

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

TOXICIDADE E RISCOS ECOLÓGICOS DAS TINTAS  
ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO:  
TOXICIDADE E EFEITOS DA DICLOFLUANIDA SOBRE  
ORGANISMOS MARINHOS

ANA CAROLINA FEITOSA CRUZ

SÃO VICENTE - SP

2019

ANA CAROLINA FEITOSA CRUZ

# Toxicidade e efeitos da diclofluanida sobre organismos marinhos

Tese submetida ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de biodiversidade aquática, pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Co-orientador: Prof. Dr. Ítalo Braga de Castro

São Vicente

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus do Litoral Paulista



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Toxicidade e riscos ecológicos das tintas anti-incrustantes de terceira geração

AUTORA: ANA CAROLINA FEITOSA CRUZ

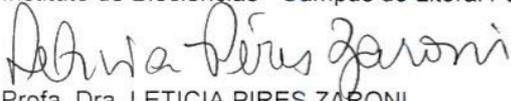
ORIENTADOR: DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

COORIENTADOR: ÍTALO BRAGA DE CASTRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA  
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Profa. Dra. LETICIA PIRES ZARONI  
Departamento de Oceanografia Biológica / Universidade de São Paulo



Dr. BAUER RODARTE DE FIGUEREDO RACHID  
Fundação de Estudos e Pesquisas Aquáticas - FUNDESPA



Professor Doutor RONALDO JOSÉ TORRES  
Ciências do Mar / UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DE SÃO PAULO



Prof. Dr. FABIO HERMES PUSCEDDU  
Ecotoxicologia / Universidade Santa Cecília

São Vicente, 14 de janeiro de 2019

C957t

Cruz, Ana Carolina Feitosa

Toxicidade e riscos ecológicos das tintas anti-incrustantes de terceira geração : Toxicidade e efeitos da diclofluanida sobre organismos marinhos / Ana Carolina Feitosa Cruz. -- São Vicente, 2019

125 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

Coorientador: Ítalo Braga de Castro

1. Testes ecotoxicológicos. 2. Biomarcadores. 3. Tintas anti-incrustantes. 4. Diclofluanida. 5. Organismos marinhos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde para conseguir seguir por todos os caminhos a que sempre quis. Ao meu anjinho da guarda por sempre estar comigo iluminando os meus caminhos e me protegendo.

Agradeço ao meus pais, Mauro e Vanda, por me amarem incondicionalmente e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões. Sem vocês jamais teria chegado onde cheguei. Deixo aqui mais uma vez o meu muito obrigada e aquilo que nunca cansarei de dizer: AMO MUITO VOCÊS. Ao meu irmão que mesmo estando longe, sempre está por perto, com palavras sábias e aquele que sempre pude recorrer nos momentos de tristeza ou de alegria. Meu porto seguro.

Aos meus amigos que me aguentaram esses quatro anos e também sempre me apoiaram muito: Anak (minha parceira de todas as horas mesmo...Risadas e lágrimas sempre foram confidenciadas entre nós), Cabelão, Wal, Ana P., Mo, Robertinha e a todos aqueles que fizeram parte desta minha jornada. Aos amigos que conquistei na Yôga em especial a Thayza e Tássia minhas instrutoras da vida a quem sempre com simples gestos e palavras me motivaram e me fizeram sentir bem para seguir em frente. Aos meus novos amigos do Crossfit, aqueles que convivo diariamente, em especial as minhas novas parceiras e sócias Amandinha e Karlinha. Todos vocês estão aqui guardadinhos no meu coração.

Agradeço a todos os meus colegas do NEPEA, UNISANTA e UNIFESP. Em especial a Guacira por ser essa pessoa especial que esteve ao meu lado em todos os momentos e que sempre me ajudou em todos os sentido, quer seja no laboratório quer seja na vida. Também gostaria de agradecer ao Sinhá, Fefo, Lu, Paloma, Ita, Professora, Dama, Gabi, Meti, Isa, Rabicó, Binho, Caio, Bea, Ney, Lucas, Geléia, Bodeia e Thierry. Agradeço ao meu co-orientados Prof. Dr. Ítalo Braga. Agradeço também a banca por me ajudar a enriquecer a tese.

Agradeço também aos funcionários da UNESP sempre muito prestativos e prontos para ajudar: As técnicas do laboratório (em especial para Lu e Marcia), Hanna, Fabi, Gabriel, Denise, Valdete, Conceição, enfim... a todos esses profissionais competentes do UNESP CLP.

E por ultimo, mas sem dúvida nenhuma não menos importante ao meu orientador Denis, que nesses nove anos foi orientador, foi amigo, foi confidente, foi paciente, foi parceiro. Aquela pessoa que também podia contar a qualquer momento. Aceite o meu muito obrigada por me trazer de volta a biologia e me fazer sentir especial dentro de um grupo de pesquisas.

**“AMIGOS SÃO AQUELES QUE AJUDAM A NOS COLOCAR EM PÉ  
QUANDO NOSSAS ASAS ESQUECEM COMO VOAR.”**

**“A vida me ensinou que chorar alivia,  
mas sorrir torna tudo mais bonito”**

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xii
Apêndices .....	xiv
Resumo.....	16
Abstract.....	17
<b>Capítulo 1 - Introdução Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 2 - Ecotoxicological approach.....</b>	<b>26</b>
<u>Abstract</u> .....	26
<u>1. Introduction</u> .....	27
<u>2. Materials and methods</u> .....	29
<u>2.1. Toxicity tests with aqueous solutions</u> .....	29
<u>2.1.1. Embryo-larval test – <i>Echinometra lucunter</i></u> .....	30
<u>2.1.2. Fertility test – <i>Nitocra</i> SP.</u> .....	30
<u>2.2. Toxicity tests with spiked sediments</u> .....	31
<u>2.2.1. Sedimentological analyses</u> .....	31
<u>2.2.2. Spiked Sediments</u> .....	32
<u>2.2.3. Mortality test – <i>Tiburonella viscana</i></u> .....	33
<u>2.2.4. Fertility test – <i>Nitocra</i> sp.</u> .....	33
<u>2.3. Statistical and Exploratory Analyses</u> .....	33
<u>2.3. Statistical and Exploratory Analyses</u> .....	33
<u>3. Results and discussion</u> .....	34
<u>3.1. Toxicity tests aqueous solutions</u> .....	34
<u>3.2. Toxicity tests with spiked sediments</u> .....	38
<u>3.2.1. Sedimentological analyses</u> .....	38
<u>3.3.2. Toxicity Tests</u> .....	40
<u>4. Conclusion</u> .....	43

5. Appendix.....	44
<b>Capítulo 3 – Biomarcadores.....</b>	<b>54</b>
Resumo.....	54
1. Introdução.....	55
2. Materiais e Métodos.....	58
2.1. Exposição subcrônica.....	58
2.2. Análise sedimentológica.....	59
2.3. Contaminação dos Sedimentos.....	60
2.4. Biomarcadores.....	61
Biomarcadores Bioquímicos.....	61
2.5. Forma de Análise dos Resultados.....	64
2.5. Forma de Análise dos Resultados.....	64
3. Resultados e discussão.....	65
3.1. Exposição em água.....	65
3.2. Exposição sedimento.....	77
4. Conclusão.....	92
5. Apêndices.....	93
<b>Capítulo 4 - Conclusão Final.....</b>	<b>111</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>113</b>
<b>Referências.....</b>	<b>114</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AChE** - Acetilcolinesterase

**ANOVA** – Análise de Variância

**CENO** – Concentração de Efeitos Não Observado

**CEO** – Concentração de Efeito Observado

**COE** – Composto Organoestânico

**DBF** - Dibenzilfluoresceína

**Diclofluanida** - N-diclorofluorometiltio-N', N'-dimetil-N-fenilsulfamida

**DMSA** - N,N-Dimetilaminossulfanilida

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EC<sub>50</sub>** – Effect Concentration to 50% of the organisms

**CE<sub>50</sub>** - Concentração de Efeito a 50% dos organismos

**EC<sub>10</sub>** – Effect Concentration to 10% of the organisms

**CE<sub>10</sub>** - Concentração de Efeito a 10% dos organismos

**EROD** – Etoxiresorufin O-deetilase

**GPx** – Glutathione Peroxidase

**GSH** – Glutathione Reduzida

**GST** – Glutathione S-transferase

**IMO** – International Maritime Organization

**Kow** – Coeficiente de Partição octanol/água

**MO** – Matéria Orgânica

**NOEC** – No observed effect concentration

**LOEC** – Lowest observed effect concentration

**SE** – Solução Estoque

**TBARS** – Substâncias Reativas de Tiobarbitúricos

**TBT** – Tributilestanho

**TPhT** – Trifenilestanho

**TRCVN** – Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

## Lista de Figuras

- Fig 1. Estrutura molecular 2D da Diclofluanida.....22
- Fig 2. Percent of abnormal embryo-larval development of *Echinometra lucunter* exposed to different concentrations of diclofluanid (ANOVA,  $p < 0.0001$ ). \* = statistically significant difference with the acetone control ( $p < 0.05$ ). The error bars show the respective standard deviations.....34
- Fig 3. Results of the toxicity tests with aqueous solutions of dichlofluanid and the copepod *Nitocra* sp. 3A: results for concentrations in ng/l (ANOVA,  $p = 0.3236$ ). 3B-3D: Offspring (nauplii and copepodites) produced in concentrations of diclofluanid in  $\mu\text{g/l}$  (figure 3B: ANOVA,  $p = 0.0004$ ; Figure 3C: ANOVA,  $p = 0.0016$ , Figure 3D: ANOVA,  $p < 0.0001$ ; \* statistically significant difference with the acetone control ( $p < 0.05$ ). The error bars show the respective standard deviations.....36
- Fig 4. Grain size distribution in the three sediments collected in the Cananéia – SP and used in toxicity tests with dichlofluanid.....39
- Fig 5. *Nitocra* sp. fecundity in sediments spiked with dichlofluanid and containing high and low concentrations of organic matter. (two way ANOVA - interaction,  $p = 0.1864$ ). .....40
- Fig 6. Survival of adults of *Tiburionella viscana* at different concentrations of dichlofluanid in sediments containing high and low amounts of organic matter (High OM and Low OM respectively). The error bars show the respective standard deviations (two way ANOVA - interaction,  $p = 0.0008$ ). .....41
- Fig 7. Taxa de mortalidade de *Perna perna* ao longo das 96 horas de exposição.....65
- Fig 8. Tempo de retenção do vermelho neutro para 48 horas e 96 horas de exposição de organismos da espécie *Perna perna* em diferentes concentrações de diclofluanida, expressas em  $\mu\text{g/L}$  (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Letras representam diferença estatística significativa com o controle acetona ( $p < 0,05$ ). As barras de erros mostram os respectivos desvios-padrão. C= controle e C\*=controle acetona 0,05%. .....66
- Fig 9. Respostas de biomarcadores de exposição em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Perna perna*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75; a linha dentro do box splot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferença significativa quando comparado com o controle acetona ( $p = 0,05$ ). Fig 9.a. ANOVA,  $p = 0,0103$ ; Fig. 9.b. ANOVA,  $p = 0,0005$ ; Fig. 9.c. ANOVA,  $p = 0,0002$ ; Fig. 9.d. ANOVA,  $p = 0,0013$ ; Fig.

9.e. Kruskal Wallis,  $p < 0,0001$ ; Fig. 9.f. ANOVA,  $p = 0,2299$ ; Fig. 9.g. ANOVA,  $p = 0,0028$ ; Fig. 9.h. ANOVA,  $p = 0,7243$ ; Fig. 9.i. ANOVA,  $p = 0,0005$ ; Fig. 9.j. ANOVA,  $p = 0,0043$ . 69

Fig 10. Respostas de biomarcadores de efeitos em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Perna perna*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75. A linha dentro do box plot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferenças significativas com o controle acetona ( $p = 0,05$ ). Fig. 10.a. ANOVA,  $p = 0,0027$ ; Fig. 10.b. ANOVA,  $p = 0,3107$ ; Fig. 10.c. ANOVA,  $p = 0,0296$ ; Fig. 10.d. ANOVA,  $p = 0,1856$ ; Fig. 10.e. ANOVA,  $p = 0,0002$ ; Fig. 10.f. ANOVA,  $p = 0,0004$ . 70

Fig 11. Projeção das variáveis num plano formado pelos fatores 1 e 2. 73

Fig 12. Projeção das distâncias euclidianas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando em conta todos os biomarcadores analisados em brânquias. 74

Fig 13. Projeção das distâncias euclidianas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando em conta todos os biomarcadores analisados em glândula digestiva. 75

Fig 14. Distribuição granulométrica nos sedimentos coletados em Cananéia - SP e utilizados nas exposições de sedimentos contaminados testes com diclofluanida. 78

Fig 15. Taxa de mortalidade do bivalve *Anomalocardia flexuosa* ao longo de 21 dias de experimento para sedimento pobre em matéria orgânica. 79

Fig 16. Respostas de biomarcadores de exposição em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Anomalocardia flexuosa*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75; a linha dentro do box plot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferença significativa quando comparado com o controle acetona considerando uma determinada concentração de matéria orgânica. As letras indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações de matéria orgânica levando em consideração a mesma concentração de diclofluanida ( $p = 0,05$ ). High MO = Rico em Matéria orgânica; Low MO = Pobre em Matéria orgânica. Fig 16.a. ANOVA,  $p = 0,0035$ ; Fig. 16.b. ANOVA,  $p < 0,0001$ ; Fig. 16.c. ANOVA,  $p < 0,0001$ ; Fig. 16.d. ANOVA,  $p = 0,0057$ ; Fig. 16.e. PERMANOVA,  $p = 0,001$ ; Fig. 16.f. ANOVA,  $p < 0,0001$ ; Fig. 16.g. PERMANOVA,  $p = 0,001$ ; Fig. 16.h. PERMANOVA,  $p = 0,001$ ; Fig. 16.i. ANOVA,  $p = 0,0089$ ; Fig. 16.j. ANOVA,  $p = 0,3946$ . 81

- Fig 17. Respostas de biomarcadores de efeitos em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Perna perna*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75. A linha dentro do box plot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferenças significativas com o controle acetona considerando uma determinada concentração de matéria orgânica. As letras indicam diferença significativa entre as diferentes concentração de matéria orgânica levando em consideração a mesma concentração de diclofluanida ( $p = 0,05$ ). High MO = Rico em Matéria orgânica; Low MO = Pobre em Matéria orgânica. ANOVA de duas vias: Fig. 17.a.  $p < 0,0001$ ; Fig. 17.b.  $p < 0,0001$ ; Fig. 17.c.  $p = 0,5284$ ; Fig. 17.d.  $p = 0,0170$ ; Fig. 17.e.  $p < 0,0001$ ; Fig. 17.f.  $p < 0,0001$ . .....82
- Fig 18. Projeção das variáveis num plano formado pelos fatores 1 e 2. ....85
- Fig 19. Projeção das distâncias euclidianas das réplicas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando-se em conta todos os biomarcadores analisados na brânquia. Fig 19a. Projeção das réplicas levando em conta a contração de matéria orgânica dos sedimentos; Fig 19b. Projeção das réplicas levando em consideração as concetrações de diclofluanida. ....87
- Fig 20. Projeção das distâncias euclidianas das réplicas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando-se em conta todos os biomarcadores analisados na glândula digestiva. Fig 20a. Projeção das réplicas levando em consideração as concetrações de diclofluanida; Fig 20b. Projeção das réplicas levando em conta a concentração de matéria orgânica dos sedimentos. ....89

## Lista de Tabelas

Tab 1. Percentages of organic matter (OM), Calcium Carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and dry sediment in the different sediments collected in the Cananéia – SP. ....	39
Tab 2. Resultados do PCA integrando todos os biomarcadores realizados nas exposições com diferentes concentrações de diclofluanida em água. (* indica correlação significativa dentro da respectiva componente principal. Br = Brânquias; GD = Glândula Digestiva; NR = Vermelho Neutro. ....	72
Tab 3. . Escores fatoriais do tempo inicial, do controle, controle analítico e das concentrações de diclofluanida em 96 horas nas exposições em água (Concentrações expressas em $\mu\text{g/L}$ ). ....	72
Tab 4. Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pela distancia euclidiana para as brânquias levando em consideração todos os biomarcadores analisados. ....	74
Tab 5. Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pela distancia euclidiana para as glândulas digestivas levando em consideração todos os biomarcadores analisados. ....	75
Tab 6. Porcentagens de matéria orgânica (MO), Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e porcentagem de peso seco após secagem em estufa dos sedimentos coletados em Cananéia – SP. ....	78
Tab 7. Resultados do PCA integrando todos os biomarcadores realizados nas exposições com diferentes concentrações de diclofluanida em sedimento com duas matrizes com concentrações de material orgânica diferentes. (* indica correlação significativa dentro da respectiva componente principal. Br = Brânquias; GD= Glândula digestiva; R = Rico em material orgânica; P = Pobre em material orgânica. ....	84
Tab 8. Escores fatoriais do tempo inicial, controle, branco analítico e das concentrações de diclofluanida nas exposições em sedimento (Concentração dada em $\text{ng/g}$ ). ....	85
Tab 9. Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pelas distâncias euclideanas para as brânquias levando em consideração os biomarcadores analisados. ....	87

Tab 10. Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pelas distâncias euclidianas para as glândulas digestivas levando em consideração os biomarcadores analisados. ....89

Tab 11. Tabela de efeitos da diclofluanida para os diferentes "endpoints" testados. Verde: não indica efeito; Amarelo: indica efeitos brandos; Vermelho: efeito pronunciado. NT = Não Testado. ....111

