT

Complex mixtures of pollutants whose toxicity cannot be assigned to one or several isolated compounds are present in the aquatic environment, including the nematicide-insecticide carbofuran, broadly used in Brazil and carbon nanotubes, promising nanostructures to many industrial applications and biotechnology. The research of nanoparticles and other pollutants already present in the environment interaction it is necessary. On these carbon nanotubes and carbofuran interaction study we evaluated fish gill structural alterations of *O. niloticus* exposed to concentrations 0.5; 1.0 and 2.0 mg/L of HNO<sub>3</sub>-treated multiwalled carbon nanotubes (HNO<sub>3</sub>-MWCNT); 0.1; 0.5; 2.0; 4.0 and 8.0 mg/L of carbofuran and 0.1; 0.5; 2.0; 4.0 and 8.0 mg/L of carbofuran with HNO<sub>3</sub>-MWCNT, besides controls. The secondary lamella length and width of the organisms exposed to each concentration were measured, as well as the density and average area (µm<sup>2</sup>) of chloride and mucus cells. The Histological Alteration Index (HAI) was calculated and the histopathological alterations for each gill were evaluated semi-quantitatively by alteration average value. Increase in mucus cells mean area was verified to all exposure groups relative to control and chloride cells hyperplasia to groups exposed to carbofuran and carbofuran with HNO<sub>3</sub>-MWCNT. As gill alterations, the HAI presented higher values to groups exposed to carbofuran with HNO<sub>3</sub>-MWCNT concentrations relative to the corresponding values to carbofuran only, demonstrating a synergistic effect the two substances. Further studies need to be developed to elucidate the nanoparticles and other pollutants interaction processes in the aquatic environment.

### Research highlights

► The HAI values found indicate carbofuran and HNO<sub>3</sub>-MWCNT synergistic effect. ► Capillary derangement was the more severely histological alteration to the groups exposed to the two compounds. ► Any of the exposition groups presented HAI score for classification as with irreversible organ damage.

Keywords: Synergy; multi walled carbon nanotubes; *O. niloticus*; Aquatic ecotoxicology.

## 1. INTRODUÇÃO

O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) é um inseticida-nematicida com amplo espectro de ação e foi identificado como substituto químico registrado para usos problemáticos de clordane, heptachlor e aldrin, segundo EPA (Environmental Protection Agency, 1976). Por apresentar efeitos nocivos para pássaros, peixes, mamíferos, insetos e invertebrados aquáticos, o carbofurano foi banido nos Estados Unidos e Europa (USEPA, 2006), entretanto no Brasil ainda é utilizado (Barbieri *et al.*, 2013). O modo de ação do carbofurano se baseia na inibição da atividade da acetilcolinesterase nas junções sinápticas e neuromusculares (Jash e Bhattacharaya, 1983).

Além de agrotóxicos e metais pesados, os organismos aquáticos estão expostos a nanopartículas manufaturadas (Paschoalino *et al.*, 2010; Handy *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2013), de modo que, a potencial interação entre esses compostos precisa ser considerada.

Nanomateriais são materiais e produtos na escala que varia entre 1 e 100 nm (Masciangioli e Zhang, 2003; Roco, 2003; Moore, 2006; Smith, 2007) e tem beneficiado diversos segmentos, tais como alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar, entre outros (Handy, 2008; Paschoalino, 2010) e as propriedades das superfícies dos nanomateriais são de particular interesse no desenvolvimento de novos produtos com diferentes comportamentos (Handy *et al.*, 2011). Por exemplo, gaiolas mais leves e resistentes para empreendimentos aquícolas, além de filtros mais eficientes para a limpeza da água, segundo Handy *et al.* (2011).

Alguns estudos sugerem que os nanomateriais, por sua pequena dimensão apresentam permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, podendo ter seu efeito tóxico magnificado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido à sua elevada área superficial por unidade quando comparada a partículas maiores (Oberdorster *et al.*, 2005; Paschoalino *et al.*, 2010).

Soares (1990) aponta que as águas residuárias contêm misturas complexas de substâncias químicas cuja toxicidade não pode ser atribuída a um ou vários componentes isolados, de forma que, devido aos efeitos

antagonísticos e sinérgicos, a toxicidade pode ser maior, menor, ou igualar a soma da toxicidade dos seus constituintes.

As alterações estruturais observadas em diversos tecidos, estruturas e órgãos são importantes como indicadores gerais da saúde dos peixes e um reflexo dos efeitos da exposição a vários poluentes antropogênicos (Hinton *et al.*, 1992).

A exposição de peixes a contaminantes químicos pode induzir numerosas lesões em diferentes órgãos (Sindermann 1979; Bucke *et al.* 1996), sendo as brânquias (Mallatt 1985; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994) um órgão apropriado para exames histológicos no sentido de determinar efeitos de poluentes em modelos biológicos.

As brânquias são responsáveis por funções vitais como trocas gasosas, regulação iônica, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados e gustação (Machado e Fanta, 2003). A grande área superficial das brânquias em contato direto e permanente com potenciais poluentes faz desse órgão um marcador primário para poluição aquática (Bernet *et al.*, 1999), sendo o primeiro órgão a reagir a condições ambientais desfavoráveis, de maneira que alterações morfológicas nas brânquias correspondem a respostas a xenobióticos (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994).

As brânquias e a pele, órgãos em contato permanente e direto com poluentes possuem células de muco, que desempenham importante papel na resistência a doenças contra patógenos e substâncias tóxicas, entre outras funções (Shephard, 1994). A presença de células secretoras de muco do epitélio branquial em grande quantidade tem sido associada à exposição de organismos a contaminantes, sendo, portanto considerada uma alteração histológica (Bernet *et al.*, 1999). Outro tipo de célula presente nas brânquias são as células de cloreto. Segundo Evans *et al.* (2005), essas são as células mais ativas das brânquias de peixes e absorvem e secretam muitos íons e eletrólitos, sendo muito afetadas por diferentes poluentes presentes no meio ambiente, incluindo pesticidas (Khoshnood *et al.*, 2010). A hipertrofia e a hiperplasia, que correspondem, respectivamente, ao aumento do volume e à proliferação celular (Meletti, 2003) são classificadas como duas alterações progressivas e caracterizadas pelo aumento das funções das células e tecidos, provocadas pela alteração das atividades fisiológicas destes (Takashima e

Hibiya, 1995).

A sua multifuncionalidade, a vasta área de superfície que ocupa e a sua localização em contato íntimo com o meio externo fazem das brânquias um órgão chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático (Cettina, 2008). Nesse sentido, as alterações histológicas aparecem como resposta, em médio prazo, para agentes estressores subletais e as técnicas histológicas proporcionam um método rápido e preciso para detectar efeitos de poluentes, especialmente os crônicos, em vários tecidos e órgãos (Johnson *et al.* 1993).

O presente estudo foi o primeiro realizado, com a finalidade de fornecer informações dos efeitos do carbofurano, dos nanotubos de carbono e da interação entre os dois componentes utilizando como modelo biológico a tilápia do Nilo (*O. niloticus*), através da avaliação de alterações histológicas em tecidos branquiais. A hipótese deste trabalho foi que o carbofurano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas interajam sinergicamente sobre o modelo biológico utilizado provocando alterações nos tecidos branquiais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes químicos

Como padrão analítico foi utilizado carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) (99,5%, Sigma).

Foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) [*Ctube 100*, CNT Co. Ltd., Incheon – South Korea] oxidados com ácido nítrico com intento de gerar grupos oxigenados na superfície dos nanotubos e aprimorar sua dispersão em água, como descrito em Martinez *et al.* (2013). A amostra então foi seca em sistema a vácuo por 24 h. Para a preparação da solução estoque, 100 mg de HNO<sub>3</sub>-NTCPM foram dispersos em 200 mL de água deionizada e sonificado por 60 minutos em banho ultrasônico (Coleparmer 8891).

Os HNO<sub>3</sub>-NTCPM utilizados no presente estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química – Unicamp.



## 2.2. Histologia

Um total de 160 tilápias do Nilo produzidas no Instituto de Pesca em Cananéia, litoral sul de São Paulo, com massa úmida média 0,57 g ( $\pm$  0,60 g) e comprimento total médio 2,36 cm ( $\pm$  0,30 cm) tiveram suas brânquias analisadas. Grupos de 10 peixes foram dispostos em 16 aquários com capacidade para 50L preenchidos com 20L de água de clorada.

Os grupos foram expostos às seguintes concentrações de carbofurano: 0,1; 0,5; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L, nanotubos de carbono nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0 e 2,0 e carbofurano nas concentrações: 0,1; 0,5; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L acrescidos de 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM, além dos respectivos controles.

Primeiramente adicionou-se as concentrações citadas de carbofurano nos aquários, em seguida, as concentrações de nanotubos de carbono.

Peixes mortos foram prontamente retirados dos aquários e contados em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. O pH e a temperatura da água de todos os aquários foram medidos a cada 24 h e se mantiveram a 7,25 ( $\pm$  0,11) e 19,9 °C ( $\pm$  0,3) respectivamente.

Cada indivíduo morto foi imediatamente removido do aquário, pesado, medido e teve seu segundo arco branquial removido e conservado em solução de McDowell gelada para ser refrigerado em seguida.

O material foi acondicionado e transportado para o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde foi desidratado e incluído em parafina. Fazendo uso de micrótomo modelo Hyrax M25 da Zeiss®, obteve-se cortes de 4  $\mu$ m de espessura para a confecção de lâminas. Cerca de 3 lâminas foram montadas para cada indivíduo e coradas com hematoxilina/ eosina e P.A.S. e digitalizadas utilizando microscópio ICS- Standard 25 (Zeiss®) com câmera AxioCam HRC (Zeiss®).

Foram obtidas cerca de 50 fotos ao acaso no aumento de 400x e 30 fotos no aumento 1000x de cortes corados com hematoxilina/ eosina e 30 fotos no aumento 1000x de cortes corados com P.A.S. de cada indivíduo. Após a digitalização das lâminas, as imagens foram submetidas a um programa específico de mensurações de área, Image J®, no qual foram feitas as seguintes medidas nas imagens das brânquias: 100 comprimentos e 100

larguras das lamelas secundárias em aumento de 400x (H./E.), 30 áreas de contagem de células de mucosa em aumento de 1000x (P.A.S.) e 30 áreas de contagem de células de cloreto em aumento de 1000x (H./E.). Além disso, foram feitas as contagens e mensurações de área das células de muco e de cloreto.

As brânquias foram avaliadas para a verificação de possíveis alterações histológicas, foram classificadas em estágios de severidade, segundo o método de Poleksic e Mitrovic- Tutundzic (1994) apresentado na tabela 1, onde: estágio I representa alterações que não comprometem o funcionamento do tecido; estágio II são alterações mais severas e que prejudicam o funcionamento do órgão e estágio III, alterações muito severas e irreversíveis.

Tabela 1- Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de *Oreochromis niloticus*.

<b>Alterações Histológicas</b>	<b>Estágio</b>
<b>a) Hipertrofia e hiperplasia do tecido respiratório</b>	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
<b>b) Alterações nas células mucosas e cloreto</b>	
Hipetrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células de cloreto	I

Presença de células de cloreto nas lamelas secundárias	I
<b>c) Alterações nos vasos sanguíneos lamelares</b>	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	II
Aneurisma lamelar	II
<b>d) Estágio terminal</b>	
Fibrose	III
Necrose	III
<b>e) Parasitas branquiais</b>	
Presença de parasitas	I

Após a análise das alterações, foi utilizado o Índice de Alteração Histológica (I.A.H.), onde se submeteu a uma fórmula que permite quantificar essas alterações:

$$I = \sum_{i=1}^{n_a} a_i + 10 \sum_{i=1}^{n_b} b_i + 100 \sum_{i=1}^{n_c} c_i$$

Em que:

- a- Primeiro estágio de alteração.
- b- Segundo estágio de alteração.
- c- Terceiro estágio de alteração.

$n_a$ - número total de alterações de primeiro estágio.

$n_b$ - número total de alterações de segundo estágio.

$n_c$ - número total de alterações de terceiro estágio.

Foi estabelecido ainda relações entre os valores de I e os efeitos nas brânquias descritos na tabela 2.

Tabela 2- Relação entre os valores de I e os efeitos nos órgãos.

<b>Valores de I</b>	<b>Efeitos</b>
0 - 10	Órgão funcionalmente normal
11 - 20	Órgão com alterações de leves a moderadas
21 - 50	Órgão com alterações de moderadas a graves
51 - 100	Órgão com alterações graves
> 100	Órgão com danos irreversíveis

Foi utilizado o método modificado de Schwaiger *et al.* (1997) para a análise semiquantitativa de alterações histopatológicas para cada brânquia pelo valor médio de alteração (VMA), que é baseado na ocorrência de lesões, as quais são atribuídas valores numéricos em uma escala de severidade e ocorrência (tabela 3):

*Grau 1 = sem alterações patológicas;*

*Grau 2 = alterações pontuais brandas e moderadas;*

*Grau 3 = alterações patológicas severas e amplamente distribuídas.*

Tabela 3- Critérios para pontuação das lesões em função da ocorrência das alterações nas brânquias. Modificado de Schwaiger *et al.* (1997).

<b>Pontuação</b>	<b>Ocorrência das alterações</b>
0	Alteração não observada
1 (discreta)	1 – 5 ocorrências
2 (moderada)	6 – 10 ocorrências
3 (intensa)	11 – 15 ocorrências
4 (severa)	Acima de 15 ocorrências

Os dados foram avaliados em função das médias e desvios padrões obtidos por análises estatísticas do ANOVA, após a verificação das

distribuições normais. Utilizou-se o programa estatístico Assistat 7.6 beta (2013). Diferenças foram consideradas significantes quando o  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Mensuração do comprimento e largura das lamelas secundárias das brânquias.

Em relação ao controle, houve aumento nos valores de comprimento e largura encontrados em todos os tratamentos, tanto para os grupos expostos a carbofurano quanto para os expostos a carbofurano e nanotubos de carbono (Tabelas 1 e 3). Houve aumento estatisticamente significativo no comprimento e largura média ( $\mu\text{m}$ ) do grupo exposto à concentração 8,0 mg/L de carbofurano em relação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1: Comprimentos e larguras médias ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L), além do controle.

Concentração Carbofurano (mg/L)	Comprimento	Largura
0	<b>16,786<sup>b</sup></b> $\pm 2,489$	<b>2,509<sup>b</sup></b> $\pm 0,588$
2,0	<b>18,401<sup>ab</sup></b> $\pm 2,379$	<b>3,023<sup>ab</sup></b> $\pm 0,399$
4,0	<b>18,203<sup>b</sup></b> $\pm 1,360$	<b>3,061<sup>ab</sup></b> $\pm 0,387$
8,0	<b>23,270<sup>a</sup></b> $\pm 2,925$	<b>3,537<sup>a</sup></b> $\pm 0,285$

Quanto aos indivíduos expostos a concentrações de  $\text{HNO}_3$ -NTCPM, notou-se diferença estatística na largura do grupo exposto a 1,0 mg/L de nanotubos de carbono em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2: Comprimentos e larguras médias ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de  $\text{HNO}_3\text{.NTCPM}$  (mg/L), além do controle.

Concentração de $\text{HNO}_3\text{.NTCPM}$ (mg/L)	Comprimento	Largura
0	<b>16,786<sup>a</sup></b> $\pm 2,489$	<b>2,509<sup>b</sup></b> $\pm 0,588$
0,1	<b>17,092<sup>a</sup></b> $\pm 2,301$	<b>2,794<sup>ab</sup></b> $\pm 0,881$
0,5	<b>17,124<sup>a</sup></b> $\pm 1,658$	<b>3,068<sup>ab</sup></b> $\pm 1,875$
1,0	<b>18,579<sup>a</sup></b> $\pm 1,481$	<b>3,263<sup>a</sup></b> $\pm 0,145$
2,0	<b>18,803<sup>a</sup></b> $\pm 1,135$	<b>3,093<sup>ab</sup></b> $\pm 0,322$

Tabela 3: Comprimentos e larguras médias ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L) e 1,0 mg/L de nanotubos de carbono, além do controle.

Concentração Carbofurano (mg/L) + 1,0 mg/L $\text{HNO}_3\text{.NTCPM}$	Comprimento	Largura
0	<b>16,786<sup>a</sup></b> $\pm 2,489$	<b>2,509<sup>b</sup></b> $\pm 0,588$
2,0	<b>18,500<sup>ab</sup></b> $\pm 1,297$	<b>2,222<sup>b</sup></b> $\pm 0,413$
4,0	<b>18,932<sup>ab</sup></b> $\pm 1,543$	<b>3,110<sup>ab</sup></b> $\pm 1,285$
8,0	<b>22,493<sup>b</sup></b> $\pm 3,684$	<b>3,155<sup>a</sup></b> $\pm 0,309$

Tabela 4: Comprimentos e larguras médias ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das médias das lamelas secundárias de 100 brânquias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L) e concentrações de carbofurano (mg/L) com 1,0 mg/L de nanotubos de carbono, além do controle.

Concentração Carbofurano (mg/L)	Comprimento	Largura	Concentração Carbofurano (mg/L) + 1,0 mg/L HNO <sub>3</sub> -NTCPM	Comprimento	Largura
0	<b>16,786<sup>b</sup></b> ±2,489	<b>2,509<sup>b</sup></b> ±0,588	0	<b>16,786<sup>b</sup></b> ±2,489	<b>2,509<sup>b</sup></b> ±0,588
2,0	<b>18,403<sup>ab</sup></b> ±2,379	<b>3,023<sup>ab</sup></b> ±0,399	2,0	<b>18,204<sup>ab</sup></b> ±1,297	<b>2,245<sup>b</sup></b> ±0,413
4,0	<b>18,183<sup>ab</sup></b> ±1,360	<b>3,061<sup>ab</sup></b> ±0,387	4,0	<b>19,024<sup>ab</sup></b> ±1,543	<b>3,110<sup>ab</sup></b> ±1,285
8,0	<b>23,270<sup>a</sup></b> ±2,925	<b>3,537<sup>a</sup></b> ±0,285	8,0	<b>22,493<sup>a</sup></b> ±3,684	<b>3,155<sup>ab</sup></b> ±0,309

### 3.2. Análise morfométrica das células de muco e células de cloreto.

Não foi observada diferença estatística significativa na área média das células de cloreto dos grupos de exposição ao carbofurano (mg/L) em relação ao controle. No entanto, a densidade foi estatisticamente maior em relação ao controle, caracterizando hiperplasia desse tipo de célula.

A densidade das células de muco apresentou diminuição estatisticamente significativa em todos os grupos de exposição ao carbofurano (mg/L) em relação ao controle (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Foi verificado aumento na área média dessas células ( $\mu\text{m}^2$ ), no entanto, sem relevância estatística.

Tabela 5: Densidade e área média das células de cloreto ( $\mu\text{m}^2$ ) e células de muco ( $\mu\text{m}^2$ ) das lamelas primárias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L), além do controle.