## Apêndices

Ap A. Fecundity of <i>Nitocra</i> sp. in sediments rich with organic matter and poor in organic matter when compared with the reference sediment of Ilhabela. (ANOVA, $p= 0.0536$ ).	44
Ap B. Physical-chemical parameters presented for <i>Nitocra</i> sp. tests with environmental sediments collected. DO = Dissolved oxygen; OM = Organic Matter.	45
Ap C. Physical-chemical parameters presented for the <i>Echinometra lucunter</i> test. Diclofluanid concentrations expressed in $\mu\text{g/l}$ . DO = Dissolved Oxygen.	46
Ap D. Physica-chemical parameters of the dilution water and dichlofluanid concentrations for the <i>Nitocra</i> sp. test. (Test 1: $\text{ng/l}$ ; Tests 2, 3 and 4: $\mu\text{g/l}$ ). DO = Dissolved Oxygen.	47
Ap E. Chemical physical parameters of the <i>Nitocra</i> sp. to different concentrations of dichlofluanid and organic matter (OM). Sample concentrations are in $\text{ng/g}$ . DO = Dissolved Oxygen.	50
Ap F. Physical chemical parameters of <i>Tiburonella viscana</i> amphipod exposure experiments at different concentrations of dichlofluanid and organic matter (OM). Sample concentrations are in $\text{ng/g}$ . DO = Dissolved Oxygen.	52
Ap G. Parâmetros físico-químicos do cultivo de <i>Perna perna</i> da praia da Cocanha, Caraguatatuba, litoral norte de São Paulo.	93
Ap H. Parâmetros físico-químicos apresentados para a exposição de <i>Perna perna</i> . Concentrações de diclofluanida expressas em $\mu\text{g/L}$ .	93
Ap I. Resultados adicionais da PCA realizada para o experimento realizado em água com <i>Perna perna</i> .	94
Ap J. Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em água com <i>Perna perna</i> em tecidos brânquiais.	96
Ap K. Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em água com <i>Perna perna</i> em glândulas digestivas.	97
Ap L. Média dos parâmetros físico químicos do teste com <i>Anomalocardia flexuosa</i> . OD = Oxigênio Dissolvido.	98
Ap M. Resultados adicionais da PCA realizada para o experimento realizado em sedimento com <i>Anomalocardia flexuosa</i> .	101

Ap N. Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em sedimentos com <i>Anomalocardia flexuosa</i> em brânquias.....	102
Ap O. Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em sedimentos com <i>Anomalocardia flexuosa</i> em brânquias.....	106

## Resumo

Centenas de compostos são detectados nos diferentes compartimentos ambientais podendo ser de origem natural ou antrópica. Em muitos casos, pouco se sabe a respeito desses compostos, não havendo regulações sobre seu uso, e por isso são denominados compostos de interesse emergente. Dentre eles podem ser citados os biocidas das tintas anti-incrustantes. Tais tintas são utilizadas para proteger e combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes sobre superfícies expostas à água do mar. Elas são aplicadas em diversas estruturas, tais como embarcações, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura, entre outras. Assim, essas tintas são utilizadas com o intuito de preservar as estruturas, bem como, a manter a navegabilidade, no caso das embarcações. O composto de interesse para este estudo é um dos biocidas utilizados nas tintas anti-incrustantes, a diclofluanida. Devido as suas características físico-químicas, parte da diclofluanida liberada na coluna d'água tenderá a adsorver ao material particulado e se depositará nas camadas sedimentares. Desta forma este estudo teve o objetivo de avaliar a toxicidade e efeitos subcrônicos da diclofluanida em exposições realizadas em água e sedimento com espécies marinhas. Além disso, experimentos utilizando sedimento também tiveram o objetivo de comparar a influência de diferentes concentrações de matéria orgânica sobre a toxicidade de sedimentos contendo diclofluanida. Para os testes ecotoxicológicos em água foram utilizados embriões do ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* e fêmeas ovígeras do copépodo *Nitocra* sp. Já os testes em sedimento foram conduzidos com o copepódo *Nitocra* sp. e com o anfípodo *Tiburonella viscana*. No teste de exposição subcrônica à soluções aquosas foram utilizados bivalves da espécie *Perna perna*, e para sedimentos fortificados foram usados bivalves adultos de *Anomalocardia flexuosa*. Em seguida, foi realizada a técnica da retenção do vermelho neutro (apenas para *P. perna*), sendo também analisados o dano em DNA, teores de LPO, GSH, e atividades de GST, EROD, AChE e GPx para ambas as espécies. Para os sedimentos também foram realizadas as análises granulométricas, teor de carbonato de cálcio e de matéria orgânica. Nos testes ecotoxicológicos com soluções aquosas, os níveis tóxicos foram superiores às concentrações ambientais. Embriões de *E. lucunter* apresentaram maiores porcentagens de larvas anormais a partir da concentração de 1 µg/l, que foi a menor concentração de efeito observado (CEO); a Concentração Efeito Não Observado (CENO) foi de 0,1 µg/l. A CE<sub>50</sub>-40h foi de 198,5 µg/l e CE<sub>10</sub>-40h foi de 0,3577 µg/l. Nos testes com *Nitocra* sp., a CEO foi de 100 µg/l e a CENO foi de 10 µg/l. A CE<sub>10</sub>-7d foi de 0,0635 µg/l enquanto a CE<sub>50</sub>-7d foi de 583,83 µg/l. Nos testes de sedimento, as concentrações testadas não foram tóxicas ao copépodo *Nitocra* sp., e as fecundidades foram semelhantes quando comparados os dois tipos de sedimentos. Para *T. viscana* as taxas de mortalidade aumentaram 40% na concentração de 1000 ng/g e 30% na concentração de 10000 ng/g. Ao comparar os dois sedimentos, a maior diferença entre as mortalidades foi observada em 1000 ng/g, sugerindo que há uma influência da matéria orgânica na toxicidade da Diclofluanida. Essas investigações mostram que a diclofluanida mostra-se tóxica aos invertebrados marinhos e que, nos sedimentos, sua toxicidade pode ser influenciada pelo nível de matéria orgânica. Para as exposições subcrônicas em água, foi possível observar efeito nas maiores concentrações no vermelho neutro denotando perda da estabilidade lisossômica. Para os biomarcadores também foi possível observar alterações nas glândulas digestivas e brânquias. Para

sedimento é possível prever efeito em ambos os órgãos internos e há um incremento dos efeitos nos sedimentos com maiores teores de matéria orgânica. No presente estudo foi possível constatar que o diclofluanida foi responsável por gerar respostas em todos os ensaios de toxicidade realizados em água e apenas um efeito agudo no sedimento com alto teor de matéria orgânica. Os dados de biomarcadores corroboram com os testes de toxicidade. Em água é possível observar um efeito aos organismos nas maiores concentrações testadas e em sedimento é possível observar um aumento de efeito nos organismos nos sedimentos ricos em matéria orgânica.

Palavras chave: Diclofluanida, sedimento, água, biomarcadores, testes ecotoxicológicos.

## Abstract

Hundreds of compounds have been detected in different environmental compartments, which may be natural or anthropogenic origin. In many cases, little is known about these compounds, thus there is not regulations for them, leading them be considered effective contaminants and so are called emerging. Among these compounds can be cited the biocides of antifouling paints. They are used to protect and combat the formation and establishment of biofouling communities on surfaces exposed to seawater. They are applied in various structures, such as vessels, oil platforms, submarine pipelines, tanks for aquaculture, among others. Thus, these paints are used with the intention of preserving the structures, as well as maintaining navigability in the case of vessels. The compound of interest for this study is one of the biocides used in antifouling paints, dichlofluanid. Due to its physico-chemical characteristics, part of the dichlofluanid released in the water column tended to adsorb to the particulate material and then deposit in the sedimentary layers. In this way, this study aimed to evaluate the toxicity and subchronic effects of dichlofluanid exposures, after in water and sediment with marine species. In addition, sediment experiments also aimed to evaluate how different concentrations of organic matter in the sediments could influence on their responses. Embryos of the sea urchin *Echinometra lucunter* and ovigerous females of the copepod *Nitocra* sp for the ecotoxicological tests in water. The sediment tests were conducted with the copepod *Nitocra* sp. and with the amphipod *Tiburonella viscana*. For the exposure tests in water were used bivalves of the species *Perna perna* and for sediment with bilvalves of *Anomalocardia flexuosa*. Then, the neutral red retention technique was applied only to *P. perna* and DNA damage, LPO, GSH, GST, EROD, AChE and GPx for both species. For the sediments were also carried out the granulometric analyzes, calculation of the content of carbonates and organic matter. In ecotoxicological tests with aqueous solutions, the toxic levels were higher than the environmental concentrations. Embryos of *E. lucunter* presented higher percentages of abnormal larvae from the concentration of 1 µg/l, which was the lowest observed effect concentration (LOEC); the No Observed Effect Concentration (NOEC) was 0.1 µg/l. EC<sub>50-40h</sub> was 198.5 µg/l and EC<sub>10-40h</sub> was 0.3577 µg/l. In the *Nitocra* sp. Tests, LOEC was 100 µg/l and NOEC was 10 µg/l. EC<sub>10-7d</sub> was 0.0635 µg/l while EC<sub>50-7d</sub> was 583.83 µg/l. In the sediment tests, the concentrations tested were not toxic to the *Nitocra* sp and the copepod fecundities were similar when compared the two sediment types. For *T. viscana*, mortality rates increased by 40% at the concentration of 1000 ng/g and 30% at the concentration of

10000 ng/g. When comparing the two sediments, the greatest difference between mortalities was observed at 1000 ng/g, suggesting that there is an influence of organic matter on the toxicity of Diclofluanid. These investigations show that diclofluanid is toxic to marine invertebrates and that, in sediments, its toxicity can be influenced by the level of organic matter. For the subchronic exposures in water, it was possible to observe effect in the higher concentrations in the neutral red denoting loss of the lysosomal stability. For the biomarkers it was also possible to observe changes in the glands and digestive gills. For sediment it is possible to predict effect in both organs as well, and there is an increase in effects on sediments with higher organic matter contents. In the present study it was possible to verify that dichlofluanid was responsible for generating responses in all toxicity tests performed in water and only an acute effect on the sediment with high organic matter content. Biomarker data corroborate with toxicity tests. In water it is possible to observe an effect to the organisms in the highest concentrations tested and in sediment it is possible to observe an increase of effect in the organisms in the sediments rich in organic matter.

Keywords: Dichlofluanid, Sediment, Water, Biomarkers, Ecotoxicological tests.

## Capítulo 1 - Introdução Geral

Centenas de compostos químicos são detectados nos diferentes compartimentos ambientais podendo ter origem natural ou antrópica. Tais compostos antropogênicos introduzidos no ambiente podem ser provenientes de efluentes domésticos, industriais, hospitalares, agrícolas, entre outros. Em muitos casos, pouco se sabe a respeito desses compostos: o que eles causam ao ambiente e à saúde das populações, e mesmo o seu destino nos diferentes compartimentos ambientais, não havendo regulações para seu uso nem o estabelecimento de limites máximos para sua presença no ambiente. Essas substâncias são denominadas compostos de interesse emergente. Elas estão presentes nos princípios ativos de fármacos, produtos de higiene pessoal, drogas ilícitas, pesticidas, retardantes e supressores de chamas, nanomateriais, compostos anti-incrustantes, entre outros (Cima et al., 2008; Richardson and Kimura, 2015).

Este estudo vai enfatizar as tintas anti-incrustantes, em especial as substâncias usadas como princípios ativos nessas tintas. Tais tintas são utilizadas para proteger e combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes sobre superfícies expostas à água do mar, sendo aplicadas em diversas estruturas, tais como embarcações, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura, entre outras (Yebra et al., 2004). Assim, são utilizadas com o intuito de preservar as estruturas submersas, bem como, a manter a navegabilidade, no caso das embarcações (Almeida et al., 2007a).

Atualmente, vários biocidas têm sido utilizados como princípio ativo de tintas anti-incrustantes. Esses compostos podem ser caracterizados como substâncias potencialmente danosas aos ecossistemas aquáticos, já que são lixiviados a partir das pinturas, podendo então atingir a coluna d'água e outros compartimentos ambientais, como os sedimentos e a biota (Thomas and Brooks, 2010). Áreas com grande fluxo de embarcações, como portos, marinas, estaleiros e zonas de fundeio são altamente susceptíveis à contaminação oriunda destes produtos. Além disso, essas substâncias podem se associar com partículas finas e matéria orgânica, gerando acúmulo em zonas costeiras de baixa energia (Castro et al., 2012a), onde estarão susceptíveis a diferentes processos físicos, químicos e biológicos que podem gerar a liberação desses contaminantes. Individualmente ou associados, esses processos contribuem para o transporte dos contaminantes potencialmente disponíveis do sedimento para a coluna d'água (Burgess and Scott, 1992) e para a biota.

As tintas anti-incrustantes consideradas de primeira geração surgiram em meados do século XX, e usavam como princípio ativo óxidos de cobre e de zinco (Fernandez e Pinheiro, 2007; Godoi et al., 2003). Rapidamente essas tintas se mostraram ineficientes e uma segunda geração de tintas à base de compostos organoestânicos (COE) foi introduzida no mercado (Fent, 2003; Fernandez and Pinheiro, 2007). Estas tintas utilizavam como princípio ativo os compostos Tributilestanho (TBT) e/ou Trifenilestanho (TPhT) e foram amplamente empregadas em embarcações de todo o mundo na década de 1980. As tintas à base de COE eram extremamente eficientes, porém, possuíam elevado potencial tóxico, causando efeitos danosos sobre espécies não-alvo, o que levou ao banimento da utilização dos COE em tintas anti-incrustantes pela Organização Marítima Internacional (International Maritime Organization - IMO) (Almeida et al., 2007a). O processo de proibição do uso de sistemas anti-incrustantes à base de COE iniciou com o banimento de novas pinturas, no ano de 2003, e tendo janeiro de 2008 como o prazo limite para remoção dos revestimentos de estruturas que já estivessem operando (Champ, 2000).

Entretanto, o banimento definitivo do tráfego de embarcações revestidas com tintas à base de COE ocorreu em setembro de 2008 (Sonak et al., 2009), pelo menos para os países signatários dos tratados internacionais. Como consequência, uma terceira geração de tintas anti-incrustantes foi introduzida no mercado. Esse novo grupo de tintas utiliza, isoladamente ou combinados, 16 diferentes compostos, os quais se encontram atualmente homologados para utilização em navios (IMO, 2005). Estes compostos pertencem a diferentes grupos químicos e em alguns casos são utilizados até 4 deles no mesmo produto (Okamura and Mieno, 2006). Entre os biocidas incorporados nos sistemas anti-incrustantes de terceira geração podem ser citados compostos não metálicos como o Diuron, o Irgarol 1051, o Sea-Nine 211, o Clorotalonil, a Diclofluanida, o Tiram, o Trifenilbornano Piridina e o Busan/TCMTB. Já os compostos metálicos ou organometálicos homologados para utilização são o Zinco Piritiona, o Ziram, o Maneb, o Zineb, o Cobre Piritiona, o Óxido Cuproso, o Tiocianato de Cobre e o Naftenato de Cobre (Castro et al., 2011).

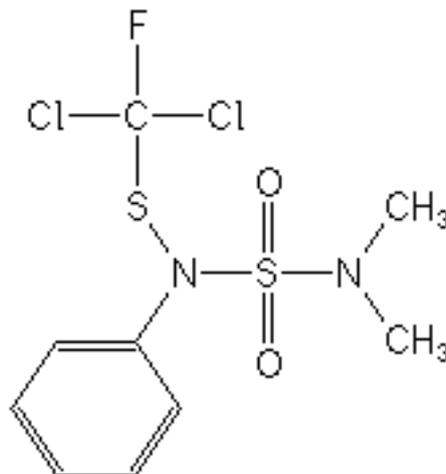
Nesse contexto, alguns estudos relacionando a ocorrência ambiental desses biocidas em áreas onde há fluxo de embarcações, como portos e marinas, têm sido publicados na literatura especializada (Mukherjee et al., 2009). Entretanto, a maior parte deles tem sido realizada em áreas portuárias da Europa, dos Estados Unidos e do Japão (Gatidou et al., 2007; Harino et al., 2009; Thomas and Langford, 2009), não existindo até o momento estudos sistemáticos sobre o tema para a costa brasileira. Estudos prévios conduzidos pela Rede Nacional de Estudos sobre Anti-incrustantes (RNEA) indicaram presença de TBT em várias áreas costeiras e portuárias do Brasil

(Buruaem et al., 2013; Castro et al., 2012b), evidenciando que existe um problema ambiental relacionado ao uso de tintas anti-incrustantes no país. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos dos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração sobre a biota marinha e estuarina nativa do Brasil.

Sendo assim, passa a ser necessária a realização de estudos visando não só diagnosticar a presença desses biocidas nas regiões costeiras brasileiras, observando-se as suas respectivas concentrações ambientais, mas também avaliar os potenciais efeitos que tais substâncias podem causar sobre organismos aquáticos. Tal iniciativa permitiria avaliar o risco ecológico da presença desses biocidas nos ambientes costeiros e marinhos podendo resultar ainda em recomendações para uso de tintas ambientalmente mais amigáveis. Além disso, a influência de parâmetros ambientais, tais como os teores de matéria orgânica (MO) em sedimentos, sobre a toxicidade destes compostos é ainda desconhecida (Champ, 2000; Fent et al., 1998; Mochida and Fujii, 2009a, 2009b). Adicionalmente, a disponibilização dos resultados destas pesquisas para a indústria química pode auxiliar e direcionar pesquisas de desenvolvimento e inovação para a criação e o uso de novas tintas, menos tóxicas e mais eficientes.

Diante desta contextualização, o composto de interesse para este estudo é um dos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração: a diclofluanida (N-diclorofluorometiltio-N', N'-dimetil-N-fenilsulfamida), que possui fórmula molecular  $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$  (Fig 1) e peso molecular de 333,217 g/mol. Este composto pertence ao grupo dos organoclorados, apresentando baixa solubilidade em água (0,006 mg/L),  $K_{ow}$  de 3,7 e pressão de vapor  $1,57 \times 10^{-7}$  mmHg á 25 °C (Hamwijk et al., 2005; Tomlin, 2009) razão pela qual apresenta elevada afinidade por material particulado e sedimentos (Thomas and Brooks, 2010). O composto também se torna mais solúvel na presença de solventes como acetona (Martin and Worthing, 1968). Em pH ácido e temperatura média de 22 °C, ela leva alguns dias para se degradar (>15dias) tempo que vai se reduzindo conforme o pH aumenta. Para pH neutro a sua degradação ocorre em poucas horas (<18horas) e em pH alcalino, a sua degradação acontece em pouco minutos (<10 minutos) (Tomlin, 2009). A diclofluanida degrada-se rapidamente em água originando a N,N-Dimetilaminossulfanilida (DMSA) (Castro et al., 2011), porém sua persistência e degradação é influenciada pela concentração de matéria orgânica, pH do meio, atividade microbiana e incidência de luz (Clark and Watkins, 1978; Sakkas et al., 2001). A diclofluanida é um composto extremamente tóxico enquanto o DMSA apresenta baixa toxicidade ao ambiente aquático (Hamwijk et al., 2005). Adicionalmente, na degradação da diclofluanida, é possível que sejam

gerados outros subprodutos além do DMSA (Sakkas and Albanis, 2003), cujo potencial tóxico é desconhecido.



**Fig 1.** Estrutura molecular 2D da Diclofluanida.

Em razão dessas características físico-químicas, parte da diclofluanida liberada na coluna d'água tenderá a adsorver ao material particulado e se depositará nas camadas sedimentares (Thomas and Langford, 2009). Nesse compartimento, a diclofluanida pode estabelecer diferentes interações químicas que influenciarão diretamente sua biodisponibilidade e toxicidade para os organismos bentônicos. Portanto, a caracterização dos sedimentos no que diz respeito a composição, pH, distribuição granulométrica e a matéria orgânica tem papel central no particionamento e conseqüentemente risco ambiental desse composto (Comber et al., 2002). Avaliações da ocorrência da diclofluanida em amostras ambientais de sedimento mostraram níveis variando entre <1,6 ng/g e 688,2 ng/g em estudos realizados na Europa e Ásia (Martinez et al., 2001; Sakkas et al., 2002; Thomas et al., 2002; Vouvoulis et al., 2000). Já em água foram observadas concentrações que variaram entre <4 ng/l e 600ng/l em estudos conduzidos na América Central, América do Norte e Europa (Albanis et al. 2002; Carbery et al. 2006; Hamwijk et al. 2005; Lambropoulou et al. 2000; Martinez et al. 2000; Sakkas et al. 2002). Sendo assim, as avaliações de risco ecotoxicológico para esse composto, devem conter experimentos de exposição a soluções aquosas e sedimentos contaminados com a diclofluanida. No Brasil, estudos com essa substância ainda são escassos não havendo, até o momento, publicações relatando concentrações ambientais de diclofluanida em ambientes costeiros e marinhos.

Estudos sobre comunidades biológicas, de bioacumulação e testes de toxicidade têm sido empregados com o propósito de se conhecer e/ou avaliar os efeitos da introdução de xenobióticos no ambiente marinho. Porém, esses métodos

muitas vezes se limitam a detectar os efeitos quando estes já se manifestaram em níveis maiores de organização, tais como população, o que torna pouco sensíveis aos primeiros sinais de efeito que ocorrem em níveis bioquímicos, celulares e fisiológicos. O uso de biomarcadores visa avaliar os efeitos tóxicos e metabólicos de contaminantes, isolados ou em combinação, em níveis menores de organização (Pereira, 2004). Segundo Walker et al. (1996), biomarcadores são indicadores bioquímicos, fisiológicos ou histológicos de exposição ou de efeito, dos químicos xenobióticos presentes no ambiente, em nível de organismo ou de “sub-organismo”. Suas respostas, desde níveis sub-celulares, podem ser utilizadas potencialmente como um sinal prévio de efeitos tóxicos, uma vez que o ponto de partida de todos os danos causado por xenobióticos envolve perturbações de processos bioquímicos e moleculares no interior das células, posteriormente dando origem aos efeitos em níveis maiores de organização (Cheung et al., 1998).

Utilizar vários biomarcadores em conjunto é mais vantajoso que utilizar somente um biomarcador e oferece um sistema de aviso prévio efetivo para o biomonitoramento de ambientes aquáticos (Dailianis et al., 2003). Dessa forma é possível que haja uma melhor compreensão das respostas de biomarcadores na ausência ou presença de poluentes (Ringwood et al., 1999). Estudos mostraram que, de forma combinada, os biomarcadores se mostraram uma ferramenta extremamente eficiente para avaliar a qualidade do ambiente (Gusso-Choueri et al., 2015; Maranhão et al., 2012; Pereira et al., 2014). Além disso, biomarcadores podem detectar respostas em estágio inicial e alterações pré-patológicas antes que ocorram distúrbios como doenças, mortalidade ou mudanças na população (Bresler et al., 1999; Fishelson et al., 1999).

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes (Henderson et al., 1987; WHO, 1993): biomarcadores de exposição, de efeito ou de susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis e que evidenciam a exposição dos indivíduos aos contaminantes e o disparo de alterações metabólicas ou estruturais. Biomarcadores de efeito prevêm alterações bioquímicas, fisiológicas, ou de qualquer outro tipo, ocorridas em tecidos ou fluidos corporais de um organismo, e que estejam associadas a um estresse real ou potencial à saúde do organismo. Por último os biomarcadores de susceptibilidade indicam a capacidade de um organismo em responder à exposição a uma substância xenobiótica e/ou metal-traço específico.

Em paralelo aos biomarcadores, os testes de toxicidade têm sido amplamente empregados e fornecem informações sobre a qualidade da água e dos sedimentos, considerando o efeito de contaminantes sobre as populações de organismos, sendo importantes para o monitoramento ambiental (Abessa, 2002). Para a diclofluanida,

estudos ecotoxicológicos mostraram valores variáveis de concentração de efeito (CE) para diferentes espécies. Na exposição de espécies marinhas como larvas do molusco *Mytilus edulis*, do ouriço *Paracentrotus lividus*, do nematódeo *Ciona intestinalis* e da bactéria *Vibrio fisheri* foram encontrados CE<sub>50</sub> de 81 µg/L, 627 µg/L, 283 µg/L e 15,7 µg/L respectivamente. Já para espécies dulcícolas podem ser citados a alga *Selenastrum capricornotum* e o microcrustáceo *Daphnia magna*, para os quais os valores de CE<sub>50</sub> observados foram de 21 e 1330 µg/L respectivamente (Bellas, 2006; Fernandez-Alba et al., 2002). Porém, a despeito dos estudos apontados acima, ainda são escassos os estudos de ecotoxicidade com esse composto, principalmente com organismos de ambientes tropicais e subtropicais.

Para a realização dos testes de exposição e de toxicidade, são necessários organismos que possam desempenhar o papel de modelo biológico; ou seja, organismos cuja resposta ao contaminante possa ser comparada e/ou extrapolada para outras espécies. Dentre os modelos biológicos normalmente utilizados para avaliação de biomarcadores e ensaios ecotoxicológicos encontram-se bivalves, peixes (Brito, 2010; Domingos, 2006; Lins et al., 2010; Rossi, 2008; Travasso, 2011), crustáceos (Brown et al., 2004; Cruz et al., 2014; Forget et al., 2003; Moser, 2011; Togni, 2007), entre outros.

Muitos estudos têm sido realizados nos grandes portos e estaleiros do mundo no sentido de avaliar o impacto provocado pela utilização dessas tintas, indicando a extensão que este problema pode ter ao redor do mundo. No Brasil, entretanto, são poucos os estudos e o conhecimento sobre aspectos de contaminação e efeitos ecológicos das tintas anti-incrustantes nas regiões costeiras e marinhas. Após a aprovação do projeto **“Impacto da Utilização de tintas anti-incrustantes nos principais terminais portuários brasileiros (MCT/FINEP - TRANSPORTE AQUAVIÁRIO E CONSTRUÇÃO NAVAL- 01/2010)”**, foi estruturada uma rede nacional de estudos sobre anti-incrustantes que iniciou estudos sistemáticos e abrangentes visando mapear esse tipo de contaminação nas áreas sob a influência dos 22 principais terminais portuários brasileiros. O projeto permitiu o monitoramento de biocidas anti-incrustantes em amostras ambientais, a realização de um diagnóstico sobre a contaminação por alguns biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes na costa brasileira, além da formação de recursos humanos e a publicação de artigos e relatórios. Porém, pelo caráter inicial e pontual dos estudos já conduzidos, poucas informações foram obtidas em relação a fatores relacionados com os riscos ambientais e fatores que podem influenciar esses riscos. Dessa forma, houve a posterior aprovação do projeto **“AIBRASIL2- Micropoluentes Orgânicos em sistemas anti-incrustantes: comportamento ambiental, toxicidade e biorremediação”** (Processo

FINEP 1111/13) que visa consolidar uma rede nacional para avaliar os efeitos biológicos e riscos ambientais das principais tintas anti-incrustantes utilizadas nos estaleiros brasileiros bem como a sua inter-relação com a matéria orgânica presente. Esse projeto foi complementado pelo projeto “**Estudo ecotoxicológico de micropoluentes utilizados em sistemas anti-incrustantes**” (Processo 456372/2013-0), o qual aportou recursos adicionais para execução das atividades previstas. Ambos os projetos vêm gerando a expansão da rede de pesquisa e do conhecimento sobre biocidas anti-incrustantes no Brasil e viabilizou o desenvolvimento da presente tese de doutorado.

Neste contexto, esta tese foi dividida em 4 módulos sendo a primeira este capítulo introdutório, dois capítulos em forma de artigo científico e um último capítulo conclusivo.

- O primeiro capítulo é representado por esta introdução e contextualização do problema relativo aos biocidas anti-incrustantes.
- O segundo capítulo investiga como espécies responderam à diclofluanida em testes de toxicidade aguda e crônica em água e sedimentos, neste segundo caso levando-se em conta diferentes níveis de matéria orgânica.
- O terceiro capítulo investiga o papel de um conjunto de biomarcadores (respostas antioxidantes, danos em DNA, peroxidação lipídica) avaliados em diferentes órgãos de bivalves (Brânquias e Glândulas digestivas) expostos à diclofluanida em soluções aquosas e também em sedimentos com concentrações de matéria orgânica diferenciadas, a fim de avaliar os possíveis efeitos desse composto quando presentes nas diferentes matrizes.
- O quarto e último capítulo apresenta os tópicos de alta relevância do trabalho e traz uma conclusão geral levando-se em conta todos os resultados obtidos.

## Chapter 2 – Ecotoxicological approach

### Toxicity tool: water and sediment artificially contaminated with dichlofluanid

#### Abstract

Anti-fouling paints are used to protect and prevent the formation and establishment of biofouling communities on hard surfaces exposed to sea water. Dichlofluanid is one of the biocides used as anti-fouling agent, but little is known on its potential toxic effects to the marine biota. The aim of the study was to evaluate chronic and acute toxicity of Dichlofluanid on marine invertebrates, when exposed at environmental concentrations. Chronic toxicity tests with aqueous solutions were performed with embryos of the sea-urchin *Echinometra lucunter* and ovigerous females of the copepod *Nitocra* sp. Chronic and acute toxicity tests with sediments spiked with Dichlofluanid were conducted with *Nitocra* sp. and *Tiburonella viscana* respectively, considering samples with different concentrations of organic matter. In the tests with aqueous solutions, the toxic levels were higher than the environmental concentrations. Embryos of *E. lucunter* presented increased percentages of abnormal larvae from the concentration of 1 µg/l, that was the Lowest Observed Effect Concentration (LOEC); the No Observed Effect Concentration (NOEC) was 0.1 µg/l. EC<sub>50</sub>-40h was 198.5 µg/l (84.56-466.1 µg/l) and EC<sub>10</sub>-40h was 0.3577 µg/l (0.01065-12.02 µg/l). In the tests with *Nitocra* sp., the LOEC was 100 µg/l and the NOEC was 10 µg/l. The EC<sub>10</sub>-7d was 0.0635 µg/l while the EC<sub>50</sub>-7d was 583.83 µg/l. In the sediment tests, the tested concentrations were not toxic to the copepod *Nitocra* sp., and the fecundities were similar when the two types of sediments were compared. For *T. viscana* the mortality rates increased 40% at the concentration of 1000 ng/g and 30% at the concentration of 10000 ng/g. When comparing the two sediments, the greatest difference between the mortalities was observed at 1000 ng/g, suggesting that there is an influence of the organic matter on the toxicity of Dichlofluanid. This investigation shows that Dichlofluanid is toxic to marine invertebrates and that in sediments, its toxicity may be influenced by the level of organic matter, with higher toxicity in sediments organically enriched. However further studies are needed to assess its effects at biochemical, cellular, and physiological levels.

Keywords: dichlofluanid, toxicity test, water, sediment

## 1. Introduction

Anti-fouling paints are used to protect and to prevent the formation and establishment of biofouling communities on hard surfaces exposed to sea water. They are applied on structures, such as vessels, oil rigs, submarine pipelines, tanks for aquaculture, among others (Yebra et al., 2004). These paints are used with the intention of preserving such structures, as well as maintaining navigability, in the case of vessels (Almeida et al., 2007a).

Anti-fouling compounds involve a set of organic and inorganic substances and can be characterized as potentially harmful to aquatic ecosystems, as they are designed to be toxic and are leached from the paints to the water column (Thomas and Brooks, 2010). Areas with high flow of vessels, such as ports, marinas, shipyards and hull zones are highly susceptible to contamination by these chemicals (Konstantinou and Albanis, 2004). Physical, chemical and biological processes contribute to the transference of the potentially available contaminants from water to sediments and biota; besides, some processes such as bioturbation, dredging and storms may cause resuspension of particles from the bottom and thus bring these compounds back to the water column (Burgess and Scott, 1992; Hattum et al., 2006). Besides, antifouling paints leached from vessels can suffer biodegradation, photolysis, sorption onto particulate matter, UV degradation, volatilization or bioturbation; such processes can interfere on the fate and effects of anti-fouling biocides after their release from the painted surfaces (Lesueur et al., 2015; Hattum et al., 2006).

The first generation of antifouling paints appeared in the mid 20th century, and employed oxides of copper and zinc as active principles (Fernandez & Pinheiro, 2007; Godoi et al., 2003). These paints were considered inefficient and a second generation of compounds was introduced in the market (Fent, 2003; Fernandez and Pinheiro, 2007). These paints present organotin (OT) compounds in their formulation, especially Tributyltin (TBT) and / or Triphenyltin (TPhT) as their main active principles, and were widely used in vessels around the world during the 1980s decade. The OTs were extremely efficient but had a high toxic potential, causing harmful effects on non-target species, which led to their banishment from the composition of antifouling paints by the International Maritime Organization (IMO) (Almeida et al., 2007a). The definitive ban of vessel traffic covered with OT paints occurred in September 2008 (Sonak et al., 2009), at least for those countries which are signatories of the international treaties. As consequence, a third generation of antifouling paints was introduced into the market (IMO, 2005). Such paints could use a range of chemicals in their formulation, alone or combined; in some cases up to four of them could be used in the same product

(Okamura and Mieno, 2006). These compounds belong to different chemical groups and include non-metallic compounds such as Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Chlorothalonil, Dichlofluanid, Thiram, Pyridine (TPBP and TCMS) and TCMTB. On the other hand, metallic or organometallic compounds approved for use include Zinc Pyrithione, Ziram, Maneb, Zineb, Copper Pyrithione, Copper Oxide, Copper Thiocyanate and Copper Naphthenate (Castro et al., 2011).

Dichlofluanid (N-[dichloro(fluoro)methyl]sulfanyl-N'-(dimethylsulfamoyl) aniline) is one of the biocides of third generation. It was originally designed as a fungicide to control diseases on fruits and ornamentals (Heil et al., 1991) and to work as wood preservative (Stirling and Temiz, 2014), which lately started to be used as anti-fouling agent. It has been detected in environmental samples, such as surface sediments (Hamwijk et al., 2005; Kim et al., 2015). This compound belongs to the group of organochlorines, presenting low solubility (0.006 mg/L) and Kow of 3.7; such properties make Dichlofluanid to have high affinity with particulate matter and sediments (Konstantinou and Albanis, 2004; Thomas and Brooks, 2010). Dichlofluanid has a short half-life and once in water it tends to rapidly (i.e., >24 hours) degrade to N,N-Dimethylaminosulfanilide (DMSA). In addition, its degradation may generate other byproducts, such as dichlorofluormethane (Castro et al., 2011; Sakkas and Albanis, 2003; Thomas et al., 2003). The degradation of Dichlofluanid can be influenced by the concentration of organic matter, pH, microbial activity and incidence of light (Sakkas et al., 2001). Dichlofluanid is an extremely toxic compound while DMSA has low toxicity to the aquatic environment (Hamwijk et al., 2005).

Studies conducted in Europe and Asia showed environmental concentrations of dichlofluanid in sediments ranging from <1.6 ng/g to 688.2 ng/g (Martinez et al., 2001; Sakkas et al., 2002; Thomas et al., 2000; Vouvoulis et al., 2000). In water, concentrations ranging from <4 ng/L to 600 ng/L were observed in Central America, North America and Europe (Albanis et al., 2002; Carbery et al., 2006; Hamwijk et al., 2005; Lambropoulou et al., 2000; Martinez et al., 2001; Sakkas et al., 2002).

To assess the ecotoxicological risks associated with this compound, experiments with aqueous solutions and spiked sediments have been required. Toxicity tests have been used in order to determine and/or evaluate the effects of the introduction of xenobiotics in the marine environment. Sediment is one of the most suitable matrices, due to its ability to accumulate contaminants over time (Nipper et al., 1990). Some sediments are rich in organic matter and this could be an interesting factor to be studied, because OM has the capacity of binding and adsorbing organic compounds due to its affinity with hydrophobic compounds (Karapanagioti et al., 2000; Stevenson, 1994). These interactions can occur by ion exchange, hydrogen bonding,

charge transfer, covalent binding and hydrophobic adsorption and partitioning (Choudhry, 1984; Piccolo, 1994; Senesi, 1992; Senesi and Chen, 1989) These interactions can affect the toxicity and the bioavailability of organic compounds in aquatic organisms (Haitzer et al., 1998).

Dichlofluanid has been found in the environment and there are few studies demonstrating its toxicity on the life cycle or survival of marine organisms. In addition, water and sediment are important environmental compartments to be studied: the first because it is in direct contact with the antifouling compound and the second because it has great affinity for these organic compounds. In this way, the aim of the study was to assess the chronic and acute toxicity of Dichlofluanid on marine organisms at environmental concentrations. The specific objectives were:

1. To assess the toxicity of aqueous solutions of Dichlofluanid, by taking into account environmental concentrations of dichlofluanid or concentrations that cause effects to the organisms tested.
2. To evaluate the toxicity (acute and chronic) of two types of spiked sediments (low and high amounts of OM, with increasing concentrations of Dichlofluanid) to marine invertebrates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Toxicity tests with aqueous solutions

In the toxicity tests with aqueous dilutions of Dichlofluanid, the tested concentrations were 0.1 µg/l, 1 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l and 1000 µg/l. The working solutions were prepared at the time of the bioassays, by diluting the stock solutions in filtered sea water with salinity adjusted to each test. The stock solution was prepared in acetone and its concentration was 1 g/l of dichlofluanid.

Negative controls containing seawater (collected off the coast and free of pollution) were prepared. In addition, an "analytical blank" solution, containing only acetone solvent diluted in seawater, was prepared for each treatment. The solutions were prepared so that acetone ranged from 0.05% to 0.1% of the total exposure concentration. At this range of concentrations, acetone is reported as not toxic to different organisms (Perina, 2009; Xu et al., 2011).

In all the tests, physical-chemical parameters, such as pH, salinity, temperature, dissolved oxygen, and ammonia, were evaluated in order to guarantee that the physical-chemical parameters remained within the acceptable ranges to each species and thus such variations did not interfere on the results of the tests. The first four parameters were measured with appropriate electrodes and ammonia was measured

by a colorimetric method according to the protocol described by Verdouw et al. (1978). The results of all the tests were compared with the respective analytical blanks.