Concentração de Carbofurano	Densidade células de	Área média células de	Densidade células de	Área média células de
-----------------------------	----------------------	-----------------------	----------------------	-----------------------

(mg/L)	cloreto	cloreto ( $\mu\text{m}^2$ )	muco	muco ( $\mu\text{m}^2$ )
0	<b>29,5<sup>c</sup></b> $\pm 1,73$	<b>50,804<sup>a</sup></b> $\pm 15,483$	<b>18,0<sup>a</sup></b> $\pm 0,285$	<b>18,741<sup>a</sup></b> $\pm 9,45$
2,0	<b>46,0<sup>b</sup></b> $\pm 2,10$	<b>50,715<sup>a</sup></b> $\pm 17,271$	<b>15,0<sup>b</sup></b> $\pm 0,399$	<b>16,669<sup>a</sup></b> $\pm 8,73$
4,0	<b>50,0<sup>b</sup></b> $\pm 2,30$	<b>59,539<sup>a</sup></b> $\pm 11,990$	<b>16,0<sup>ab</sup></b> $\pm 0,412$	<b>17,123<sup>a</sup></b> $\pm 6,66$
8,0	<b>97,2<sup>a</sup></b> $\pm 6,36$	<b>54,497<sup>a</sup></b> $\pm 12,637$	<b>11,0<sup>c</sup></b> $\pm 0,121$	<b>21,914<sup>a</sup></b> $\pm 8,73$

Houve aumento estatístico significativo na densidade das células de cloreto a partir da concentração 1,0 mg/L de NTC e aumento não significativo da área média dessas células (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Nas três concentrações de nanotubos de carbono a densidade das células de muco foi estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ), caracterizando hiperplasia e a concentração 2,0 mg/L de nanotubos de carbono apresentou aumento estatisticamente significativo da área média de células de muco em relação ao controle, caracterizando hipertrofia desse tipo de célula (ANOVA,  $P < 0,05$ ) (tabela 6).

Tabela 6: Densidade e média da área das células de cloreto ( $\mu\text{m}^2$ ) e células de muco ( $\mu\text{m}^2$ ) das lamelas primarias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de  $\text{HNO}_3$ -NTCPM (mg/L), além do controle.

Concentração de $\text{HNO}_3$ -NTCPM (mg/L)	Densidade células de cloreto	Área média células de cloreto ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidade células de muco	Área média células de muco ( $\mu\text{m}^2$ )
0	<b>29,5<sup>b</sup></b> $\pm 1,73$	<b>50,804<sup>a</sup></b> $\pm 15,483$	<b>18,0<sup>c</sup></b> $\pm 0,285$	<b>18,741<sup>b</sup></b> $\pm 9,45$
0,5	<b>31,7<sup>b</sup></b> $\pm 1,43$	<b>52,616<sup>a</sup></b>	<b>60,3<sup>b</sup></b> $\pm 0,244$	<b>24,342<sup>ab</sup></b>



		$\pm 14,437$		$\pm 12,41$
1,0	<b>50,0<sup>a</sup></b> $\pm 2,88$	<b>51,168<sup>a</sup></b> $\pm 15,249$	<b>76,7<sup>a</sup></b> $\pm 0,313$	<b>29,445<sup>ab</sup></b> $\pm 15,03$
2,0	<b>54,0<sup>a</sup></b> $\pm 2,62$	<b>54,345<sup>a</sup></b> $\pm 13,925$	<b>79,2<sup>a</sup></b> $\pm 0,455$	<b>40,404<sup>a</sup></b> $\pm 13,75$

As células de muco apresentaram diminuição na densidade de 18,0 ( $\pm 0,285$ ) no controle para 15,0 ( $\pm 0,222$ ) na concentração 8,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de nanotubos de carbono. No entanto, a área média dessas células ( $\mu\text{m}^2$ ) aumentou de 18,741 ( $\pm 9,45$ ) no controle para 21,244 ( $\pm 8,20$ ) na concentração 8,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de nanotubos de carbono (tabela 7).

Tabela 7: Densidade e média da área das células de cloreto ( $\mu\text{m}^2$ ) e células de muco ( $\mu\text{m}^2$ ) das lamelas primárias de indivíduos expostos a diferentes concentrações de carbofurano (mg/L) e 1,0 mg/L de nanotubos de carbono, além do controle.

Concentração de carbofurano (mg/L) + 1mg/L de HNO <sub>3</sub> -NTCPM	Densidade células de cloreto	Área média células de cloreto ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidade células de muco	Área média células de muco ( $\mu\text{m}^2$ )
0	<b>29,5<sup>d</sup></b> $\pm 1,73$	<b>50,804<sup>a</sup></b> $\pm 15,483$	<b>18,0<sup>a</sup></b> $\pm 0,285$	<b>18,741<sup>a</sup></b> $\pm 9,45$
2,0	<b>56,0<sup>c</sup></b> $\pm 3,20$	<b>55,587<sup>a</sup></b> $\pm 13,675$	<b>16,3<sup>ab</sup></b> $\pm 0,313$	<b>16,614<sup>a</sup></b> $\pm 7,51$
4,0	<b>72,0<sup>b</sup></b> $\pm 4,58$	<b>59,859<sup>a</sup></b> $\pm 13,083$	<b>16,5<sup>ab</sup></b> $\pm 0,211$	<b>18,949<sup>a</sup></b> $\pm 12,34$
8,0	<b>91,0<sup>a</sup></b> $\pm 5,89$	<b>55,593<sup>a</sup></b> $\pm 16,504$	<b>15,0<sup>b</sup></b> $\pm 0,222$	<b>21,244<sup>a</sup></b> $\pm 8,20$

### 3.3. Análise das alterações histológicas.

As brânquias dos peixes do grupo controle apresentaram aspecto normal, sendo consideradas segundo o IAH (Índice de alteração histológica), órgão funcionalmente normal e sem alterações patológicas, segundo o VMA. Já os grupos expostos a carbofurano (mg/L) e carbofurano (mg/L) com 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>-NTCPM, a partir da concentração 2,0 mg/L tiveram as brânquias classificadas como órgão com alterações moderadas a graves, segundo o IAH e alterações patológicas severas e extensas, de acordo com o VMA. Nas concentrações 8,0 mg/L de carbofurano e 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>-NTCPM, sendo esta última concentração 25% superior à concentração correspondente 8,0 mg/L de carbofurano apenas (tabela 8).

Tabela 8: Intensidade das alterações segundo o Índice de Alteração Histológica (IAH) e o Valor Médio de Alterações (VMA) para todas as amostragens realizadas.

	Controle	NTC (mg/L)			Carbofurano (mg/L)					Carbofurano(mg/L)+ 1,0mg/L HNO <sub>3</sub> .NTCPM				
		0,5	1,0	2,0	0,1	0,5	2,0	4,0	8,0	0,1	0,5	2,0	4,0	8,0
IAH	9,45	35,27	50,00	52,92	18,32	25,70	51,00	53,83	65,00	24,16	36,58	52,00	59,25	87,25
VMA														

LEGENDA	
IAH	VMA
0 – 10: órgão funcionalmente normal.	Grau 1: sem alterações patológicas.

11 – 20: órgão com alt. leves a moderadas.	Grau 2: alt. Pontuais a moderadas.
21 – 50: órgão com alt. moderadas a graves.	Grau 3: alt. Patológicas severas e extensas.
51 – 100: órgão com alt. graves.	
> 100: Órgão com danos irreversíveis.	

Nos grupos expostos às concentrações de carbofurano, as alterações histológicas mais frequentes foram deslocamento das células do epitélio, hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias, dilatação e desarranjo dos capilares, sendo esta última considerada intensa, com 14 ocorrências e severa na concentração 8,0 mg/L de carbofurano com 1,0 mg/L de nanotubos, com 19 ocorrências (tabela 9).

Tabela 9: Valores médios de alterações histológicas (VMA) observadas e classificação para as lesões em indivíduos provenientes de todas as amostragens de acordo com Schwaiger *et al.* (1997).

Lesões	Médias													
	Controle	HNO <sub>3</sub> -NTCPM (mg/L)			Carbofurano (mg/L)					Carbofurano (mg/L) + 1,0 mg/L HNO <sub>3</sub> -NTCPM				
		0,5	1,0	2,0	0,1	0,5	2,0	4,0	8,0	0,1	0,5	2,0	4,0	8,0
Hipertrofia das células epiteliais	0	0	1,25	0,33	1,25	2,00	3,00	3,33	3,00	2,00	3,00	3,00	4,50	4,00
Adelgamento epitelial	0	1,33	2,75	4,33	1,33	2,00	3,00	2,33	3,25	2,50	4,33	5,00	6,00	6,00
Deslocamento ou elevação das céls. do epitélio	0	1,33	2,50	3,33	2,00	2,00	5,00	6,00	5,00	3,33	6,25	7,00	7,50	6,75

Ruptura epitelial	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0,25	0,25
Hiperplasia das céls. epiteliais na base das lamelas secundárias	1,25	5,66	6,00	4,33	2,00	2,00	2,00	2,00	5,25	2,00	2,25	2,00	2,25	7,25
Hiperplasia das céls. epiteliais ao longo das lamelas secundárias	0	6,33	7,50	6,33	1,33	2,00	2,00	3,33	6,50	2,00	2,00	2,00	3,00	7,25
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	2,00	4,33	4,50	7,33	2,00	2,00	2,00	3,66	5,00	2,00	2,50	3,00	3,25	9,50
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	1,50	1,66	2,00	2,66	1,50	1,50	1,50	2,00	2,50	1,50	1,50	1,50	2,00	2,75
Dilatação dos capilares	1,70	6,00	7,5	5,66	2,25	5,66	7,00	7,66	8,75	2,50	6,75	8,00	9,00	9,75
Desarranjo dos capilares	2,25	4,33	5,75	11,66	3,66	5,66	7,00	7,66	14,00	4,33	6,00	9,00	12,75	19,00
Congestão vascular	0,75	1,00	2,75	3,66	1,00	1,00	2,00	2,66	1,75	2,00	2,00	2,00	1,50	2,00
Hemorragia causada por ruptura de cap.	0	0,33	0	0	0	0	0	0,66	0,25	0	0	0	0,25	0,25
Aneurisma lamelar	0	0	0,75	0,33	0	0	2,00	0,66	0,50	0	0	1,00	0,25	0,8

LEGENDA	
Pontuação	Ocorrência das alterações
0	Alteração não observada
1 (discreta)	1 – 5 ocorrências
2 (moderada)	6 – 10 ocorrências
3 (intensa)	11 – 15 ocorrências
4 (severa)	> 15 ocorrências

Com a análise microscópica das brânquias dos animais do grupo controle, descreveu-se um padrão de normalidade. Foram observados um capilar sanguíneo sustentados por células pilares; células epiteliais ao longo da lamela secundária e células epiteliais na base da lamela secundária (Figura 1A).