#### 2.1.1. Embryo-larval test – *Echinometra lucunter*

The embryonic development tests using sea urchin eggs and larvae were performed following the protocol described by (ABNT, 2012).

Adult sea-urchin individuals of the species *Echinometra lucunter* were collected by snorkeling at Palmas Island, Guarujá, São Paulo (24° 00'S - 46° 27'W), transported to the laboratory and kept in tanks containing filtered seawater. The animals were induced to spawn by osmotic induction (0.5 M KCl) into their peri-oral region. Ovules were examined for their morphology, before being separated to the test, and sperm activation occurred after dilution in sea water.

Fertilization was achieved by adding about 2 ml of the sperm solution into the beaker containing the ovules solution. Then, the solution was left under mechanical agitation for 2 hours. Next, three sub-samples were taken to count the eggs, which are identified by the presence of the fertilization membrane (the minimum acceptable rate of successful fertilization was 80%). After confirming the fertilization success, approximately 500 eggs were introduced in the test-chambers (15 ml glass tubes) containing the dichlofluanid solutions and the respective controls and analytical blanks. Four replicates were used per treatment. The test system was incubated for more than 40 hours (time required for the formation of the equinopluteus larvae in the follow-up controls) at a constant temperature ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ), under a 16h:8h light/dark photoperiod and salinity 35. The content of each replicate was then fixed with tamponed formaldehyde (10%). Subsequently, 100 embryos were counted from each replicate using an optical microscope (100X magnification) and the percentages of normal embryos were calculated. Normal plutei were defined based on typical larval development; the branch symmetry, shape and size of the skeleton were considered in the definition (Perina et al., 2011).

#### 2.1.2. Fertility test – *Nitocra* sp.

The chronic toxicity assay with the benthic copepod *Nitocra* sp. was based on the protocol developed by Lotufo and Abessa (2002). *Nitocra* sp. has a relatively short life cycle, presents high sensitivity, is estuarine, benthic, cosmopolitan and easy to cultivate in the laboratory; in this investigation, the used organisms were reared in the laboratory.

Four replicates were set up in glass beakers and they were filled with 20ml dichlofluanid solution (clean sea water or acetone solution in the respective control and analytical blanks). Immediately, ten healthy ovigerous females were introduced into each replicate. The entire test system was incubated at  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  for 7 days with a photoperiod of 16h light:8h dark and salinity 17. The content of each replicate was then fixed with tamponed formaldehyde (10%) and Rose-Bengal dye (0.1%). Finally, the numbers of adult females and their offspring (nauplii and copepodits) were counted using a stereomicroscope.

## 2.2. Toxicity tests with spiked sediments

Two types of sediments were used to investigate the toxicity of Dichlofluanid; they differed by the respective concentrations of organic matter (OM): low and high amounts of OM, as described below. These sediments were collected at two distinct sites from Cananéia, on the southern coast of the state of São Paulo. The low OM sediment was collected at the Arrozal ( $25^\circ 02.415 \text{ S}$  e  $47^\circ 55.540 \text{ W}$ ) and the high OM sediment was collected at Ariri ( $25^\circ 13.215 \text{ S}$  e  $48^\circ 02.492 \text{ W}$ ). It was necessary to repeat one of the tests performed with the low OM sediment (*Tiburonella viscana* test) due to problems during this test in the laboratory. Because of that, the results of sedimentological properties of three sediments will be presented: one sediment collected in Ariri (High OM) and two sediments collected at Arrozal, at different times (Low OM and Low OM\_2).

Both sediments were spiked with dichlofluanid in order to compare the toxicity taking into account the percentages of OM. Just like the tests with aqueous solutions, negative controls and blanks with the same sediments were made. The concentrations of dichlofluanid in the sediment were:  $1 \mu\text{g/g}$ ,  $10 \mu\text{g/g}$ ,  $100 \mu\text{g/g}$ ,  $1000 \mu\text{g/g}$  and  $10000 \mu\text{g/g}$  in all tests performed.

For all the tests, physical-chemical parameters, such as pH, salinity, temperature, dissolved oxygen, and ammonia, were measured, using the same methods previously described in the tests with aqueous solutions.

### 2.2.1. Sedimentological analyses

#### *Sediment grain size*

Sediment grain size distribution was analyzed based on the protocol proposed by Mudroch and MacKnight (1994). In the measurements (and experiments), it was

decided to not remove the calcium carbonate, because it is an integral part of the sediment and due to the geochemical, ecological and ecotoxicological implications. Three aliquots of 30g of each sample were separated and oven dried at 60° C for 2 days. This material was washed in a 0.063 mm mesh sieve to separate fine particles (mud and clay). Subsequently, the sandy material retained on the 0.063 mm mesh was dried in an oven at 60° C for 2 days. Then it was weighed and sifted for 15 minutes in a RO-TAP shaker, into different meshes ( $\phi$  scale) in order to separate different classes of sand, and the results were further classified based on the Wentworth Scale (Wentworth, 1922). Afterwards, an average of the three samples was calculated.

#### Contents of Calcium Carbonate ( $\text{CaCO}_3$ )

The calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) contents in each sample were measured using the method described by Hirota and Szyper (1975), which consists of separating 3 fractions of 5 g of each sediment sample and then adding 10 ml of hydrochloric acid (5N HCl) for 24 hours to eliminate calcium carbonates. The samples were then washed with distilled water and then dried in an oven at 60° C. From the observed sediment weight loss it was possible to calculate the percentage of calcium carbonates present in the sample. Then an average of three samples was calculated.

#### Organic Matter (OM)

Organic matter (OM) contents in the sediment samples were estimated using the ignition method (Luczak et al., 1997), which consists of separating 3 samples of 5 g of dry sediment aliquots from each sample and incinerating them in a muffle (500° C) for 4 hours. The percentage of OM was obtained from the mass loss after the incineration process. Then an average of three samples was calculated.

#### 2.2.2. Spiked Sediments

The spiked sediments were prepared based on the protocols of ASTM (2008) and Fuchsman and Barber (2000). The quantities of dichlofluanid, in the appropriate concentrations, were added to the sediment taking into account the weight of the sediment after being dried in an oven. The wet sediment was partitioned into aliquots where the different concentrations of dichlofluanid were added. The control and the analytical blank sediment also passed through the same procedure. All the sediments were shaken for fifteen minutes with the help of a device which makes the multidirectional rotation of the sediment in a hermetically sealed glass container. After the mixing procedure, the spiked sediments were kept in the dark and cooled (4° C) for 72 hours, in order to allow the establishment of a balance of the contaminant between

the interstitial water and the solid fraction of the sediment. Then, the sediments were distributed in the test-chambers for the toxicity tests.

#### 2.2.3. Mortality test – *Tiburonella viscana*

The acute sediment toxicity test with *T. viscana* (Thomas and Barnard 1983) was conducted following the protocol described by Melo and Abessa (2002) and ABNT (2008). The amphipods used in this test were collected at Engenho d'Água Beach, Ilhabela, São Paulo (23°48' S – 45°22' W). In this test, three replicates of each sediment sample were prepared with 150 g of sediment and 400 ml of dilution seawater. Ten healthy adult and non ovigerous amphipods were introduced into each test chamber. The experiment lasted 10 days, and the system was kept under constant lightning and aeration, at  $25 \pm 2^\circ$  C, and salinity 35‰. At the end of the test, the contents of each test chamber were sieved and the surviving organisms were counted. Missing organisms were considered dead.

#### 2.2.4. Fertility test – *Nitocra* sp.

Previous experiments were conducted with *Nitocra* sp. to verify if the natural sediments (low and high OM) could present any toxicity before starting the spiked sediment experiments. The results of these experiments are presented in the appendix A and B, and no evidence of toxicity was observed for both sediments. Then, in the chronic studies, ovigerous females were exposed to sediments containing different concentrations of dichlofluanid and the fecundity rates of exposed organisms were evaluated. The tests were performed according to the protocol described by Lotufo and Abessa (2002), using the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. The procedure was similar to that described for aqueous solutions, excepting for the presence of sediments in the flasks - approximately 4 g of fortified sediments and 16 ml of water at salinity similar to that of the culture, and considering 4 replicates per sample.

### 2.3. Statistical and Exploratory Analyses

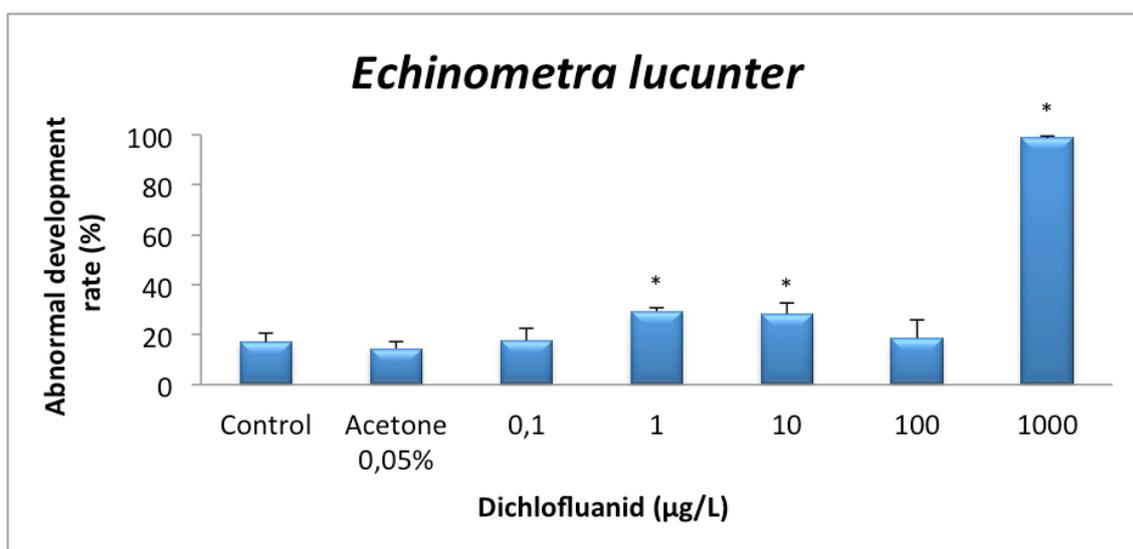
The results obtained in the water toxicity tests were checked for normality and homoscedasticity (Shapiro Wilk and Bartlett tests, respectively) and then a one-way ANOVA was performed, followed by the Dunnet's test (or its equivalent nonparametric test) to evaluate if there was a significant difference between the concentrations of dichlofluanid, analytical blank and the control. With these data, the lowest observed effect concentrations (LOECs) and the no observed effect concentration (NOEC) were calculated. Effective Concentrations were also calculated to 50% and 10% of the

exposed organisms ( $EC_{50}$  and  $EC_{10}$ , respectively). The results of the sediment tests were also checked for normality and homoscedasticity, but they were analyzed by a two-way ANOVA, to evaluate if there was a significant difference between the concentrations of dichlofluanid, analytical blank and control, and also if there were significant differences between the two types of sediments (low and high MO). All analyzes were done on GraphPad Prism software.

### 3. Results and discussion

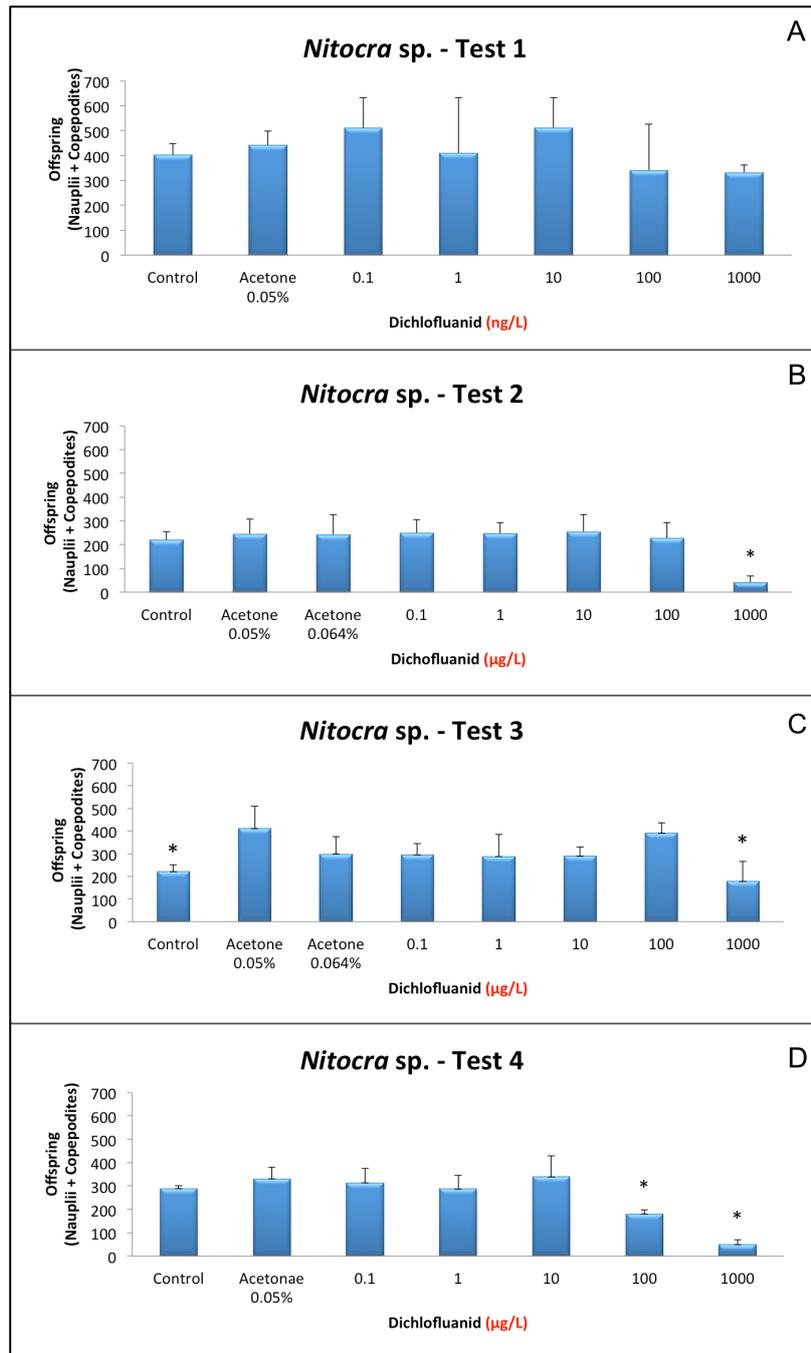
#### 3.1. Toxicity tests with aqueous solutions

The rates of abnormal larval development of *E. lucunter* exposed to a range of concentrations of dichlofluanid are shown below (Fig 2). The physical-chemical parameters of the test solutions were maintained within the accepted standards for this test, according to ABNT (2012) (Ap C). An increase of the percentages of abnormal larvae was observed from the concentration of 1  $\mu\text{g/l}$ , thus this was considered the LOEC; consequently, the NOEC was 0.1  $\mu\text{g/l}$ . The  $EC_{50-40h}$  was 198.5  $\mu\text{g/l}$  (84.56-466.1  $\mu\text{g/l}$ ) and  $EC_{10-40h}$  was calculated at 0.36  $\mu\text{g/l}$  (lower = 0.01-12.02  $\mu\text{g/l}$ ). Embryos exposed to the concentration of 1000  $\mu\text{g/l}$  exhibited 100% abnormality.



**Fig 2.** Percent of abnormal embryo-larval development of *Echinometra lucunter* exposed to different concentrations of dichlofluanid (ANOVA,  $p < 0.0001$ ). \* = statistically significant difference with the acetone control ( $p < 0.05$ ). The error bars show the respective standard deviations.

The Figure 3 shows the results of the tests conducted with harpacticoid copepods and dichlofluanid concentrations. The physical-chemical parameters are presented in the appendix D. In the first experiment (Fig 3A), at concentrations close the environmental levels, there was no significant difference in the offspring development of exposed organisms and the acetone control (ANOVA,  $p=0.3236$ ). In the other experiments (Fig. 3B, 3C and 3D), using higher concentrations (micrograms per liter) *Nitocra* sp. showed a significantly lower rate of offspring development (nauplii + copepodites) at the concentration of 1000  $\mu\text{g/l}$  of dichlofluanid, when compared to the 0.05% acetone control (Figs 3B and 3C). In the fourth test significant effects occurred from the concentration of 100  $\mu\text{g/l}$  (Fig 3D). In the test 3, a significantly smaller number of young individuals were also observed in the water control, when compared to the 0.05% acetone control. This could be caused because mean offspring number in the acetone control 0.05% was slightly above that rate routinely observed in tests with aqueous solutions and *Nitocra* sp. in our laboratory. Thus, the LOECs ranged between 100 and 1000  $\mu\text{g/l}$  and the NOECs ranged between 10 and 100  $\mu\text{g/l}$ , depending on the test considered. Taking into account the values obtained in the tests 2, 3 and 4 (Figs 3B, 3C and 3D) the mean  $\text{EC}_{10-7\text{d}}$  was 0.0635  $\mu\text{g/l}$  while the mean  $\text{EC}_{50-7\text{d}}$  was 583.83  $\mu\text{g/l}$ .



**Fig 3.** Results of the toxicity tests with aqueous solutions of dichlofluanid and the copepod *Nitocra* sp. 3A: results for concentrations in ng/l (ANOVA,  $p = 0.3236$ ). 3B-3D: Offspring (nauplii and copepodites) produced in concentrations of dichlofluanid in µg/l (figure 3B: ANOVA,  $p = 0.0004$ ; Figure 3C: ANOVA,  $p = 0.0016$ , Figure 3D: ANOVA,  $p < 0.0001$ ; \* statistically significant difference with the acetone control ( $p < 0.05$ ). The error bars show the respective standard deviations.

Studies show that dichlofluanid is capable of causing toxicity to different species. Bellas (2006) studied the effects of dichlofluanid on the larvae development of the bivalve *Mytilus edulis*, the sea-urchin *Paracentrotus lividus* and the ascidia *Ciona intestinalis*, and showed that concentrations between 17 µg/L and 1035 µg/L caused abnormalities in larval development. Embryo-larval tests with the sea-urchin *Glyptocidaris crenularis* showed an increase in abnormal larval development at the highest concentrations (1.5 µM and 4 µM – or 500 µg/l and 1333 µg/l, respectively) and obtained EC<sub>50-50h</sub> of 0.41 µM (92 µg/l) (Xu et al., 2011). For the copepod *Acartia tonsa*, the EC<sub>50</sub> was 1000 µg/l and EC<sub>10</sub> was 11.7 µg/l (Carteau et al., 2014), while for *Crassostrea gigas* the same authors found an EC<sub>50</sub> of 131 µg/l and an EC<sub>10</sub> of 98.7 µg/l. For *Daphnia magna*, previous studies showed acute effects to 50% of organisms (LC<sub>50-48h</sub>) at 370 µg/l (Frazier et al., 1986 apud Wezel and Vlaardingen (2004) and 1800 µg/l (Heimbach, 1983). The above mentioned studies with different aquatic organisms showed effects in the same order of magnitude we found the effects to marine invertebrates (i.e., *Nitocra* sp. and *E. lucunter*), therefore the toxicity ranges obtained in this study are very consistent when compared with the literature.

When the toxicity of dichlofluanid is compared to other anti-fouling biocides, it is possible to observe that the LC<sub>50-96h</sub> of bis-tri-n-butyltin(IV)oxide (TBTO), Irgarol and Diuron to the copepod *Nitocra spinipes* ranged from 13 µg/l (TBTO) to 4500 µg/l (Irgarol and Diuron) Karlsson et al. (2006). Compared to the current study, dichlofluanid seems to be less toxic than the TBTO and more toxic than Irgarol and Diuron. Perina et al. (2011) observed for the sea urchin *Lytechinus variegatus* that for TBT and TPT the NOEC and LOEC were 0.25 µg/l and 0.5 µg/l and for Diuron and Irgarol 1000 µg/l and 2000 µg/l respectively. Through these data a similar comparison can be done to our results, and we can infer that TBT and TPT were shown to be more toxic and Diuron and Irgarol less toxic than dichlofluanid.

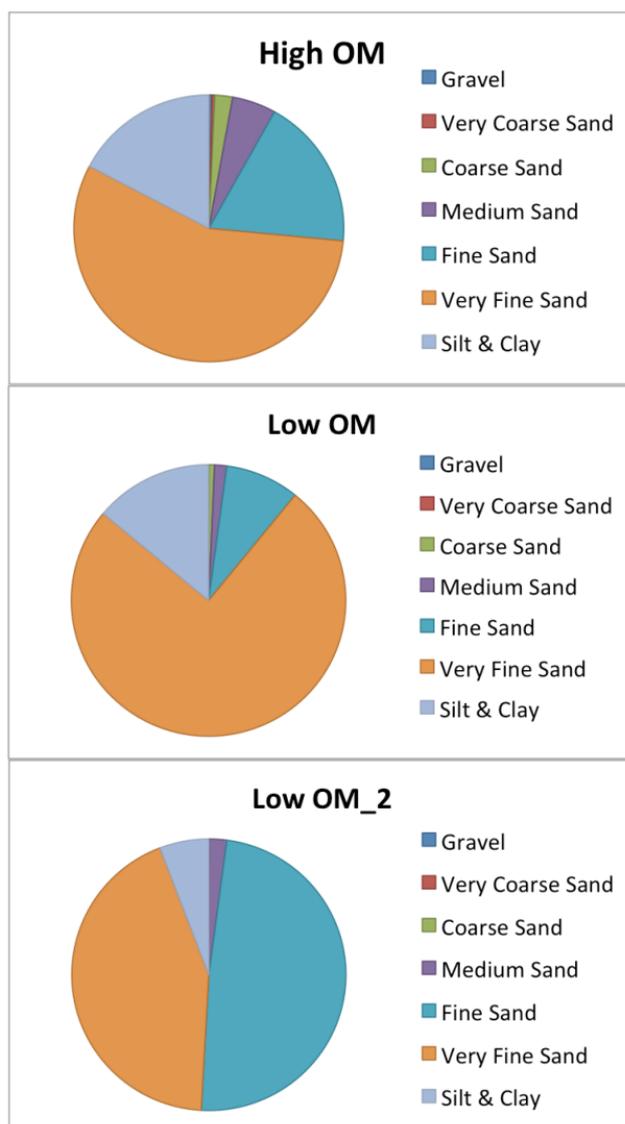
In general, it is possible to observe that for the exposures performed in aqueous solution, the concentration of 1000 µg/l caused more consistent toxic effects, such as embryonic anomalies and reduction of fecundity. This concentration is higher than the highest environmental concentrations found in studies conducted in different parts of the world (Albanis et al., 2002; Carbery et al., 2006; Hamwijk et al., 2005; Lambropoulou et al., 2000; Martinez et al., 2001; Martinez et al., 2000; Sakkas et al., 2002). It is also important to address that dichlofluanid is rapidly degraded in water. At pH > 7 dichlofluanid is rapidly hydrolyzed to dimethylaminosulfanylide (DMSA) (Schouten et al., 2005), and this can lead to a reduction of its toxicity (Hamwijk et al., 2005). Thus, it can be stated that dichlofluanid in water does not cause toxicity to the

organisms studied at environmental concentrations, at least at the short-term exposures considered in this study.

### 3.2. Toxicity tests with spiked sediments

#### 3.2.1. Sedimentological analyses

Figure 4 shows the percentages of each textural class of the different sediments collected, while the table 1 shows the percentages of calcium carbonate, organic matter and percentage of dry weight contained in the different sediments. Both sediments were predominantly composed of fine and very fine sands and muds; thus possible changes of toxicity or subchronic effect would not be caused by the sediment textures. The sediment collected in the Ariri Station (high OM) has a significantly higher percentage of organic matter than the sediment of the Arrozal (low OM and low OM<sub>2</sub>). When the percentages of CaCO<sub>3</sub> were observed, the analyzed sediments did not present significant differences, so this factor possibly did not interfere on the results of toxicity and subchronic effect.



**Fig 4.** Grain size distribution in the three sediments collected in the Cananéia – SP and used in toxicity tests with dichlofluanid.

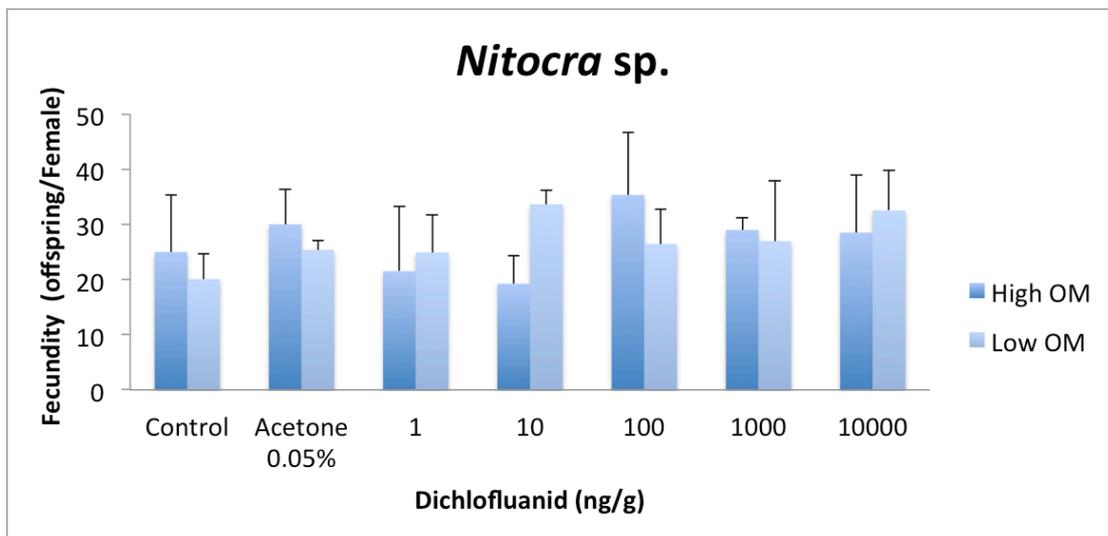
**Tab 1.** Percentages of organic matter (OM), Calcium Carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and dry sediment in the different sediments collected in the Cananéia – SP.

	OM(%)	$\text{CaCO}_3$ (%)	Wet Weight (%)
<b>High OM</b>	10.38 ± 0.19	7.38 ± 0.13	57.18
<b>Low OM</b>	4.00 ± 0.07	5.88 ± 0.27	49.52
<b>Low OM_2</b>	4.00	1.24	20.43

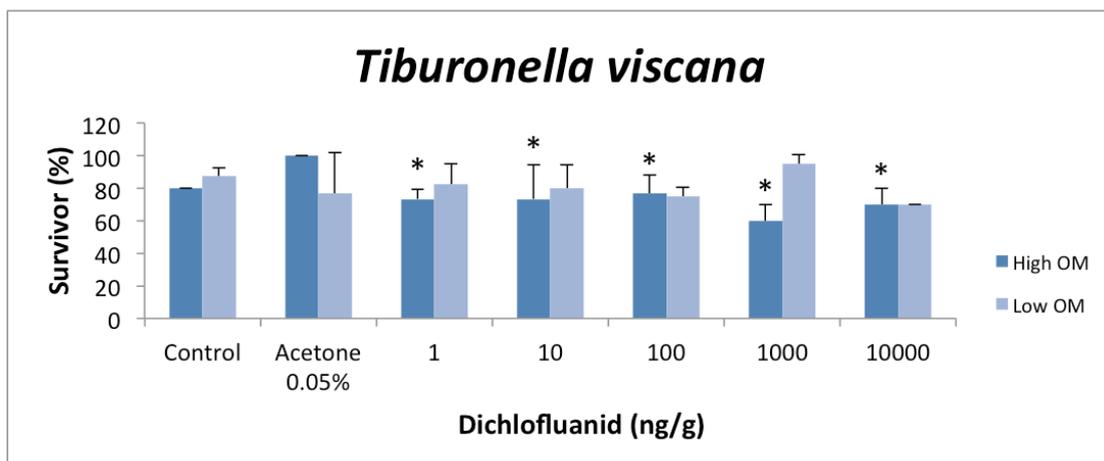
### 3.3.2. Toxicity Tests

The results of the spiked sediment tests are shown in the figures 5 and 6, and the physical and chemical parameters of the overlying waters within the test chambers can be observed in the appendix E and F.

For the copepod *Nitocra* sp., when observing the sediments separately, there were no decreases in the fecundity of the organisms in relation to the acetone control. When the two sediments were compared, no significant differences in the same concentrations were observed. In the test with *T. viscana*, the low OM sediment did not exhibit toxicity at any tested concentration. On the other hand, the high OM sediment produced toxicity in all concentrations tested. Comparing the control with the concentrations of dichlofluanid, no significant difference was observed.



**Fig 5.** *Nitocra* sp. fecundity in sediments spiked with dichlofluanid and containing high and low concentrations of organic matter. (two way ANOVA - interaction,  $p = 0.1864$ ).



**Fig 6.** Survival of adults of *Tiburonella viscana* at different concentrations of dichlofluanid in sediments containing high and low amounts of organic matter (High OM and Low OM respectively). The error bars show the respective standard deviations (two way ANOVA - interaction,  $p = 0.0008$ ).

These differences between the acetone control and all the test concentrations may be detected by the statistical test because the standard deviation of this treatment was zero and thus small mortality rates would be significantly different from the control. There was an increase in mortality of 40% at the concentration of 1000 ng/g and 30% at the concentration of 10000 ng/g, while lower concentrations induced lower mortality percentages. When comparing the two sediments with different organic matter contents, the concentration of 1000 ng/g is the one that presents the greatest difference between the mortalities and based on these information it can be inferred that from this concentration there is an influence of the organic matter in the toxicity of the dichlofluanid. In this matrix, organic compounds tend to partition into organic matter and can establish different chemical interactions that will directly influence its bioavailability and toxicity to benthic organisms (Haitzer et al., 1998; Jones and De Voogt, 1999). Some process, such as biodegradation and volatilization, could influence your persistence in sediments (Jones and De Voogt, 1999; Toan and Mai, 2017). Also, a stability of the compound in the sedimentary matrices was related to a rate or degree of organic matter decomposition (Said-Pullicino et al., 2007). Dichlofluanid may be absorbed and cause toxicity to the organisms of the current study by the food route. Organisms ingests the particles of organic matter and the contaminants when feeding of sediment.

Environmental sediment samples showed levels of dichlofluanid ranging from <1.6 ng/g and 688.2 ng/g in studies conducted in Europe and Asia (Martinez et al, 2001; Sakkas et al., 2002; Thomas et al., 2000; Vouvoulis et al., 2000). Considering the concentration ranges indicated by these studies, we could infer that toxicity could be expected in environment, based on the experiments of the current investigation.

Besides, another study shows that non-target species may be affected by dichlofluanid (Fernandez-Alba et al., 2002). The adoption of adjustment factors allows to estimate the effects of long-term exposure and calculate environmental risks, so that even low environmental concentrations may become risky. In the current study, effects can be expected in concentrations above 1000 ng/g; thus, considering the risk adjustments, environmental risks would be expected due to dichlofluanid, in sediments containing high contents of OM. Bellas (2006) showed that, based on risk quotients, dichlofluanid may present risk to some species.

Moreover, most of the contaminants are not found alone in the environment. A study conducted by Xu et al. (2011) revealed synergistic effects when the compounds of third-generation biocides and heavy metals are placed together in binary mixtures. In that study, the dichlofluanid caused greater toxicities to embryos of a sea urchin species, when combined with different heavy metals. Another study showed the interaction between the biocides of third generation, revealing that these interactions could produce a synergistic toxic response and suggesting that the toxicity of individual substances was not sufficient to determine the environmental impacts of toxicants (Fernandez-Alba et al. 2002).

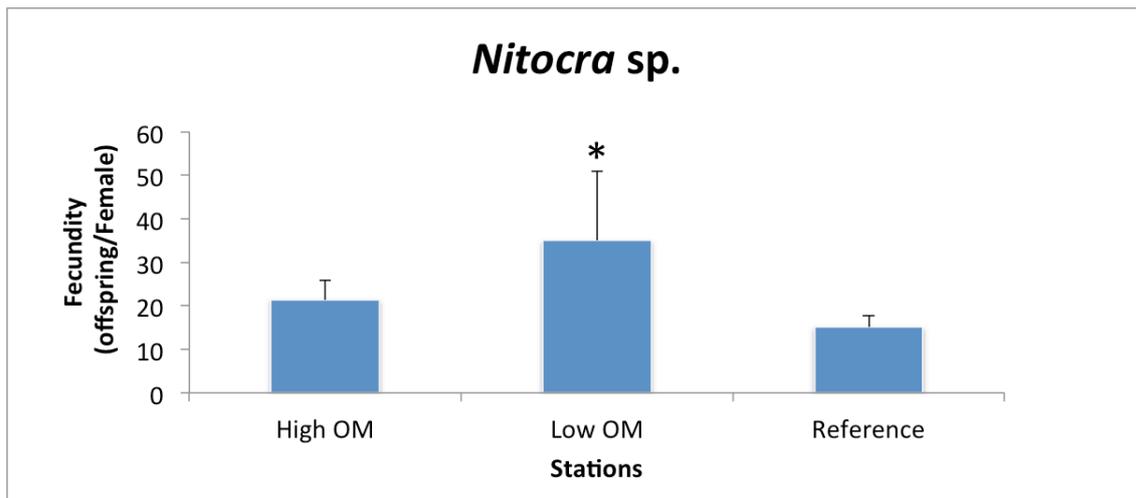
Toxicity tests are commonly employed worldwide and provide information on water and sediment quality, considering the effect of contaminants on organism populations and are important for environmental monitoring (Abessa, 2002). However, these methods are often limited to detecting effects when they have already manifested at higher levels of organization, such as population, which can make them less sensitive to the first signs of effect occurring at biochemical, cellular, and physiological levels. In this sense, when regarding ecological risks, methods aimed to evaluate the toxic and metabolic effects of contaminants, isolated or in combination, at lower levels of biological organization may produce responses at concentrations in which effects were not observed in toxicity tests; thus such approaches are complementary to the conventional endpoints measured in toxicity tests (Pereira, 2004) and necessary to determine the risks of such compounds to the biota. Anyway, in this study dichlofluanid caused toxicity to the tested organisms, and when compared to data from literature it appears to be less toxic than some compounds formerly used as biocides, such as the TBT, but at the same time it seems to be more toxic than some compounds that are still used and anti-fouling biocides in some, countries such as Irgarol and Diuron (Perina et al. 2011; Karlsson et al., 2006).

#### 4. Conclusion

From the data obtained in this research, it is possible to observe that at environmental concentrations, dichlofluanid in water does not cause chronic effects to the *E. lucunter* embryonic development and fecundity of *Nitocra* sp. However, from the concentration of 1000 µg/l, dichlofluanid is capable of affecting the larval development of sea urchin as well as reducing the fecundity of copepods. It also showed acute effect on adults of the copepod *Nitocra* sp. In sediments containing higher quantities of organic matter, dichlofluanid caused acute toxicity from 1000 ng/g and upper (10000 ng/g). Sediments with low quantities of organic matter did not presented toxicity. Thus, theses results suggest that organic matter could reduce the degradation of dichlofluanid and increase the effects and ecological risks of this compound. Our results show that even in the case of a compound that is apparently less toxic and harmful to the environment, further studies are needed to provide proper knowledge on its fate and effects, which includes the interactions between the chemical and environmental variables and the effects at biochemical, cellular, and physiological levels.

## 5. Appendix

**Ap A.** Fecundity of *Nitocra* sp. in sediments rich with organic matter and poor in organic matter when compared with the reference sediment of Ilhabela. (ANOVA,  $p= 0.0536$ ).



**Ap B.** Physical-chemical parameters presented for *Nitocra* sp. tests with environmental sediments collected. DO = Dissolved oxygen; OM = Organic Matter.

<b>Sediment tests</b>						
<b>Initial physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>High OM</b>	0.00113	0.0076	25 $\pm$ 2	7.12	17	5.2
<b>Low OM</b>	0.00452	0.1036	25 $\pm$ 2	7.66	18	4.7
<b>Reference</b>	0.00100	0.0070	25 $\pm$ 2	7.14	19	4.7
<b>Final physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>High OM</b>	0.0002	0.0087	25 $\pm$ 2	7.89	17	3.7
<b>Low OM</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.85	20	4.3
<b>Reference</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.62	20	5.3

**Ap C.** Physical-chemical parameters presented for the *Echinometra lucunter* test. Diclofluanid concentrations expressed in µg/l. DO = Dissolved Oxygen.