As células pilares são responsáveis por manter a estrutura lamelar e controlar o fluxo sanguíneo, e, com o rompimento dessas células, perde-se a estrutura dos capilares, causando desarranjos, que podem levar a um acúmulo de células sanguíneas caracterizando um aneurisma (Figura 1H).

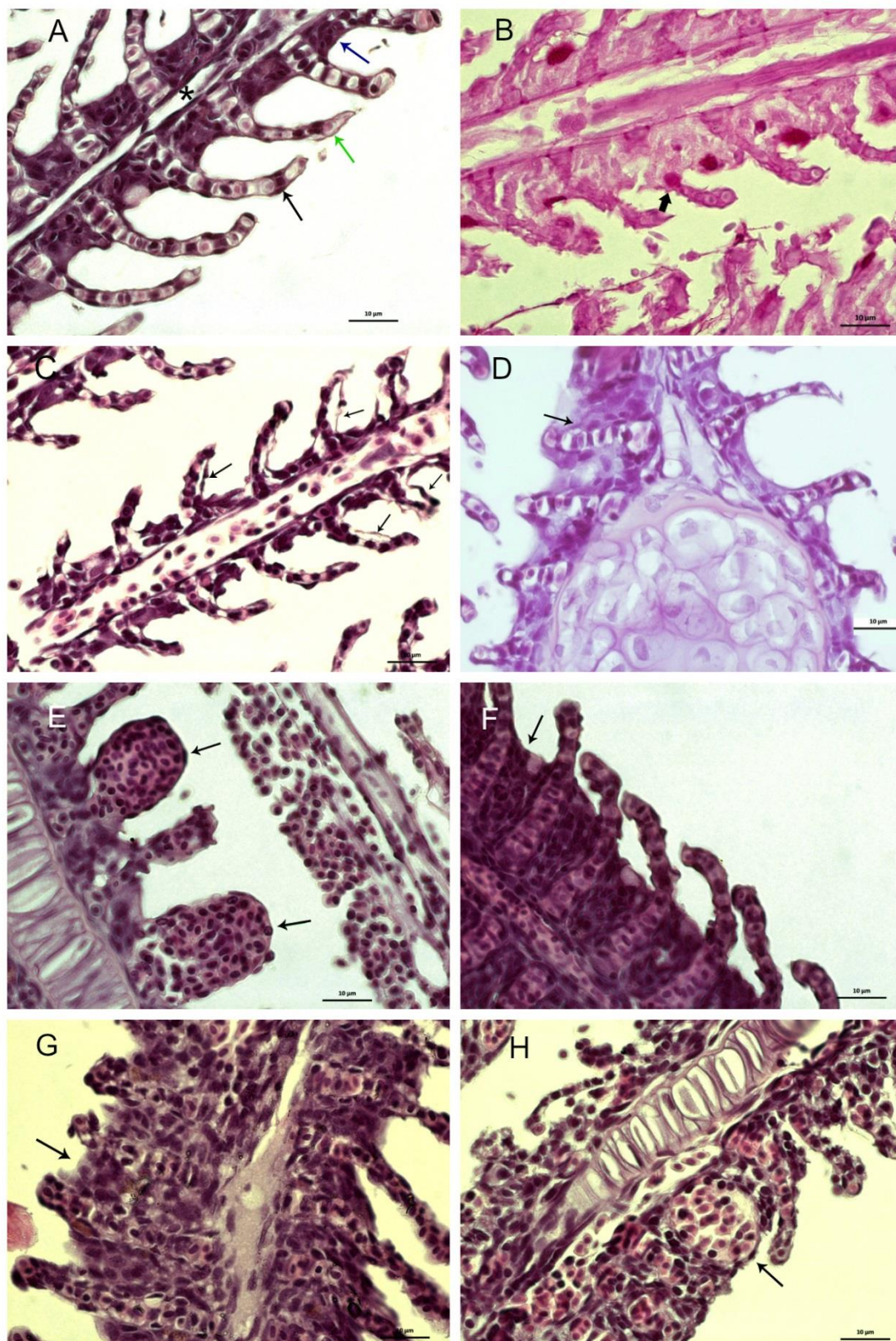


Figura 1: Fotomicrografia do corte histológico em parafina das lamelas secundárias do segundo arco branquial de *O. niloticus*. **A.** Controle. A seta preta indica célula pilar; a seta verde indica capilar sanguíneo e o asterisco, a lamela primária. Coloração Hematoxilina e Eosina. **B.** Exposto a 8,0 mg/L de

carbofurano e 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. A seta indica célula de muco na lamela secundária. Coloração PAS. **C.** Exposto a 4,0 mg/L de carbofurano e 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. As setas indicam deslocamento lamelar. Coloração Hematoxilina e Eosina. **D.** Exposto a 8,0 mg/L de carbofurano e 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. A seta indica célula de cloreto na lamela secundária. Coloração Hematoxilina e Eosina. **E.** Exposto a 8,0 mg/L de carbofurano e 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. As setas indicam aneurisma. Coloração Hematoxilina e Eosina. **F.** Exposto a 8,0 mg/L de carbofurano e 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. A seta indica fusão parcial das lamelas secundárias. Coloração Hematoxilina e Eosina. **G.** Exposto a 8,0 mg/L de carbofurano. A seta indica fusão parcial das lamelas secundárias. Coloração Hematoxilina e Eosina. **H.** Exposto a 1,0 mg/L de HNO<sub>3</sub>.NTCPM. A seta indica aneurisma. Coloração Hematoxilina e Eosina.

#### 4. DISCUSSÃO

Devido à importância econômica e ecológica de peixes de água doce e os problemas relacionados com a poluição da água, avaliou-se os efeitos de carbofurano, nanotubos de carbono e a interação de nanotubos de carbono e carbofurano em juvenis de tilápia do Nilo, visto que peixes são bons indicadores biológicos. Yu *et al.* (2011) investigaram a toxicidade aguda e o sinergismo de quatro biocidas antifouling (Irgarol 1051, dichlofluanid, tolylfluanid e Sea-Nine 211) e cinco metais pesados (Ni, Pb, Zn, Cd e Cu) usando embriões de ouriço do mar (*Glyptocidaris crenularis*). Este estudo relatou efeitos sinérgicos em quase todas as 25 misturas. Fato também comprovado neste trabalho onde se encontrou efeito sinérgico quando usamos uma mistura de carbofurano e HNO<sub>3</sub>.NTCPM em tilápia do Nilo.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos comprimentos e larguras das lamelas secundárias dos organismos expostos a concentrações mais elevadas de carbofurano, nanotubos de carbono e os dois reagentes juntos no presente estudo. Griffitt *et al.* (2009) também registraram aumento na largura das lamelas secundárias causado por exposição à nano-Cu, sugerindo que algumas patologias são específicas a um determinado material.

No presente estudo, houve aumento na área média ( $\mu\text{m}^2$ ) das células de muco, caracterizando hipertrofia em todos os grupos de exposição em relação ao controle. Segundo Burkhard-Holm (1997), este é um dos mecanismos de proteção do epitélio branquial a secreção de uma camada de

glicoproteínas e glicolípídeos. Tal mecanismo é verificado pelo aumento do volume de células de muco no epitélio branquial (Sabóia-Morais *et al.*, 1996), o que leva a uma hipersecreção de muco e promove um aumento da barreira água-sangue, podendo ser considerado uma proteção contra agentes tóxicos (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Quanto às células de cloreto, registrou-se hiperplasia nos grupos expostos a carbofurano e carbofurano com nanotubos. De acordo com Laurent e Perry (1991), alterações morfológicas das brânquias sobre o efeito de poluentes podem ser consideradas tentativas adaptativas de se conservar algumas funções fisiológicas e a proliferação das células de cloreto seria um ajuste compensatório pela perda de íons pelo epitélio e sua dificuldade de absorção.

Em sua pesquisa sobre truta arco-íris (*O. mykiss*) expostos a 0,1, 0,25 e 0,5 mg/L de nanotubos de carbono de parede simples pelo período de 10 dias, Smith *et al.* (2007) observaram hiperplasia na base da lamelas dos três tratamentos e ausência nos controles, além disso, observou-se grande aumento de secreção de muco na superfície das brânquias nos grupos de exposição em relação ao controle. No presente estudo realizado com tilápias também foi constatada marcante hiperplasia das células epiteliais na base e ao longo das lamelas secundárias e marcante hiperplasia de células de muco nos indivíduos expostos aos tratamentos com nanotubos de carbono em relação aos outros dois tratamentos.

Segundo Thophon *et al.* (2003), a elevação epitelial, caracterizada pelo deslocamento da camada externa do epitélio da lamela secundária é um primeiro sinal de patologia em peixes, e, juntamente com outras alterações tais como hiperplasia das células epiteliais na base e ao longo das lamelas secundárias e a fusão lamelar parcial e total funcionam como mecanismos de defesa, porque diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia, aumentando a barreira de difusão ao poluente (Erkmen e Kolankaya, 2000), conseqüentemente, seu acesso ao sangue comprometendo, contudo, a realização do trocas gasosas (McDonald e Wood, 1993), além de prejudicarem funções importantes como a manutenção dos equilíbrios ácido-básico e osmótico (Meletti, 2003).



Estas alterações nas lamelas branquiais apresentam um efeito comum que é o aumento da distância entre a água e o sangue, distanciando, dessa forma, o agente agressor do sistema de distribuição de moléculas do organismo (Mallat, 1985).

No presente estudo, o deslocamento das células do epitélio foi classificado como moderado segundo o IAH para os grupos expostos às concentrações de carbofurano com NTC e discreto para os expostos a concentrações de carbofurano e NTC separadamente, evidenciando efeito sinérgico entre os dois agentes. O adelgamento epitelial; hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias; dilatação dos capilares e desarranjo dos capilares também obteve pontuação superior no IAH nos grupos de exposição de carbofurano com NTC em comparação com os grupos das duas substâncias separadas. Peralta-Videa *et al.* (2011) ressaltam que nanopartículas podem absorver tanto poluentes orgânicos como herbicidas e pesticidas, quanto inorgânicos (metais pesados) devido à sua grande área de superfície e, o destino dos poluentes já existentes no meio ambiente pode ser alterado pelas nanopartículas, ao mesmo tempo que as nanopartículas alteram seu destino e comportamento quando associadas a outras substâncias.

Todos os grupos de exposição ( $\text{HNO}_3$ -NTCPM, carbofurano e carbofurano com  $\text{HNO}_3$ -NTCPM) demonstraram relação dose dependente no IAH. No entanto, os valores encontrados para carbofurano e  $\text{HNO}_3$ -NTCPM foram até 25,5% superiores aos calculados para carbofurano nas mesmas concentrações. Já o VMA verificado para a concentração 4,0 mg/L de carbofurano foi grau 2, com alterações pontuais a moderadas; a mesma concentração de carbofurano com 1,0 mg/L de  $\text{HNO}_3$ -NTCPM obteve grau 3, alterações severas e extensas, reforçando o efeito sinérgico entre os dois compostos, mais tóxicos em ação conjunta do que separadamente.

A questão da modulação de nanotubos com outros reagentes vem sido discutida em outros estudos. Pesquisando os efeitos de nanotubos de carbono no desenvolvimento embrionário do peixe *Danio rerio*, Cheng *et al.* (2007) observaram que os nanotubos melhoraram a qualidade da água onde os embriões estavam, em relação ao controle. Foi postulado que os nanotubos adsorveram as excretas produzidas pelos embriões, indicando sua propriedade como adsorventes de tóxicos do meio ambiente.

De acordo com Shaw e Handy (2011), há evidências de um efeito “veículo de entrega” quando metais pesados estão presentes como co-contaminantes com nanopartículas, devido a habilidade destes em serem adsorvidos à superfície de nanopartículas carregadas negativamente. Martinez *et al.* (2013) verificaram aumento de mais de cinco vezes na toxicidade do chumbo em *O. niloticus* com a adição de nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidado (HNO<sub>3</sub>-NTCPM), ressaltando as evidências do efeito “veículo de entrega” dos nanotubos de carbono.

Por sua vez, Baun *et al.* (2008) observaram que a toxicidade do fenantreno em algas aumentou 60% na presença de agregados de nanopartículas C<sub>60</sub> e, foi 10 vezes mais tóxico para *D. magna*. A captação do hidrocarboneto foi 1.7 vezes mais rápida por *D. magna* quando C<sub>60</sub> estava presente na suspensão, demonstrando a influência de nanopartículas na bioacumulação e toxicidade aquática quando em contato com outros contaminantes presentes no meio ambiente aquático.

Co-contaminantes podem mudar as características dos nano-agregados, logo, sua toxicidade (Henry, 2011). Dessa forma os efeitos das nanopartículas com outros poluentes já presentes no meio ambiente podem apresentar maior importância toxicológica que os das nanopartículas em si. No sentido de elucidar os mecanismos de modulação entre nanopartículas e outras substâncias presentes no meio aquático e a forma pela qual os organismos em contato com este meio são afetados, outros estudos necessitam serem realizados com a finalidade de entendermos melhor os riscos ambientais a que estamos sujeitos.

## 5. CONCLUSÕES

A tilápia do Nilo (*O. niloticus*) foi um modelo biológico apropriado para o estudo, respondendo muito bem às diferentes concentrações de NTC e carbofurano as quais foi exposta.

Todos os grupos de exposição (NTC, carbofurano e carbofurano com NTC) demonstraram relação dose dependente no Índice de Alteração Histológica, no entanto, os valores encontrados para carbofurano e NTC foram

até 25% superiores aos encontrados para carbofurano nas mesmas concentrações, indicando efeito sinérgico entre os dois compostos.

Uma vez que a utilização e produção industrial de nanopartículas já alcança toneladas por ano e só tende a aumentar, novos estudos se fazem necessários no sentido de elucidar os processos de interação entre as nanopartículas e os poluentes já presentes no meio ambiente e de que forma os sistemas biológicos podem ser afetados por eles.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 diferente temperature levels. *Toxicology and Industrial health* 29: 1 – 8.
- 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-C<sub>60</sub>. *Aquatic Toxicology*, 86 (3): 379 – 387.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARD-HOLM, P., WAHLI, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22: 25 – 34.
- BUCKE, D., VETHAAK, D., LANG, T., MELLERGAARD, S., 1996. Common diseases and parasites of fish in the north atlantic: Training guide for identification. International council for the exploration of the sea techniques in marine environmental sciences, Copenhagen.
- BURKHARD-HOLM, P., 1997. Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *Histochemistry Journal*, 29: 893 – 899.
- CETTINA, L.B., 2008. Análise morfológica da ação dos níveis subletais do organofosforado Folidol® 600 sobre as brânquias do peixe de água doce *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Paraná.
- CHENG, J., FLAHAUT, E., CHENG, S. H., 2007. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 708 – 716.
- ERKMEN, B., KOLANKAYA, D., 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of Capoeta tinca living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 418 – 425.
- EVANS, D. H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 71: 47 – 58.
- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M., CHOE, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85: 97 – 177.
- EPA (US Environmental Protection Agency), 1976. Substitute chemical program: Initial scientific and minieconomic review of carbofuran. EPA 540/ 1-76-009.
- GRIFFITTI, R. J., HYNDMAN, K., DENSLOW, N. D., BARBER, D. S., 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1972 – 1978.

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

HANDY, R.D., 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: 821–853.

HENRY, T., 2011. Aquatic toxicity in fish: Chronic studies, sub-lethal effects.

HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.R., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S., 1992. Histopathologic Biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerli, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. Cap. 4: 155-196.

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

JOHNSON, L. L., STEHR, C. M., OLSON, O. P., MYERS, M. S., PIERCE, S. M., WIGREN, C. A., McCAIN, B. B, VARANASI, U., 1993. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. *Environmental Science and Technology* 27: 2759 – 2771.

KHOSHNOOD, Z., KHODABANDEH, S., MOGHADDAM, M. S., KHORJESTAN, S. M., 2010. Histopathological and pathomorphological effects of mercuric chloride on the gills of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, Fry. *International Journal of Natural Resources and Marine Sciences*, 1 (1): 23 – 32.

LAURENT, P., PERRY, S.F., 1991. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiological Zoology* 64 (1): 4 – 25.

MACHADO, M.R., FANTA, E., 2003. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (3): 361 – 372.

MALLATTI, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 630 – 648.

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

MASCIANGIOLI, T., ZHANG, W., 2003. Environmental nanotechnology: Potential and pitfalls. *Environ. Sci. Technol.* 37, 102A – 108A.

McDONALD, D. G., WOOD, C. M., 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: *Fish Ecophysiology*. London: Chapman e Hall, 1993: 297 – 321.

MELETTI, P.C., 2003. Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. Tese doutorado: 3 – 231.

MOORE, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32: 967 – 976.

OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E., OBERDORSTER, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113: 823-83.

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

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

POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Em: MULLER, R.; LLOYD, R. (eds.). Sublethal and chronic effects of pollutants on fresh water fish. Oxford: Fishing News Books: 339-352.

SABÓIA-MORAIS, S. M. T., HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J., MOTA, D. L., BITTENCOURT, A. M., 1996. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivípara*. *Journal Fish. Biology* 49: 545 – 548.

SCHWAIGER, J., WANDE, R., Adm, S., PAWERT, M., HONNEN, W., TRIEBSKORN, R., 1997. The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal Aquatic Ecosystem Stress Recovery* 6: 75 – 86.

SHAW, B.J., HANDY, R.D., 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. *Environ. International* 37, n. 6: 1083 – 1097.

SHEPHARD, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Review in Fish Biology and Fisheries* 4: 401 – 429.

SIDERMANN, C.J., 1979. Pollution associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: a review. *Fishery Bulletin*, 76, n.4: 717 – 749.

SMITH, C. J., SHAW, B. J., HANDY, R. D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 82: 94 – 109.

SOARES, A. M. V. M., 1990. Ecotoxicologia e Determinação de Riscos Ecológicos. Prática e Perspectivas. In: 2ª Conferência nacional sobre a qualidade do ambiente. Lisboa, 1: B43 – B52.

TAKASHIMA, F., HIBIYA, T., 1995. An Atlas of Fish Histology – Normal and Pathological Features. Kodansha Ltd.: 195.

THOPHON, S., KRUATRACHUE, M., UPATHAM, E. S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.* 121: 307 – 320.

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

YU, X. Y., LUO, T., ZHANG, Y. X., JIA, Y., ZHU, B. J., FU, X. C., LIU, J. H., HUANG, X. J., 2011. Adsorption of Lead (II) on O-2-Plasma-Oxidized Multiwalled Carbon Nanotubes: Thermodynamics, Kinetics, and Desorption *ACS Applied Materials and Interfaces* 3 (7): 2585 – 2593.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As atividades humanas provocam um grande impacto nos ecossistemas aquáticos, sendo que, os despejos de efluentes industriais, domésticos e provenientes da agricultura constituem a maior fonte antrópica de compostos químicos que são lançados nos corpos d'água.

Embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, geralmente é apontada como maior contribuinte de todas as categorias de poluentes.

Os organismos aquáticos normalmente estão expostos a misturas de poluentes no meio ambiente, entre eles, carbofurano e nanotubos de carbono, dois compostos amplamente utilizados e que em conjunto apresentam maior toxicidade do que separadamente, caracterizando o efeito sinérgico.