<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25±2	7.83	35	7.6
<b>Acetone 0.05%</b>	0.00004	0.00118	25±2	7.74	35	7.7
<b>0.1</b>	<LD	<LD	25±2	7.92	35	7.3
<b>1</b>	<LD	<LD	25±2	7.86	35	7.4
<b>10</b>	<LD	<LD	25±2	7.89	35	7.7
<b>100</b>	<LD	<LD	25±2	7.89	35	7.6
<b>1000</b>	<LD	<LD	25±2	7.91	35	7.6

**Ap D.** Physico-chemical parameters of the dilution water and dichlofluanid concentrations for the *Nitocra* sp. test. (Test 1: ng/l; Tests 2, 3 and 4: µg/l). DO = Dissolved Oxygen.

<b>Test 1</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Initial seawater</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7,30	16	6,9
<b>Final seawater</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7,04	16	8,4
<b>Test 2</b>						
<b>Initial physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.72	19	7.6
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.69	19	6.6
<b>Acetone 0.064%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.56	19	6.8
<b>0.1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.40	19	6.6
<b>1</b>	8.53	117.51	25 ± 2	7.43	19	6.9
<b>10</b>	9.01	101.15	25 ± 2	7.34	19	6.6
<b>100</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.30	19	6.7
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	6.78	19	6.7
<b>Final physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.20	19	7.0
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.21	19	5.1
<b>Acetone 0.064%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.32	19	6.0
<b>0.1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.25	19	5.0
<b>1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.44	19	5.2

<b>10</b>	5.05	122.421	25 ± 2	7.68	19	5.1
<b>100</b>	2.95	47.653	25 ± 2	7.50	19	4.8
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.26	19	4.9

---

**Test 3**

---

**Initial physical-chemical parameters**

---

<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.17	20	5.9
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.38	20	6.3
<b>Acetona 0.064%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.51	19	6.3
<b>0.1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.54	19	5.9
<b>1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.60	19	5.9
<b>10</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.62	20	6.2
<b>100</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.64	20	6.1
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.64	19	6.2

---

**Final physical-chemical parameters**

---

<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 ± 2	6.79	17	6.1
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	6.83	20	5.9
<b>Acetona 0.064%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	6.91	20	5.9
<b>0.1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.00	20	6.0
<b>1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.14	20	5.8
<b>10</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.15	19	5.6
<b>100</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.07	20	5.6
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.06	20	6.0

---

**Test 4**

---

**Initial physical-chemical parameters**

---

<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia</b>	<b>Non-</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO</b>
----------------	----------------------	-------------	--------------------	-----------	-----------------	-----------

	Total (mg/l)	ionized Ammonia ( $\mu$ g/l)				(mg/l)
<b>Control</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.44	17	5.7
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.55	16	5.8
<b>0.1</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.45	16	5.8
<b>1</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.55	17	5.8
<b>10</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.30	16	6.1
<b>100</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.47	17	5.7
<b>1000</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.57	17	5.9

**Final physical-chemical parameters**

Samples	Total Ammonia Total (mg/l)	Non- ionized Ammonia ( $\mu$ g/l)	Temperature	pH	Salinity	DO (mg/l)
<b>Control</b>	0.00096	0.02308	$25 \pm 2$	7.68	17	7.4
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.46	17	6.7
<b>0.1</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.35	17	7.5
<b>1</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.14	17	7.1
<b>10</b>	0.00025	0.00249	$25 \pm 2$	7.29	17	7.8
<b>100</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.54	17	6.7
<b>1000</b>	<LD	<LD	$25 \pm 2$	7.64	17	7.2

**Ap E.** Chemical physical parameters of the *Nitocra* sp. to different concentrations of dichlofluanid and organic matter (OM). Sample concentrations are in ng/g. DO = Dissolved Oxygen.

<b>High Organic Matter Sediment</b>						
<b>Initial physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	0.00132	0.0122	25 $\pm$ 2	7.26	17	5.6
<b>Acetone 0.05%</b>	0.00157	0.0096	25 $\pm$ 2	7.08	17	6.1
<b>1</b>	0.00181	0.0116	25 $\pm$ 2	7.1	17	5.6
<b>10</b>	0.00111	0.1152	25 $\pm$ 2	6.96	17	5.4
<b>100</b>	0.00168	0.0082	25 $\pm$ 2	6.98	17	5.4
<b>1000</b>	0.00238	0.0133	25 $\pm$ 2	7.04	17	5.8
<b>10000</b>	0.00201	0.0120	25 $\pm$ 2	7.07	17	5.6
<b>Final physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	6.45	17	6.6
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	6.46	17	5.7
<b>1</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	6.28	17	6.4
<b>10</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	6.34	17	6.4
<b>100</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	6.09	17	5.4
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	6.48	17	6.2
<b>10000</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	5.13	18	5.3
<b>Low Organic Matter Sediment</b>						
<b>Initial physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.69	18	6.3

<b>Acetone 0.05%</b>	0.00250	0.0304	25 ± 2	7.38	18	4.0
<b>1</b>	0.00210	0.0375	25 ± 2	7.55	18	4.0
<b>10</b>	0.00237	0.0443	25 ± 2	7.57	18	3.8
<b>100</b>	0.00081	0.0094	25 ± 2	7.36	17	4.0
<b>1000</b>	0.00037	0.0049	25 ± 2	7.42	17	3.9
<b>10000</b>	0.00046	0.0062	25 ± 2	7.43	18	4.3

---

**Final physical-chemical parameters**

---

<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.00	20	6.8
<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.99	19	4.5
<b>1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.07	19	4.5
<b>10</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.40	19	4.2
<b>100</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.50	20	4.2
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.54	19	4.2
<b>10000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.71	19	4.0

---

**Ap F.** Physical chemical parameters of *Tiburonella viscana* amphipod exposure experiments at different concentrations of dichlofluanid and organic matter (OM). Sample concentrations are in ng/g. DO = Dissolved Oxygen.

<b>High Organic Matter Sediment</b>						
<b>Initial physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	0.000251	0.00727	25 $\pm$ 2	7.81	34	6.7
<b>Acetone 0.05%</b>	0.000314	0.00777	25 $\pm$ 2	7.74	34	6.5
<b>1</b>	0.000367	0.00931	25 $\pm$ 2	7.75	34	6.4
<b>10</b>	0.000349	0.00945	25 $\pm$ 2	7.78	34	6.5
<b>100</b>	0.000289	0.00877	25 $\pm$ 2	7.83	34	6.4
<b>1000</b>	0.000243	0.00673	25 $\pm$ 2	7.79	34	6.4
<b>10000</b>	0.000307	0.00813	25 $\pm$ 2	7.77	34	6.5
<b>Final physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.42	34	5.5
<b>Acetone 0.05%</b>	0.000125	0.00242	25 $\pm$ 2	7.63	34	5.2
<b>1</b>	0.000123	0.00232	25 $\pm$ 2	7.61	33	5.2
<b>10</b>	0.000138	0.00292	25 $\pm$ 2	7.66	33	5.1
<b>100</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.63	35	4.8
<b>1000</b>	0.000134	0.00278	25 $\pm$ 2	7.66	34	4.8
<b>10000</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.72	34	4.4
<b>Low Organic Matter Sediment</b>						
<b>Initial physical-chemical parameters</b>						
<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 $\pm$ 2	7.88	34	5.6

<b>Acetone 0.05%</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.90	34	5.2
<b>1</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.97	35	5.4
<b>10</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.00	35	5.8
<b>100</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.95	35	4.4
<b>1000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	7.95	35	5.5
<b>10000</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.02	35	5.3

---

**Final physical-chemical parameters**

---

<b>Samples</b>	<b>Total Ammonia Total (mg/l)</b>	<b>Non-ionized Ammonia (µg/l)</b>	<b>Temperature</b>	<b>pH</b>	<b>Salinity</b>	<b>DO (mg/l)</b>
<b>Control</b>	<LD	<LD	25 ± 2	8.26	35	5.3
<b>Acetone 0.05%</b>	0.00304	0.249	25 ± 2	8.29	35	4.9
<b>1</b>	0.00147	0.108	25 ± 2	8.24	38	6.0
<b>10</b>	0.00052	0.067	25 ± 2	8.51	35	5.8
<b>100</b>	0.00136	0.155	25 ± 2	8.45	35	4.0
<b>1000</b>	0.00149	0.163	25 ± 2	8.43	35	5.4
<b>10000</b>	0.00282	0.296	25 ± 2	8.41	35	5.9

---

## Capítulo 2 –Biomarcadores

### **Biomarcadores: água e sedimento artificialmente contaminados com diclofluanida**

#### Resumo

As tintas anti-incrustantes são utilizadas para combater a bioincrustação sobre superfícies submersas. Essas tintas possuem compostos biocidas que podem ser extremamente danosos aos ecossistemas aquáticos. Dentre os diferentes biocidas presentes nas tinta anti-incrustantes, pode ser destacada a diclofluanida, ou N-diclorofluorometiltio-N', N'-dimetil-N-fenilsulfamida ( $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$ ). Pouco se sabe como este princípio ativo pode afetar organismos marinhos. Desta forma é importante que estudos sobre o tema sejam realizados, visando avaliar os efeitos biológicos deste contaminante. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da diclofluanida em nível celular e bioquímico, utilizando bivalves expostos em água do mar e sedimento contaminado com este biocida, considerando ainda sedimentos com duas diferentes concentrações de matéria orgânica. Foram feitos teste de exposição em água, com bivalves da espécie *Perna perna*, e em sedimento, com o bivalve *Anomalocardia flexuosa*. Em seguida, em *P. perna* foi usado ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro, enquanto para ambas as espécies foram analisados biomarcadores bioquímicos, como dano em DNA, LPO, GSH, GST, EROD, AChE e GPx. Para os sedimentos também foram realizadas as análises granulométricas, do teor de carbonatos e de matéria orgânica. Em água, foi possível observar efeito nas maiores concentrações, no ensaio do vermelho neutro, denotando perda da estabilidade lisossômica. Para os biomarcadores também foi possível observar alterações nas glândulas digestivas e brânquias. Em sedimento é possível observar efeito em ambos os órgãos sendo mais expressivos nos sedimentos com maiores teores de matéria orgânica. Baseado nos resultados deste estudos, concentrações ambientais de diclofluanida são passíveis de causar efeitos aos organismos estudados.

Palavras-chave: Diclofluanida, biomarcadores, ecotoxicologia, matéria orgânica.

## 1. Introdução

A bioincrustação pode ser definida como o assentamento de organismos sobre superfícies submersas em água. Essas estruturas podem ser exemplificadas como plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura e pequenas e grandes embarcações. Nesse último caso, a incrustação pode aumentar em até 40% o consumo de combustível, a corrosão dos cascos e também o tempo de navegação, e como consequência gerar custos adicionais para a indústria naval. Além disso, com a locomoção de embarcações por grandes distâncias, organismos podem ser introduzidos em diferentes localidades, onde antes não estavam presentes. Essas espécies exóticas podem causar desequilíbrios nas cadeias tróficas ou até mesmo a extinção de espécies devido às complexas interações entre os organismos. Dessa forma, para combater a bioincrustação sobre as superfícies de importância econômica e social, foram desenvolvidas tintas anti-incrustantes (Almeida et al, 2007a; Yebra et al., 2004). Em geral, essas tintas são compostas por biocidas que inibem a formação e assentamento larval nas superfícies submersas (Thomas and Brooks, 2010).

Os compostos anti-incrustantes podem ser caracterizados como substâncias potencialmente danosas aos ecossistemas aquáticos. Devido à extensiva utilização desses compostos em áreas com grande fluxo de embarcações, como portos, marinas, estaleiros e zonas de fundeio, os compostos acabam sendo liberados e lixiviados a partir das pinturas, podendo então atingir a coluna d'água e outros compartimentos ambientais, como os sedimentos e a biota (Thomas and Brooks, 2010). Alguns estudos relacionando a ocorrência ambiental de biocidas anti-incrustantes têm sido publicados na literatura especializada (Albanis et al., 2002; Gatidou et al., 2007; Harino, 2009; Mukherjee et al., 2009; Thomas and Langford, 2009).

O mercado de anti-incrustantes foi dividido por três gerações de tintas: as primeiras tinham como princípio ativo óxidos de cobre e de zinco, porém eram pouco eficientes. Num segundo momento, surgiram as tintas à base de compostos organoestânicos, como tributil estanho (TBT) (Fent, 2003; Fernandez and Pinheiro, 2007), as quais foram banidas devido aos seus efeitos tóxicos e potencial como desreguladores endócrinos. Assim, uma terceira geração de tintas anti-incrustantes foi introduzida no mercado. Estas possuem em sua composição compostos não metálicos e compostos metálicos, sendo que num mesmo produto podem ser combinados até 4 compostos (Castro et al., 2011; IMO, 2000; Okamura and Mieno, 2006).

Alguns estudos mostraram que os biocidas de terceira geração presentes nas composições das tintas anti-incrustante vêm sendo encontrados no ambiente, tanto em água como nos sedimentos (Albanis et al., 2002; Carbery et al., 2006; Hamwijk et al., 2005; Lambropoulou et al., 2000; Martinez et al., 2001, 2000; Sakkas et al., 2002; Thomas et al., 2002; Vouvoulis et al., 2000). Dentre os compostos de terceira geração, está presente a diclofluanida, ou N-diclorofluorometiltio-N', N'-dimetil-N-fenilsulfamida ( $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$ ). Trata-se de um composto orgânico não metálico pertencente à classe dos organoclorados, insolúvel em água e com potencial de se acumular e associar com material particulado ( $Kow = 3,7$ ) (Dafforn et al., 2011; Evans et al., 2000). É utilizada como fungicida e tem efeito mutagênico e carcinogênico (Fernandez-Alba et al., 2002).

Alguns estudos mostram como a diclofluanida pode afetar invertebrados marinhos não-alvos (Bellas, 2006; Xu et al. 2011). Porém tais estudos ainda são escassos, sendo necessárias investigações que avaliem o efeito biológico desses compostos sobre organismos aquáticos tropicais, o que inclui o disparo de modificações prévias em processos biológicos. Dentre esses estudos pode-se citar a análise de biomarcadores, que avalia precocemente evidências de exposição e/ou efeitos dos contaminantes (Depledge, 1994). Segundo Walker et al. (1996), biomarcadores são indicadores bioquímicos, fisiológicos ou histológicos, dos químicos xenobióticos presentes no ambiente, em nível de organismo ou de "sub-organismo". Suas respostas, desde níveis moleculares e bioquímicos (ou seja, sub-celulares), podem ser utilizadas potencialmente como um sinal prévio de efeitos tóxicos, uma vez que o ponto de partida de todos os danos causado por xenobióticos envolve perturbações de processos bioquímicos e moleculares no interior das células, posteriormente dando origem aos efeitos em níveis maiores de organização (Cheung et al., 1998).

Trata-se de uma ferramenta bastante difundida e confiável (Bonnineau et al., 2012). Os biomarcadores podem ser divididos em três classes: biomarcadores de susceptibilidade, efeito e exposição. Os biomarcadores de susceptibilidade podem ser denominados como aqueles que na presença de alterações genéticas e modificações em receptores químicos, alteram a susceptibilidade de um organismo à exposição de um xenobiótico. Os de efeito geram prejuízos às funções essenciais de células, tecidos e organismos, afetando de fato a saúde destes organismos. E por último os biomarcadores de exposição indicam alterações metabólicas devido à exposição a algum tipo de agente estressor (Henderson et al., 1987; WHO, 1993).

Estudos feitos com biomarcadores têm utilizado organismos como peixes e invertebrados, os quais se mostram bons modelos biológicos (Geracitano et al., 2004; Hannam et al., 2008). Dentre os invertebrados, os moluscos têm grande importância ecológica e comercial e vêm sendo bastante utilizados em pesquisas (Pereira et al., 2014; Silva-Cavalcanti and Costa, 2011; USEPA, 1993). Trata-se de organismos de coleta fácil, que permitem a obtenção e o uso de grande número de indivíduos por experimento. Seu hábito sésil garante a exposição a contaminantes. Assim, consistem em indicadores adequados de qualidade ambiental e poluição (Abessa et al., 2005; Almeida et al., 2007b; Kehrig et al., 2006). Em particular, os bivalves têm uma vantagem adicional para serem utilizados biomonitores da poluição devido à sua importância na cadeia alimentar dos ecossistemas estuarinos e importância comercial para as populações locais.

Os bivalves são animais filtradores e ficam em contato direto com a água e/ou o sedimento. Estas duas matrizes ambientais são importantes na indicação da saúde dos ecossistemas aquáticos (Power and Chapman, 1992). O compartimento água inclui a presença todos os compostos e contaminantes que são liberados ao ambiente, mesmo aqueles pouco solúveis e que permanecem pouco tempo na coluna d'água, pois o material em suspensão pode conter substâncias hidrofóbicas ou partículas com carga elétrica, capazes de adsorver substâncias ionizáveis. Já o sedimento tem alta capacidade de acumular contaminantes ao longo do tempo (Nipper et al., 1990). Alguns sedimentos são ricos em matéria orgânica (OM) e isso poderia ser um fator interessante a ser estudado, porque a OM tem a capacidade de ligar e adsorver compostos orgânicos devido à sua afinidade por compostos hidrofóbicos (Karapanagioti et al., 2000; Stevenson, 1994), além de conter sítios ativos capazes de interagir com íons e outras substâncias possuidoras de carga elétrica. Interações com essas matrizes podem afetar a toxicidade e a biodisponibilidade de compostos orgânicos em organismos aquáticos (Haitzer et al., 1998).

Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da diclofluanida, em nível celular e bioquímico, sobre bivalves expostos em água do mar e sedimento contaminado com diclofluanida, neste último caso considerando sedimentos com diferentes concentrações de matéria orgânica.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Exposição subcrônica

#### Exposição em água

Para avaliar o efeito dos micropoluentes ao nível bioquímico foram utilizados mexilhões da espécie *Perna perna* como modelo biológico. Esses organismos foram adquiridos em cultivo localizado na praia da Cocanha, Caraguatatuba, São Paulo (23°34' 40,0"S – 45°18' 52,8"W), tendo sido trazidos ao laboratório e aclimatados às condições teste.

O experimento foi realizado de acordo com USEPA (1993, 2000). Foram montadas 3 réplicas em câmaras contendo 10L de água do mar filtrada. Os tratamentos consistiram em soluções de diferentes concentrações de diclofluanida (0,01µg/L, 0,1 µg/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L). Em paralelo, controles negativos contendo água do mar (coletada na costa e livres de poluição) foram preparados. Além disso, um controle analítico ("Branco analítico), contendo apenas acetona diluída em água do mar, foi preparado. As soluções foram preparadas de modo que o volume de acetona ficou em 0,05% do volume total de água. Em todos os testes, parâmetros físico-químicos, como pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia, foram medidos e controlados para garantir que esses parâmetros permanecessem dentro das faixas aceitáveis e, portanto, tais variações não interferissem nos resultados do teste. Os primeiros quatro parâmetros foram medidos com eletrodos apropriados e a amônia foi medida por método colorimétrico de acordo com o protocolo descrito por Verdouw et al. (1978).