Dessa forma, o monitoramento das substâncias presentes na água precisa levar em consideração não apenas os efeitos nocivos dos compostos presentes separadamente, mas a ação da mistura deles.



## APÊNDICE

ANEXO 1 – Propriedades físico-químicas dos HNO<sub>3</sub>-NTCPM utilizados no trabalho.

Propriedades físico-químicas	HNO <sub>3</sub> -NTCPM	Técnica usada
Diâmetro (nm)	10 - 40	TEM
Comprimento (µm)	< 10	FEG-SEM
Área de superfície (m <sup>2</sup> /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 <sub>D</sub> /I <sub>G</sub> ratio)	1.02	Raman

ANEXO 2 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS CAPÍTULO 1

Por ASSISTAT Versão 7.6 beta (2013).

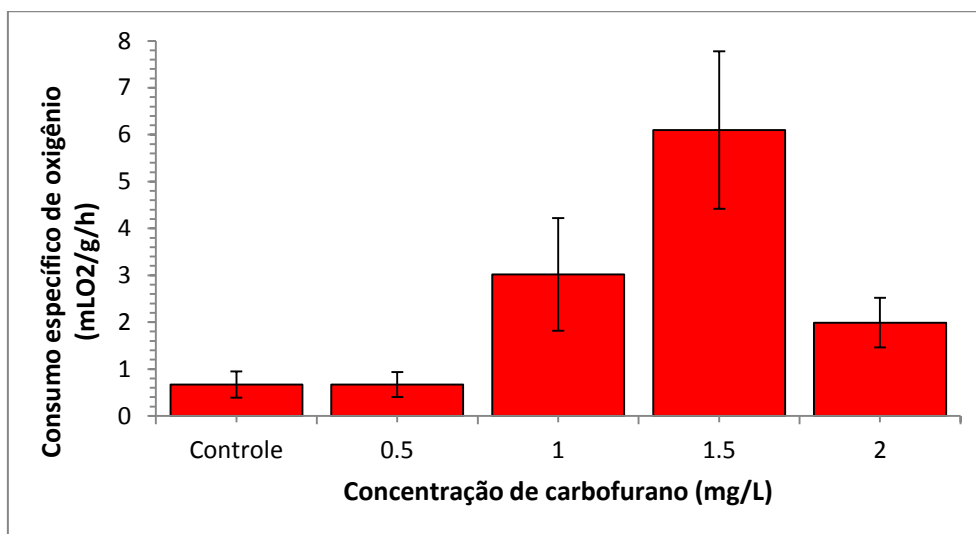


Figura 1 - Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/h) conforme variação na concentração de Carbofurano (mg/L).

QUADRO DE ANÁLISE

-----  
FV      GL      SQ      QM      F  
-----

Tratamentos	4	42.86756	10.71689	12.2729 **
Resíduo	10	8.73213	0.87321	

-----

Total	14	51.59969		
-------	----	----------	--	--

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	10	5.9943	12.2729	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----

1	0.59000	b
2	0.59667	b
3	2.53000	b
4	5.18000	a
5	1.80667	b

-----

dms = 2.51412

MG = 2.14067

CV% = 43.65

Ponto médio = 3.24000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----  
 .28 .67 .82  
 .67 .30 .82  
 3.02 1.32 3.25  
 6.20 3.24 6.10  
 1.21 2.22 1.99  
 -----

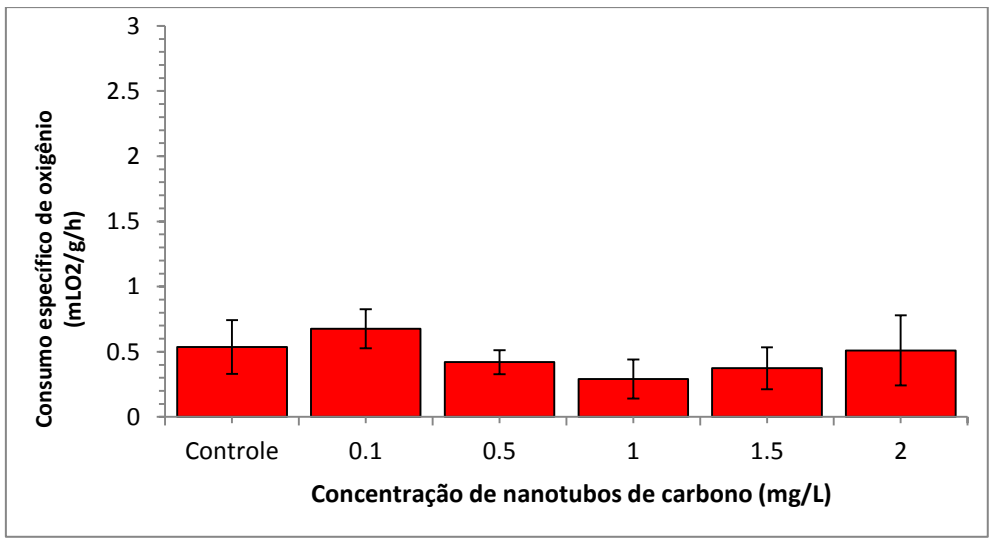


Figura 2 – Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/h) conforme variação na concentração de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L).

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	0.28273	0.05655	2.6253 ns

Resíduo	12	0.25847	0.02154
---------	----	---------	---------

---

Total	17	0.54120
-------	----	---------

---

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
5	12	3.1059	2.6253	0.0793

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

---

1	0.53667 a
2	0.67667 a
3	0.42000 a
4	0.29000 a
5	0.37333 a
6	0.52333 a

---

dms = 0.40248

MG = 0.47000

CV% = 31.23

Ponto médio = 0.54500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----  
 .75 .34 .52  
 .82 .60 .61  
 .34 .52 .40  
 .29 .31 .27  
 .56 .28 .28  
 .32 .70 .55  
 -----

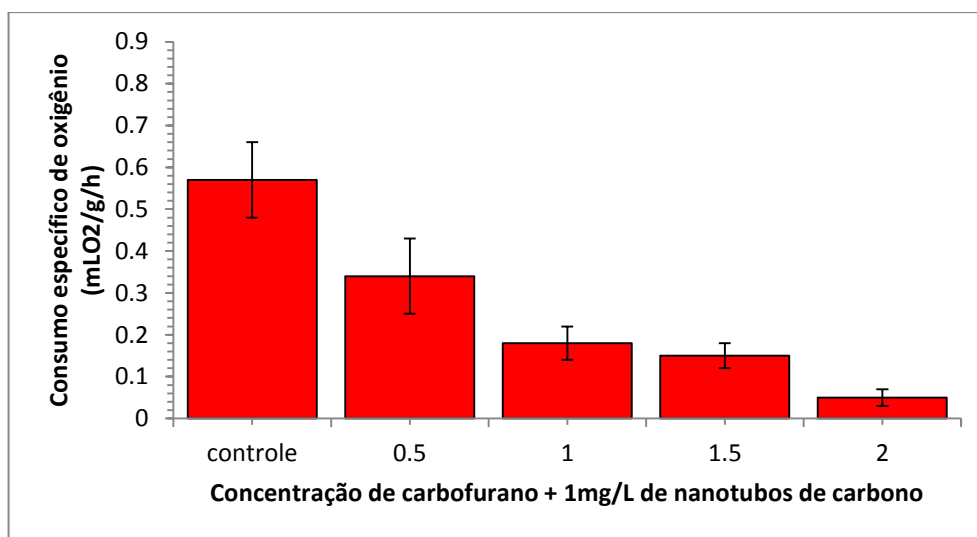


Figura 3 – Consumo específico de oxigênio (mLO<sub>2</sub>/g/h) conforme variação na concentração de carbofurano + 1 mg de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L).

QUADRO DE ANÁLISE

-----  
 FV      GL      SQ      QM      F  
 -----

Tratamentos	4	0.46953	0.11738	16.6265 **
Resíduo	10	0.07060	0.00706	

-----

Total	14	0.54013		
-------	----	---------	--	--

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	10	5.9943	16.6265	<0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----

1	0.55667 a
2	0.34333 ab
3	0.17333 bc
4	0.16000 bc
5	0.05000 c

-----

dms = 0.22606

MG = 0.25667

CV% = 32.74

Ponto médio = 0.39000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----  
 .75 .40 .52  
 .34 .30 .39  
 .18 .14 .20  
 .15 .15 .18  
 .05 .03 .07  
 -----

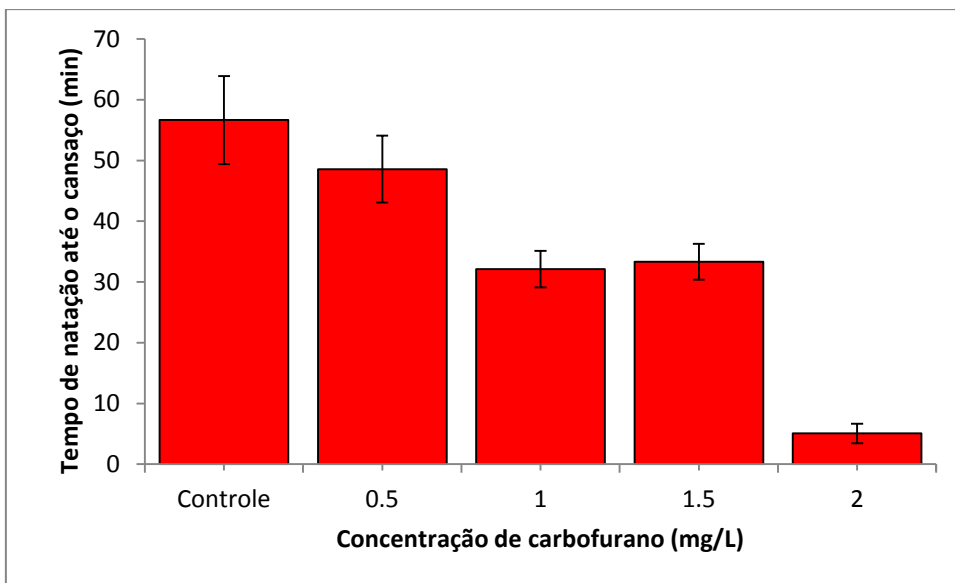


Figura 4 – Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de carbofurano (mg/L) em câmara de natação.