O sistema-teste foi mantido em equilíbrio sob uma aeração suave, temperatura de 25 ± 2 °C e com fotoperíodo (12h claro: 12h escuro). Após 24h de equilíbrio, foram realizadas as fortificações com diclofluanida e 12 organismos saudáveis de *P. perna* foram introduzidos em cada uma das 3 réplicas. O teste teve duração de 96h, e a cada 24 horas, ou quando os organismos desovavam, a água (ou solução-teste) era trocada e uma nova fortificação era realizada com o intuito de manter as concentrações de diclofluanida e para que uma eventual desova não gerasse estresse aos organismos, pela alteração da qualidade da água. Após 48h e 96h de exposição, foram retirados 5 organismos por réplica de cada concentração para realização do ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro. Ao final, os organismos sofreram eutanásia e seus tecidos (brânquias e glândulas digestivas) foram retirados, congelados em -80°C e posteriormente analisados para os biomarcadores bioquímicos.

### Exposição em sedimento

Dois tipos de sedimentos foram utilizados para a segunda bateria de experimentos. Estes sedimentos continham diferentes concentrações de matéria orgânica (MO): um sedimento possuía baixo teor de matéria orgânica ( $\approx 4\%$ ) enquanto o outro apresentava maior teor ( $\approx 10\%$  MO); ambos os sedimentos foram coletados em dois locais distintos de Cananéia, no litoral sul do estado de São Paulo. O sedimento com baixo teor de MO foi coletado no Arrozal ( $25^{\circ} 02,415' S$  e  $47^{\circ} 55,540' W$ ) e o sedimento com alto teor de MO foi coletado no Ariri ( $25^{\circ} 13,215' S$  e  $48^{\circ} 02,492' W$ ). Ambos os sedimentos foram enriquecidos com diclofluanida para comparar as diferenças de toxicidade considerando as porcentagens de MO. Assim como os testes com soluções aquosas, foram feitos controles negativos (controle livre de diclofluanida) e branco analítico (controle contendo acetona - utilizado ) com os mesmos sedimentos. As concentrações de diclofluanida no sedimento foram: 1 ng/g, 10 ng/g, 100 ng/g, 1000 ng/g e 10000  $\mu\text{g/g}$ .

Para a exposição em sedimento, foram utilizados bivalves da espécie *Anomalocardia flexuosa* (berbigão ou vôngole) como modelo biológico. Organismos adultos da espécie *A. flexuosa* foram coletados em bancos de sedimento na região de Cananéia, São Paulo ( $25^{\circ} 02,415' S$  e  $47^{\circ} 55,540' O$ ) sendo levados ao laboratório e aclimatados às condições teste. Os experimentos foram realizados de acordo com USEPA (1993, 2000). Foram montadas 6 réplicas em câmaras de vidro contendo uma camada de aproximadamente 4 cm de sedimento e 1,5 L de água do mar filtrada. Os sistemas foram mantidos em equilíbrio sob uma aeração suave e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após 24h foram colocados 7 indivíduos saudáveis de *A. flexuosa* em cada uma das réplicas. Os testes foram mantidos em fotoperíodo (12h claro: 12h escuro), com aeração e temperatura constantes, e tiveram duração de 21 dias. Para todos os testes, foram avaliados parâmetros físico-químicos, como pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia, utilizando os mesmos métodos previamente descritos nos ensaios com soluções aquosas.

## 2.2. Análise sedimentológica

### Granulometria

A granulometria dos sedimentos foi analisada com base no protocolo proposto por Mudroch and MacKnight (1994). O carbonato de cálcio não foi removido, pois é parte integrante do sedimento e também devido às implicações ecológicas e ecotoxicológicas. Três alíquotas de 30g de cada amostra foram separadas e secas em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 2 dias. Este material foi lavado em uma peneira de  $0,063 \mu\text{m}$  para

separar partículas finas (silte e argila). Posteriormente, o material arenoso retido na malha de 0,063  $\mu\text{m}$  foi seco em estufa a 60 °C por 2 dias. Em seguida, foi pesado e peneirado por 15 minutos em um agitador RO-TAP, em diferentes malhas (escala  $\phi$ ), a fim de separar diferentes classes de areia, e os resultados foram classificados com base na Wentworth Scale (Wentworth, 1922). Depois, com base nos valores obtidos para as três alíquotas, uma média aritmética simples foi calculada.

#### Teor de Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ )

O teor de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em cada amostra foi medido usando o método descrito por Hirota and Szyper (1975), que consiste em separar 3 frações de 5 g de cada amostra de sedimento e em seguida adicionar 10 ml de ácido clorídrico (5N HCl) durante tempo superior a 24 horas para eliminar carbonatos de cálcio. As amostras foram então lavadas com água destilada e depois secas em estufa a 60°C. A partir da perda de peso dos sedimentos observada, foi possível calcular a porcentagem de  $\text{CaCO}_3$  presente na amostra. Em seguida, foi calculado o valor médio obtido nas três alíquotas.

#### Teor de Matéria Orgânica (MO)

Os teores de material orgânica (MO) nas amostras de sedimento foram estimados pelo método de ignição (Luczak et al., 1997), que consiste em separar três alíquotas de 5 g de sedimento seco e incinerá-las em mufla (500° C) por 4 horas. A porcentagem de MO é igual ao peso perdido na incineração. Em seguida, foi calculado o valor médio obtido nas três alíquotas.

### 2.3. Contaminação dos Sedimentos

Os sedimentos contaminados (fortificados) foram preparados com base nos protocolos de ASTM (2008) e Fuchsman and Barber (2000). As quantidades de diclofluanida, nas concentrações apropriadas, foram adicionadas ao sedimento levando em consideração apenas a porcentagem de massa seca de sedimento. O sedimento úmido foi particionado em alíquotas onde as diferentes concentrações de diclofluanida foram adicionadas. O controle (sedimento sem contaminantes) e o branco analítico (sedimento limpo contendo acetona) também passaram pelo mesmo procedimento. Todos os sedimentos foram agitados por quinze minutos com a ajuda de um equipamento que faz a rotação multidirecional do sedimento em um recipiente de vidro hermeticamente fechado. Após o procedimento de mistura, os sedimentos contaminados foram mantidos no escuro e resfriados (4 °C) por 72 horas, a fim de estabelecer o equilíbrio do contaminante com a água intersticial e a fração sólida do

sedimento. Em seguida, os sedimentos foram distribuídos nas câmaras-teste para os experimentos de exposição.

#### 2.4. Biomarcadores

##### Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)

A análise do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro (TRCVN) em lisossomos de hemócitos seguiu os procedimentos descritos por Lowe et al. (1995). Este biomarcador foi analisado apenas no experimento realizado em água. O ensaio para avaliação do TRCVN tem por hipótese que células saudáveis conseguem reter o corante vermelho neutro por determinado período de tempo, enquanto que danos na integridade e estabilidade da membrana lisossomal causados pelo acúmulo de xenobióticos diminuem o tempo de retenção do corante, induzindo o vazamento de componentes do lisossomo para o citosol mais rapidamente.

Previamente à execução do teste, lâminas foram pré-tratadas com solução de Poly-L-lisina para facilitar a adesão de hemócitos. Foram extraídas amostras de 0,5mL de hemolinfa do músculo adutor dos mexilhões com o auxílio de uma seringa hipodérmica contendo 0,5mL de solução fisiológica. Após 20 minutos, 40µL desta solução de células foi aplicada sobre a lâmina. O conjunto de lâminas com hemócitos foi mantido em câmara escura e úmida por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 40µL de solução de vermelho neutro sobre cada lâmina contendo os hemócitos. Após 15 minutos de incubação as lâminas foram cobertas com as respectivas lamínulas.

Em seguida, as lâminas foram sistematicamente examinadas em microscópio a cada 15 minutos na primeira hora até no máximo 120 min. As células foram examinadas e foi avaliado o tempo de retenção do vermelho neutro pelos lisossomos. O TRCVN foi obtido pela estimativa da proporção de células extravasando os lisossomos para o citosol. Quando 50% ou mais das células tiveram perda de material, os respectivos organismos foram considerados estressados. O valor usado para o cálculo do tempo de retenção corresponde ao último período anotado em que não houve evidência de estresse.

##### Biomarcadores Bioquímicos

As brânquias e glândulas digestivas de *P. perna* e *A. flexuosa* foram mantidas em gelo e homogeneizadas em tampão Tris-HCl (TRIS 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; Sacarose 50 mM; KCl 150 mM; PMSF 100 mM, pH= 7,6). Após homogeneização,

foram separadas alíquotas para as análises de proteína total (PT), dano em DNA e peroxidação lipídica (LPO).

A seguir, os homogenatos foram centrifugados a  $12.000 \times g$  por 20 min a  $4^\circ C$  e amostras foram separadas para as análises de proteína total, Glutathione S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPx), bem como para a quantificação de tióis reduzidos não proteicos (GSH), atividade da acetilcolinesterase (AChE), Etoxiresorufin O-deetilase (EROD) e dibenzilfluoresceína (DBF). Todas as análises de biomarcadores foram realizadas em um leitor de microplacas da marca Biotek, modelo Synergy™ HT.

### Proteínas Totais

As PT foram quantificadas através do método de Bradford (Bradford, 1976). Este método baseia-se na interação do corante BG-250 com as proteínas, que provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, a qual absorve luz no comprimento de onda de 595nm. Foi utilizado o “Bovine Serum Albumine” (BSA), ou soro da albumina bovina, como padrão. As proteínas totais são utilizadas para normalização de todos os biomarcadores.

### Dano em DNA

A ocorrência de dano em DNA foi analisada pelo ensaio de precipitação alcalina, proposto por Olive (1988), utilizando fluorescência para quantificar vestígios de DNA (Gagné and Baise, 1993), os resultados são expressos em micrograma de DNA sobrenadante por miligrama de proteína. O método baseia-se na lise de células pela precipitação do dodecilsulfato de potássio. Esse precipitado contém proteína celular e ácidos nucleicos em estreita associação aos níveis de proteína. O DNA é quebrado e fica disponível no sobrenadante após a centrifugação, sendo então quantificado utilizando o método de fluorescência ( $\lambda_{ex}$  360 nm e  $\lambda_{em}$  450 nm) após a coloração com o corante Hoescht. Soluções padrões de DNA de esperma de salmão foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos em  $\mu g/mg$  de proteína.

### LPO

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram determinados quantificando a concentração de substratos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) através de fluorescência ( $\lambda_{ex}$  532nm e  $\lambda_{em}$  556nm) (Wills, 1987). A concentração de lipídios peroxidados foi expressa em  $\mu M$  TBARS/mg de proteínas utilizando tetrametoxipropano (TMP) como padrão. Nesse método os produtos primários como hidroperóxido lipídico e outros produtos secundários ou finais do processo de

peroxidação lipídica como os dienos conjugados são avaliados e expressos como substâncias reativas com TBARs.

#### AChE

O método baseia-se em medir a taxa de produção de tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) para produzir o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato. A taxa de produção de cor é medida em 412 nm utilizando o método colorimétrico de Ellman et al. (1961). Resultados foram expressos em  $\mu\text{mol DNTB}/\text{min.}/\text{mg}$  de proteína.

#### GSH

A dosagem de GSH foi determinada através da quantificação de grupos sulfidríla presentes na amostra, diferenciando o resultado em quantidade de grupo sulfidríla proteico e não proteico, de acordo com o método descrito por (Sedlak and Lindsay, 1968). Os níveis de GSH foram medidos espectrofotometricamente a 415 nm, e os resultados foram expressos em nmol glutationa/mg proteína.

#### GPx

As GPx são enzimas que reduzem uma variedade de peróxidos aos seus álcoois correspondentes. Elas convertem peróxido de hidrogênio a água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto. As GPx foram determinadas espectrofotometricamente a 340 nm baseado no método de Sies et al. (1979). Resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

#### GST

A atividade da GST foi medida a 340 nm a 25°C, em leitor de microplacas, segundo o método de Habig et al. (1974), usando 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, Sigma) e 1 mM de glutationa reduzida (GSH), a pH 7,0. Uma unidade de GST representa a quantidade de enzima necessária para conjugar 1  $\mu\text{mol}$  de CDNB por minuto e por miligrama de proteínas totais. Essa enzima apresenta como função promover a conjugação de compostos endógenos e xenobióticos bio-transformados, participando do processo de detoxificação celular, tornando-os hidrossolúveis, visando facilitar sua excreção (Keen et al., 1976; Pereira, 2004). Os resultados foram expressos em OD/min/mg de proteína.

### EROD

A atividade da EROD foi avaliada pelo método adaptado de Gagné and Blaise (1993). A transformação de 7-hidroxioresorufina em resorufina foi determinada fluorometricamente ( $\lambda_{ex}$  520nm e  $\lambda_{em}$  590nm). A determinação da 7-hidroxioresorufina nas amostras foi realizada utilizando uma curva de calibração padrão de 7-hidroxioresorufina. Os resultados foram expressos como pmol/min./mg de proteína.

### DBF

A determinação da atividade DBF foi realizada de acordo com o método de Gagné et al. (2007). Utilizou-se como substrato 10  $\mu$ M de dibenzilfluoresceína e foi incubado com solução de 1 mM de NADPH. Foi medida a fluorescência ( $\lambda_{ex}$  485 nm e  $\lambda_{em}$  516 nm). Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

## 2.5. Forma de Análise dos Resultados

Os resultados do teste de retenção do vermelho neutro foram submetidos a teste de normalidade e homocedasticidade e posteriormente foi realizada uma ANOVA de uma via com o teste a posteriori de Dunnet para avaliar se houve diferença significativa no tempo de retenção do vermelho neutro entre as concentrações de diclofluanida, branco analítico (acetona) e o controle. Os resultados dos testes de exposição subcrônica (biomarcadores) foram verificados por teste de normalidade (komolgorov smirnov) e posteriormente foi realizada uma ANOVA de uma via com o teste a posteriori de Dunnet (ou teste não paramétrico equivalente) para avaliar se houve diferença significativa entre as concentrações de diclofluanida, branco (acetona) e o controle nos testes de água e uma ANOVA de duas vias com teste a posteriori de bonferroni (ou PERMANOVA para dados não paramétricos) para avaliar se houve diferença entre as concentrações de diclofluanida e os controles e também para ver se houve diferença entre tipos de sedimentos nos testes de exposição que continham matrizes de sedimentos com diferentes concentrações de matéria orgânica. Foi realizada também uma PERMANOVA para os resultados obtidos nos experimentos com água levando-se em consideração o conjunto de biomarcadores (GSH, GST, GPx, EROD, DBF, AChE, LPO e DNA) e para sedimento com o mesmo conjunto de biomarcadores exceptuando o DBF, devido ao pequeno número de réplicas que ele apresentou para as diferentes concentrações de diclofluanida. Os resultados obtidos nos testes de exposição subcrônica (biomarcadores) foram integrados usando uma análise de componentes principais (PCA).

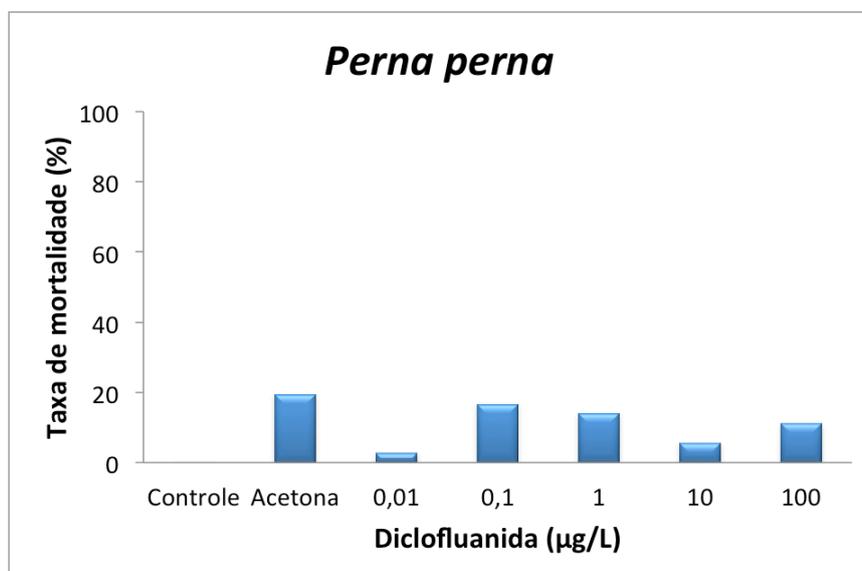
### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Exposição em água

##### Exposição de *Perna perna*

Os parâmetros físico químicos da água do mar no local de cultivo dos mexilhões *Perna perna*, assim como nas soluções durante os testes realizados, estão apresentados nos anexos G e H. Houve troca total da água diariamente e a cada troca foram produzidas novas soluções-teste nas concentrações testadas.

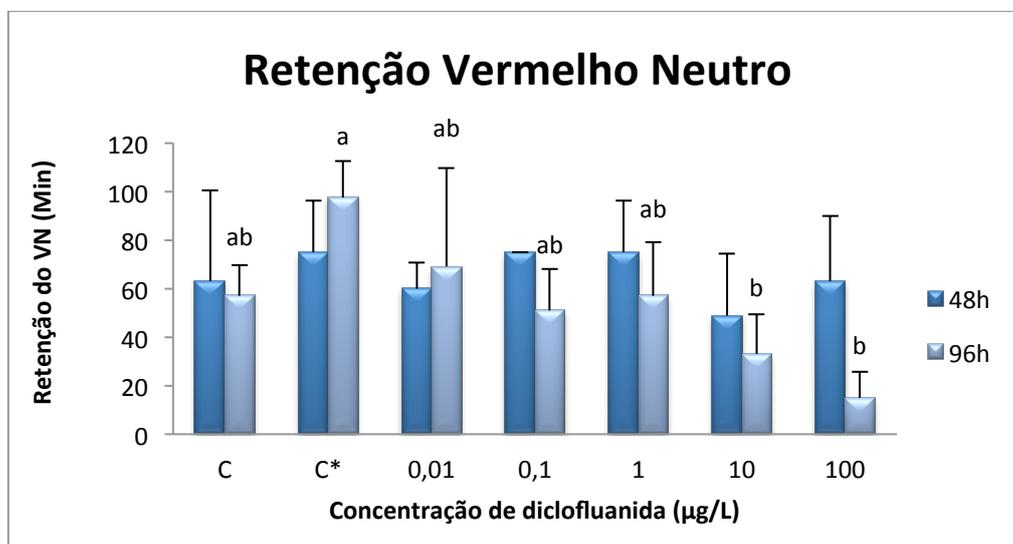
Para cada concentração foram expostos 12 organismos em triplicata (n total = 36). Na figura 7 estão apresentados o número total de mortos por concentração ao longo da exposição. Essa mortalidade não foi superior a 20% do total de organismos expostos. Organismos que morreram no teste foram imediatamente removidos do sistema e a água também foi substituída imediatamente após a sua retirada. Porém o tempo decorrido até essas trocas pode ter gerado algumas oscilações temporárias nas condições da água. Como observamos nos parâmetros físico-químicos, houve algumas variações nos valores de amônia e oxigênio dissolvido, as quais tiveram curta duração; esse problema foi facilmente resolvido com a retirada dos organismos dos aquários e a troca de água imediata, evitando que pudessem interferir de forma relevante nos resultados.