QUADRO DE ANÁLISE

-----  
 FV      GL      SQ      QM      F

Tratamentos	4	4680.92217	1170.23054	29.1039 **
Resíduo	10	402.08760	40.20876	
Total	14	5083.00977		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	10	5.9943	29.1039	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

### Médias de tratamento

1	56.64333 a
2	48.56333 ab
3	32.12667 b
4	33.34000 b
5	5.05000 c

dms = 17.06026

MG = 35.14467

CV% = 18.04

Ponto médio = 34.27000



As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----

45.22	60.45	64.26
43.33	55.81	46.55
29.03	33.84	33.51
27.39	41.10	31.53
4.76	4.28	6.11

-----

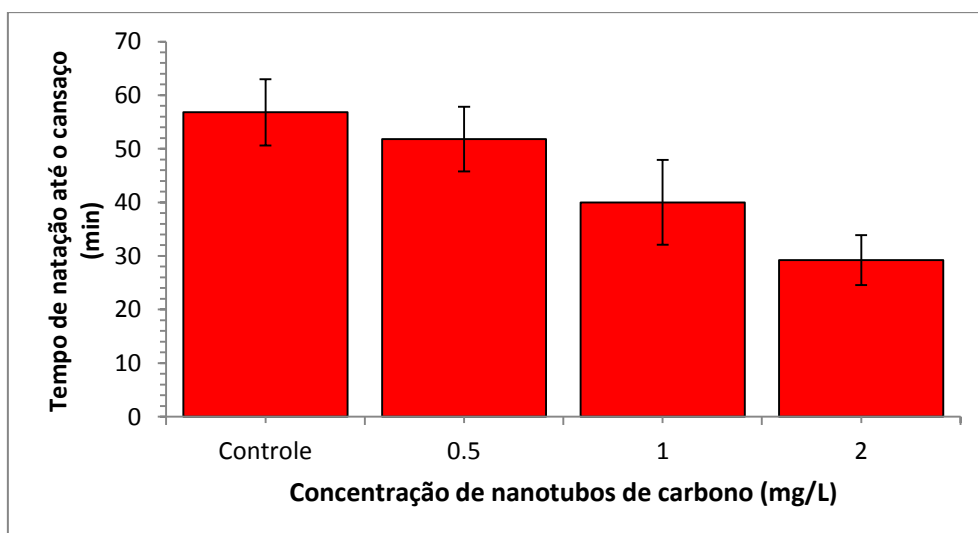


Figura 5 – Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L) em câmara de natação.

QUADRO DE ANÁLISE

-----

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	2294.55000	764.85000	19.2294 **
Resíduo	16	636.40000	39.77500	
Total	19	2930.95000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	16	5.2922	19.2294	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

### Médias de tratamento

1	56.80000 a
2	51.80000 a
3	40.00000 b
4	29.20000 b

dms = 11.42287

MG = 44.45000

CV% = 14.19

Ponto médio = 44.50000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### DADOS

-----  
57 65 49 53 60  
52 60 47 45 55  
40 45 50 35 30  
30 32 25 35 24  
-----

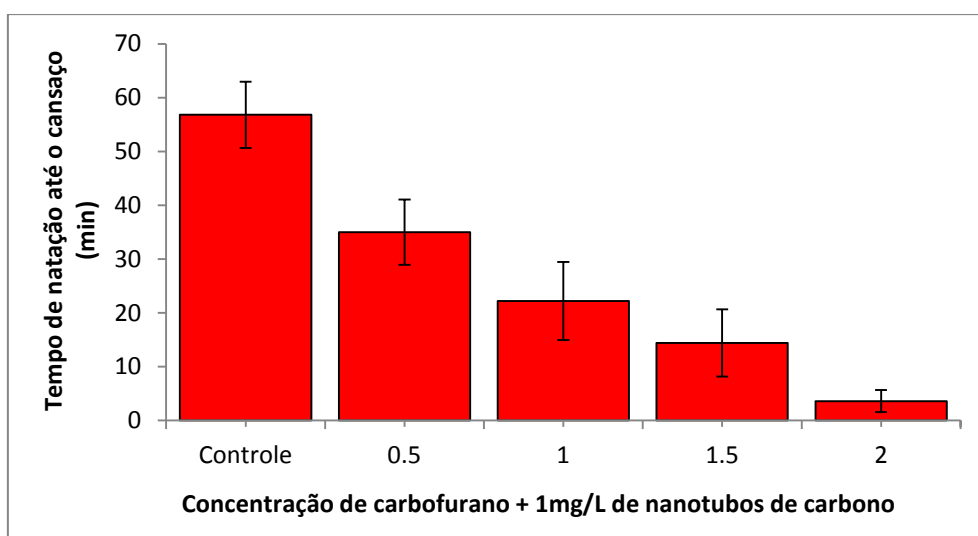


Figura 6 – Tempo de natação até o cansaço (min) conforme variação na concentração de carbofurano e HNO<sub>3</sub>.NTCPM (mg/L) em câmara de natação.

### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----		
1	56.80000	a
2	35.00000	b
3	22.20000	c
4	14.40000	cd
5	3.60000	d

-----  
dms = 11.08904

MG = 26.40000

CV% = 22.15

Ponto médio = 33.00000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

#### DADOS

-----  
57 65 49 53 60  
40 35 30 28 42  
30 25 15 14 27  
20 10 8 22 12  
4 2 1 5 6  
-----

### ANEXO 3 – INCLUSÃO DE TECIDO BRANQUIAL EM PARAFINA

- Os tecidos devem ser desidratados através de imersão numa bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes. A graduação pode ser iniciada a partir de 50% e terminando finalmente em álcool absoluto;
- A inclusão é precedida pelo uso de xilol. Após a remoção do álcool, o tecido passa por uma infiltração em parafina líquida, esta mantida em estufa a 56°C (ponto de fusão) e posteriormente é transferida para o molde contendo parafina líquida. Em poucos minutos a parafina endurecerá e obter-se-á, portanto, o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior;
- Os blocos serão a partir desta etapa levados para a microtomia, e, conseqüente obtenção das secções, que serão então coletadas em lâminas de vidro.

### ANEXO 4 – PROTOCOLOS COLORAÇÃO

#### 1. Hematoxilina e Eosina

Com as laminas montadas e inseridas nas cubas, seguir o procedimento de banhos:

- Xilol I – 30 minutos;
- Xilol II – 30 minutos;
- Álcool absoluto – 5 minutos;
- Álcool 96% – 5 minutos;
- Álcool 70% – 5 minutos;
- Água corrente – 5 minutos;
- Hematoxilina – 1 minuto;
- Água corrente – 5 minutos;
- Eosina – 45 segundos;
- Passar na água corrente rapidamente;

- Álcool 96% rapidamente;
- Álcool absoluto I – 5 minutos;
- Álcool absoluto II – 5 minutos;
- Álcool xilol – 5 minutos;
- Xilol I – 5 minutos;
- Xilol II – 5 minutos;
- Xilol III – 5 minutos;

Colar lamínulas.

## 2. P.A.S

Com as laminas montadas e inseridas nas cubas, seguir o procedimento de banhos:

- Xilol I – 30 minutos;
- Xilol II – 30 minutos;
- Álcool absoluto – 5 minutos;
- Álcool 96% – 5 minutos;
- Álcool 70% – 5 minutos;
- Água corrente – 5 minutos;
- Tratar com ácido periódico – 15 minutos;
- Lavar em água corrente – 5 minutos;
- Tratar pelo reativo de Scheff filtrado – 40 minutos no escuro;
- Lavar em água corrente – 5 minutos;
- Passar pela solução sulfurosa – 3 banhos de 2 minutos cada;
- Passar na água corrente rapidamente;

- Álcool 96% rapidamente;
- Álcool absoluto I – 5 minutos;
- Álcool absoluto II – 5 minutos;
- Álcool xilol – 5 minutos;
- Xilol I – 5 minutos;
- Xilol II – 5 minutos;
- Xilol III – 5 minutos;

Colar lamínulas.

## ANEXO 5 – FIXADOR DE BRÂNQUIAS

1. McDowell gelado:
  - Glutaraldeído 1%;
  - Formol 4% em tampão fosfato pH 7.4
 (McDowell e Trump, 1976).

## ANEXO 6 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO CAPÍTULO 2

Por Assistat 7.6 beta (2013).

### 1. COMPRIMENTOS LAMELAS SECUNDÁRIAS.

- 1.1 Comprimentos das lamelas secundárias, onde 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 8,0; 4,0 e 2,0 mg/L de carbofurano + 1,0 mg/L de nanotubos de carbono e controle.

### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
----	----	----	----	---

Tratamentos	3	86.51561	28.83854	3.9509 *
Resíduo	13	94.88978	7.29921	

-----

Total	16	181.40539		
-------	----	-----------	--	--

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	13	3.4105	3.9509	0.0332

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

1	22.49267 a	nr = 6
2	18.93200 ab	nr = 5
3	18.50050 ab	nr = 2
4	18.78575 b	nr = 4

$$dms = 7.92814 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 19.63294

CV% = 13.76

Ponto médio = 21.38950

### DADOS



-----  
 29.168 20.150 20.087 19.265 22.522 23.764  
 20.796 19.024 18.183 16.992 19.665  
 18.701 18.300  
 19.143 18.340 16.049 13.611  
 -----

1.2 Comprimentos das lamelas secundárias, onde 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 8,0; 4,0 e 2,0 mg/L de carbofurano e controle.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	94.74986	31.58329	6.3984 *
Resíduo	10	49.36119	4.93612	
Total	13	144.11105		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	10	3.7083	6.3984	0.0108

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	23.27025 a	nr = 4
2	18.20375 b	nr = 4
3	18.40150 ab	nr = 2
4	16.78575 b	nr = 4

$$dms = 6.80246 \times \text{RaizQuadrada}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 19.27443

CV% = 11.53

Ponto médio = 20.41450

#### DADOS

```

-----
20.878 21.243 27.218 23.742
19.295 16.361 18.877 18.282
18.603 18.200
19.143 18.340 16.049 13.611
-----

```

1.3 Comprimentos das lamelas secundárias, onde 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem respectivamente a 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de nanotubos de carbono e controle.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	18.01663	4.50416	1.6735 ns
Resíduo	15	40.37075	2.69138	
Total	19	58.38737		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	15	3.0556	1.6735	0.2082

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----

1	17.09225 a	nr = 4
2	17.12500 a	nr = 3
3	18.57920 a	nr = 5
4	15.80300 a	nr = 4
5	16.78575 a	nr = 4

-----

$$dms = 5.06937 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 17.14975

CV% = 9.57

Ponto médio = 17.10350

### DADOS

-----

16.555 18.708 16.284 16.822  
15.984 19.028 16.363  
18.345 17.817 20.596 19.403 16.735  
17.038 15.920 14.287 15.967  
19.143 18.340 16.049 13.611

-----

## 2. LARGURAS LAMELAS SECUNDÁRIAS

2.1– Larguras das lamelas secundárias, onde 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a controle, 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano.

### QUADRO DE ANÁLISE

-----

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	2.11865	0.70622	4.0649 *
Resíduo	10	1.73734	0.17373	
Total	13	3.85599		

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	10	3.7083	4.0649	0.0397

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----

1	2.50900 b	nr = 4
2	3.06150 ab	nr = 2
3	3.06150 ab	nr = 4
4	3.53700 a	nr = 4

-----

$dms = 1.27619 \times \text{RaizQuadrd}(1/nr1 + 1/nr2)$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 3.03950

CV% = 13.71

Ponto médio = 2.83150

#### DADOS

-----  
2.588 3.106 2.643 1.699  
3.000 3.123  
3.134 2.552 3.491 3.069  
3.414 3.381 3.964 3.389  
-----

2.2 Larguras das lamelas secundárias, onde 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a controle, 0,1; 0,5 ;1,0 e 2,0 mg/L de nanotubos de carbono.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1.35620	0.33905	3.0441 ns
Resíduo	13	1.44794	0.11138	
Total	17	2.80414		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	13	3.1791	3.0441	0.0564

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----

1	2.50900 b	nr = 4
2	2.79425 ab	nr = 4
3	3.06800 ab	nr = 4
4	3.26325 a	nr = 4
5	3.09300 ab	nr = 2

-----

$$dms = 1.05250 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 2.92911

CV% = 11.39

Ponto médio = 2.55500

### DADOS

-----  
2.588 3.106 2.643 1.699  
2.613 2.697 2.765 3.102  
3.194 3.262 2.929 2.887  
3.286 3.411 3.294 3.062  
3.321 2.865  
-----

2.3 Larguras das lamelas secundárias, onde 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a controle, 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano + 1,0 mg/L de nanotubos de carbono.

### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	2.13361	0.71120	5.0900 *
Resíduo	13	1.81643	0.13973	
Total	16	3.95004		

-----  
\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	13	3.4105	5.09	0.0151

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----

1	2.50900 ab	nr = 4
2	2.22250 b	nr = 2
3	3.10960 ab	nr = 5
4	3.15533 a	nr = 6

-----

$$dms = 1.09691 \times \text{RaizQuadrada}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem



estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 2.88006

CV% = 12.98

Ponto médio = 2.58150

### DADOS

-----  
 2.588 3.106 2.643 1.699  
 2.000 2.445  
 3.352 3.046 3.035 2.802 3.313  
 3.185 3.251 3.454 2.707 2.871 3.464  
 -----

### 3. CÉLULAS DE CLORETO

3.1– Área média de células de cloreto, onde 1 representa controle e 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	144.76464	48.25488	1.7626 ns
Resíduo	8	219.01520	27.37690	
Total	11	363.77984		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )



3.2 Área média de células de cloreto, onde 1 representa controle e 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de nanotubos de carbono.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	23.34341	7.78114	0.3772 ns
Resíduo	8	165.02152	20.62769	
Total	11	188.36493		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	8	0.069	0.3772	>0.050

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	50.80467 a	nr = 3
2	52.61633 a	nr = 3
3	51.16833 a	nr = 3
4	54.34500 a	nr = 3

$$dms = 14.54818 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 52.23358

CV% = 8.70

Ponto médio = 51.27250

#### DADOS

```

-----
44.376 57.807 50.231
48.398 51.282 58.169
50.796 53.809 48.900
54.036 52.099 56.900
-----

```

3.3 Área média de células de cloreto, onde 1 representa controle e 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano + 1,0 mg/L de nanotubos de carbono.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	141.11491	47.03830	1.3402 ns
Resíduo	11	386.08137	35.09831	
Total	14	527.19628		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	11	3.5874	1.3402	0.3114

## MÉDIAS E MEDIDAS

### Médias de tratamento

---

1	50.80467 a	nr = 3
2	55.58733 a	nr = 3
3	59.85950 a	nr = 4
4	55.59380 a	nr = 5

---

$$dms = 17.84587 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 55.77220

CV% = 10.62

Ponto médio = 55.17700

## DADOS

---

44.376 57.807 50.231  
55.897 53.187 57.678  
53.079 65.978 65.247 55.134  
50.956 50.124 53.114 59.280 64.495

---

3.4– Densidade das células de cloreto, onde 1 representa controle e 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano.

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	11607.95000	3869.31667	336.9507 **
Resíduo	12	137.80000	11.48333	
Total	15	11745.75000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	12	5.9525	336.9507	<0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

1	29.50000	c	nr = 4
2	46.00000	b	nr = 3
3	50.00000	b	nr = 4
4	97.20000	a	nr = 5

$$dms = 10.06395 \times \text{RaizQuadrada}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 58.87500

CV% = 5.76

Ponto médio = 65.00000

### DADOS

-----  
30 32 27 29  
44 46 48  
47 53 50 50  
90 103 100 98 95  
-----

3.5– Densidade das células de cloreto, onde 1 representa controle e 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de nanotubos de carbono e 1,0 mg/L de nanotubos de carbono.

### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	8852.43750	2950.81250	202.3414 **
Resíduo	12	175.00000	14.58333	
Total	15	9027.43750		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	12	5.9525	202.3414	<0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----  
1 29.50000 d nr = 4  
2 56.00000 c nr = 3

3	72.00000	b	nr = 4
4	91.00000	a	nr = 5

-----  
 $dms = 11.34130 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$

Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 64.31250

CV% = 5.94

Ponto médio = 61.50000

#### DADOS

-----  
 30 32 27 29  
 53 55 60  
 67 70 76 75  
 85 89 90 95 96  
 -----

#### 4. CÉLULAS DE MUCOSA

4.1– Área média de células de mucosa, onde 1 representa o controle, e,  
 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de  
 carbofurano.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	60.79130	20.26377	3.8237 ns
Resíduo	9	47.69610	5.29957	



-----  
Total      12      108.48740  
-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	9	3.8625	3.8237	0.0512

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----  
1    18.74100 a      nr = 3  
2    16.66933 a      nr = 3  
3    17.12367 a      nr = 3  
4    21.91400 a      nr = 4  
-----

dms = 7.19494 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 18.86600

CV% = 12.20

Ponto médio = 18.48050

### DADOS

-----  
20.808 16.526 18.889

16.404 14.997 18.607  
 13.460 17.898 20.013  
 20.356 23.501 20.390 23.409

4.2– Área média de células de mucosa, onde 1 representa o controle, e, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de nanotubos de carbono.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	764.57150	254.85717	5.5213 *
Resíduo	8	369.27060	46.15882	
Total	11	1133.84210		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	8	4.0662	5.5213	0.0238

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	18.74100	b	nr = 3
2	24.34200	ab	nr = 3
3	29.44533	ab	nr = 3
4	40.40467	a	nr = 3

dms =  $21.76259 \times \text{RaizQuadr}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de



\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	10	0.069	0.8743	>0.050

### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias de tratamento

-----

1	18.74100 a	nr = 3
2	16.61400 a	nr = 3
3	18.94900 a	nr = 4
4	21.24425 a	nr = 4

-----

$$dms = 11.55930 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 19.05986

CV% = 19.81

Ponto médio = 19.89350

#### DADOS

-----  
20.808 16.526 18.889  
16.820 14.235 18.787  
25.340 14.506 16.692 19.258  
15.276 21.186 25.552 22.963  
-----

4.3- Densidade de células de mucosa, onde 1 representa o controle, e, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	104.00000	34.66667	21.1852 **
Resíduo	11	18.00000	1.63636	
Total	14	122.00000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )



## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	9625.56667	3208.52222	1032.9876 **
Resíduo	11	34.16667	3.10606	
Total	14	9659.73333		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	11	6.2167	1032.9876	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

### Médias de tratamento

1	18.00000	c	nr = 4
2	60.33333	b	nr = 3
3	76.75000	a	nr = 4
4	79.25000	a	nr = 4

$$dms = 5.30884 \times \text{RaizQuadr}(1/nr1 + 1/nr2)$$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 58.46667

CV% = 3.01

Ponto médio = 48.00000

#### DADOS

-----  
17 19 20 16  
58 60 63  
75 79 77 76  
78 79 80 80  
-----

4.5- Densidade de células de mucosa, onde 1 representa o controle, e, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L de carbofurano com 1 mg/L de nanotubos de carbono.

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	20.08333	6.69444	3.7077 *
Resíduo	12	21.66667	1.80556	
Total	15	41.75000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	12	3.4903	3.7077	0.0426

#### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----  
1 18.00000 a nr = 4



2	16.33333 ab	nr = 3
3	16.50000 ab	nr = 4
4	15.00000 b	nr = 5

-----