**Fig 7.** Taxa de mortalidade de *Perna perna* ao longo das 96 horas de exposição.

### Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro

A figura 8 apresenta os tempos de retenção do vermelho neutro após 48 e 96 horas de exposição às soluções de diclofluanida. Os organismos no tempo inicial tiveram uma média de tempo de retenção de 40,5 minutos.



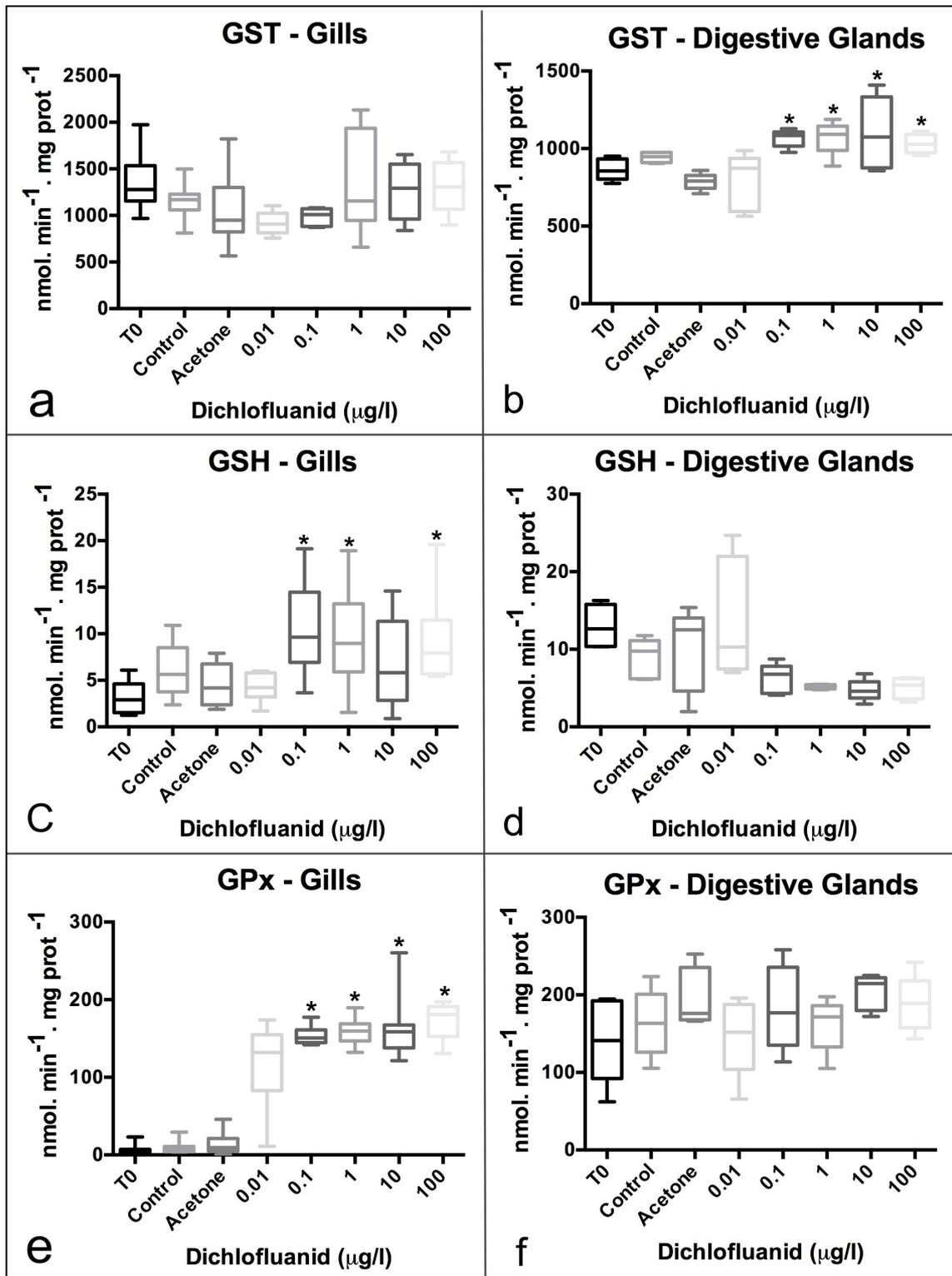
**Fig 8.** Tempo de retenção do vermelho neutro para 48 horas e 96 horas de exposição de organismos da espécie *Perna perna* em diferentes concentrações de diclofluanida, expressas em µg/L (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Letras representam diferença estatística significativa com o controle acetona ( $p < 0,05$ ). As barras de erros mostram os respectivos desvios-padrão. C= controle e C\*=controle acetona 0,05%.

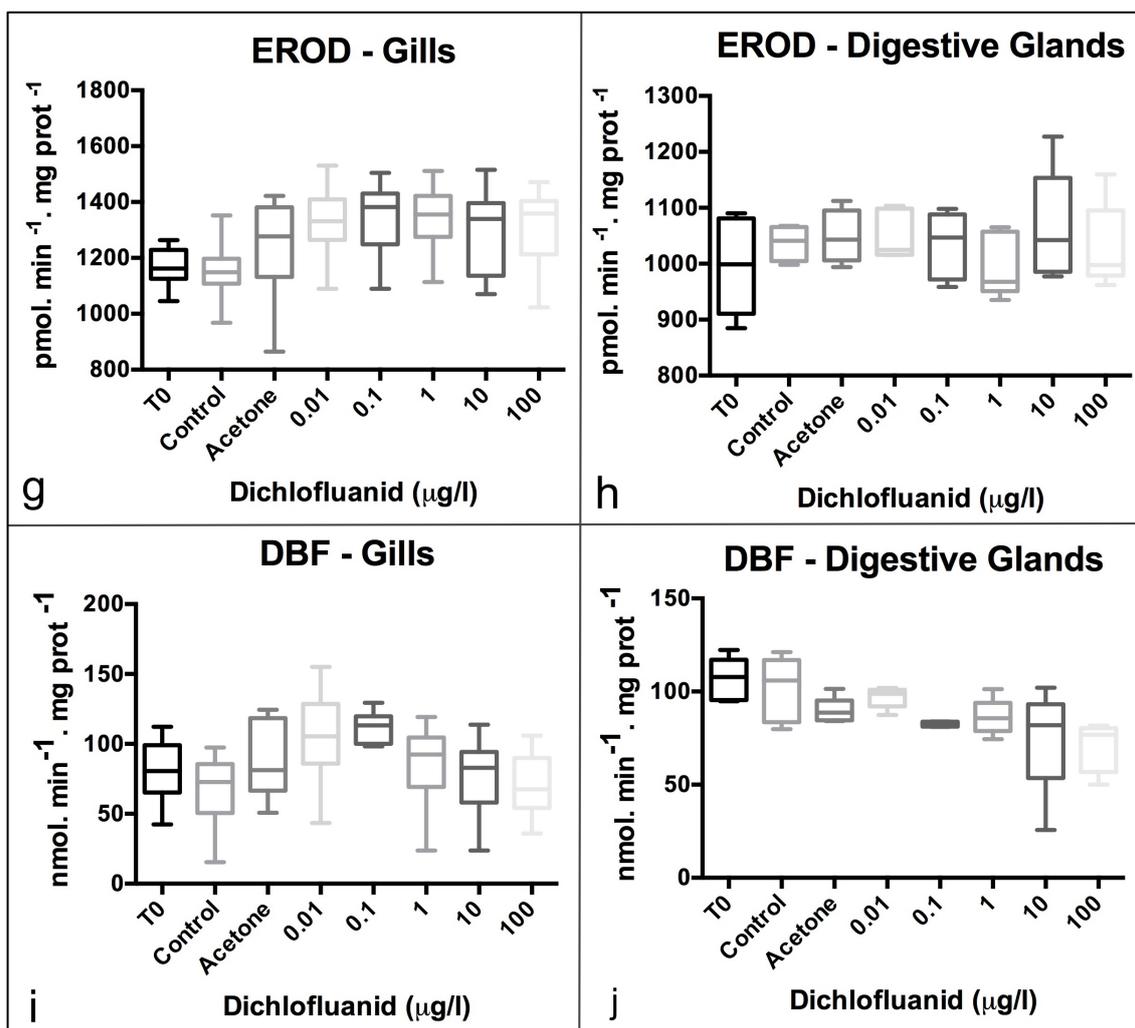
O tempo de retenção do vermelho neutro ao final da exposição foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) para os animais expostos a 10 µg/L (Tempo de retenção médio = 33 minutos) e 100 µg/L (Tempo de retenção médio = 15 minutos) quando comparados ao controle acetona (tempo de retenção médio = 97,5 minutos) após 96 horas. Para 48 horas não foram encontradas diferenças significativas do tempo de retenção quando comparado ao controle. Hagger et al. (2005) mostra que para o mexilhão *Mytilus edulis*, o aumento de citotoxicidade do TBT através da técnica do vermelho neutro ocorreu em concentrações maiores que 0,5 µg/L e tempo menor do que o medido no presente estudo, o que demonstra que a diclofluanida pode ser menos citotóxica aos organismos do que o TBT, composto já banido por vários países.

### Biomarcadores de exposição e efeito

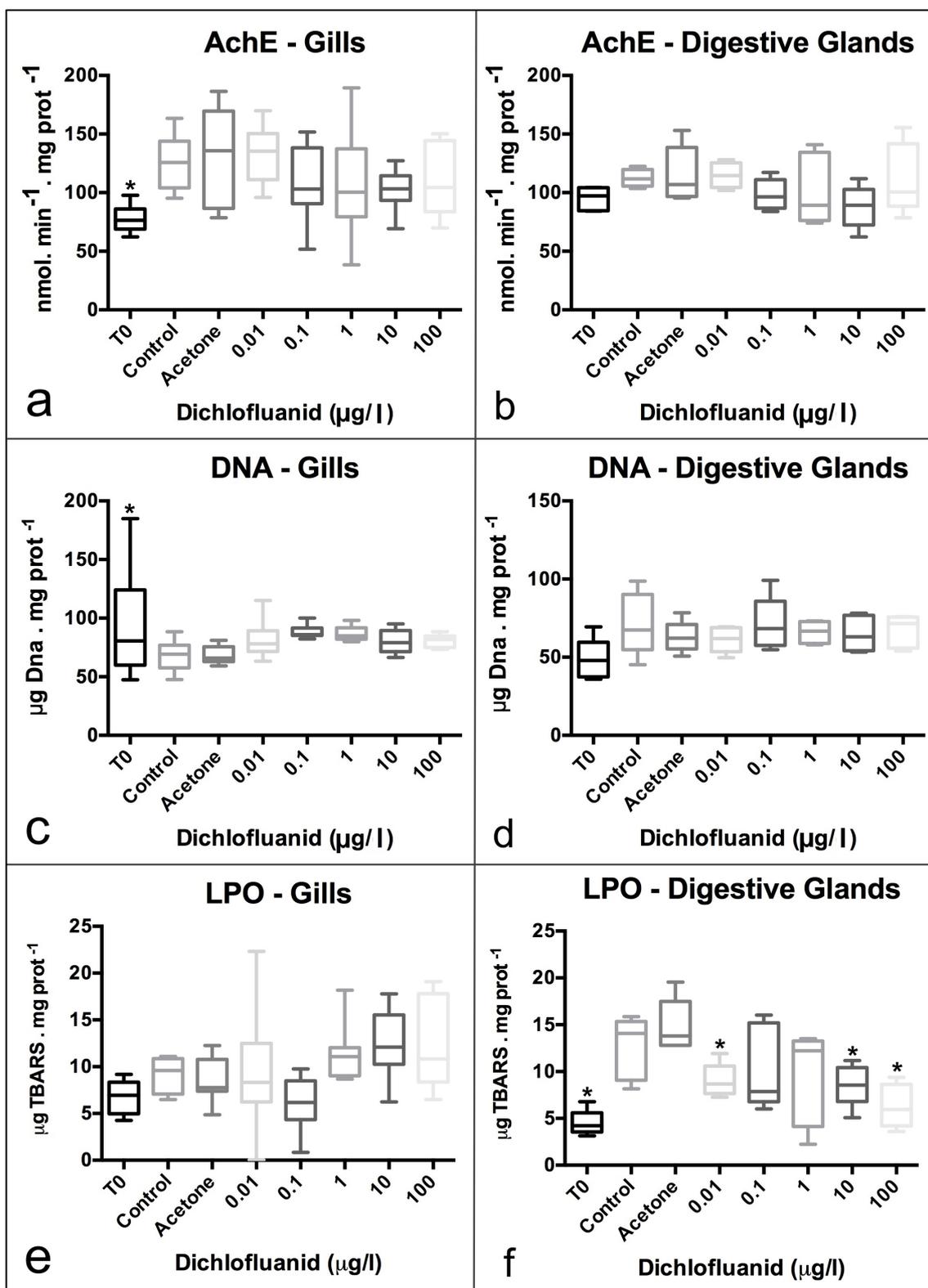
Na figura 9 são apresentados os resultados dos biomarcadores de exposição. Foi possível observar uma indução da atividade para GST nas glândulas digestivas nas maiores concentrações de diclofluanida, bem como um aumento dos níveis de GSH e da atividade da GPx nas brânquias, nas mesmas concentrações. Esta indução do sistema antioxidante já foi observada para compostos biocidas dos anti-incrustantes (Park et al., 2016).

Já para os biomarcadores de efeito é possível observar que os níveis de LPO nas glândulas digestivas foram menores que nos controles (Fig 10). Isso pode indicar a atuação dos mecanismos de depuração foram ativados minimizando efeitos oxidativos sobre as membranas. A célula possui vários mecanismos para lidar com os efeitos do estresse oxidativo, seja reparando os danos ou diminuindo diretamente a ocorrência de danos oxidativos por meio de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos podem neutralizar o estresse oxidativo (Gultekin et al., 2001; Sutcu et al., 2007).





**Fig 9.** Respostas de biomarcadores de exposição em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Perna perna*. Os dados são apresentados como box splot com limites que indicam os percentis 25 e 75; a linha dentro do box splot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferença significativa quando comparado com o controle acetona ( $p = 0,05$ ). Fig 9.a. ANOVA,  $p=0,0103$ ; Fig. 9.b. ANOVA,  $p=0,0005$ ; Fig. 9.c. ANOVA,  $p= 0,0002$ ; Fig. 9.d. ANOVA,  $p=0,0013$ ; Fig. 9.e. Kruskal Wallis,  $p<0,0001$ ; Fig. 9.f. ANOVA,  $p=0,2299$ ; Fig. 9.g. ANOVA,  $p=0,0028$ ; Fig. 9.h. ANOVA,  $p=0,7243$ ; Fig. 9.i. ANOVA,  $p=0,0005$ ; Fig. 9.j. ANOVA,  $p=0,0043$ .



**Fig 10.** Respostas de biomarcadores de efeitos em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Perna perna*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75. A linha dentro do box plot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferenças significativas com o controle acetona ( $p = 0,05$ ). Fig. 10.a. ANOVA,  $p=0,0027$ ; Fig. 10.b. ANOVA,  $p=0,3107$ ; Fig. 10.c. ANOVA,  $p=0,0296$ ; Fig. 10.d. ANOVA,  $p=0,1856$ ; Fig. 10.e. ANOVA,  $p=0,0002$ ; Fig. 10.f. ANOVA,  $p=0,0004$ .

### Análise de Componentes Principais

A seguir estão apresentados os dados das análises multivariadas para os testes realizados em água e os resultados adicionais podem ser observados no apêndice I. As 2 primeiras componentes explicaram 64,54% da variação total dos dados (Tab 2). A PCA mostrou que no eixo 1, o controle água, branco analítico (acetona), o tempo 0 (T0), bem como a menor concentração de 0,01 µg/l de diclofluanida ficaram agrupadas, enquanto as demais concentrações (0,1 µg/l, 1 µg/l, 10 µg/l e 100 µg/l) mativeram-se em um segundo grupo (Tab 3). Já no segundo eixo o controle água e branco analítico se agrupam junto com as duas menores concentrações de diclofluanida (0,01 e 0,1 µg/l), separando-se das maiores concentrações de diclofluanida (1, 10 e 100 µg/l); já T0 isolou-se dos demais tratamentos (Tab 3).

Para o eixo 1 foi possível observar associação da GPx e GSH nas brânquias e da GPx e GST nas glândulas digestivas, bem como uma relação inversa para DBF e GSH na glândula digestiva (Tab 2). Esses resultados sugerem a ativação dos sistemas de depuração, tanto nas brânquias quanto nas glândulas digestivas e podem ser percebidos também nos gráficos isolados dos biomarcadores. Ainda que não tenham sido identificadas diferenças significativas, os gráficos das glândulas digestivas apresentam uma diminuição do GSH e DBF (Fig 9d e 9j). É possível observar também a relação do efeito dessas enzimas junto ao vermelho neutro. Esses efeitos podem ser associados às concentrações intermediárias e altas de diclofluanida porém não mostraram danos nos biomarcadores bioquímicos de efeito (isto é, LPO e danos em DNA). Entretanto, com relação aos efeitos membranotrópicos foram observadas alterações significativas na estabilidade da membrana dos lisossomos nas maiores concentrações analisadas, pelo ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro. Como este é um biomarcador de efeito, a análise global dos dados sugere que as vias de depuração não são totalmente efetivas, havendo danos nas membranas lisossômicas.

Já em relação ao eixo 2 é possível observar uma associação entre GST e dano em DNA em brânquias (correlações negativas), GPx e EROD, dano em DNA, EROD, lipoperoxidação (LPO) e AChE em glândulas digestivas (correlações positivas). Aparentemente este eixo agrupou variáveis que não apresentaram efeitos significativos para os biomarcadores em isolado, não evidenciando nenhuma resposta significativa para os resultados de forma geral.

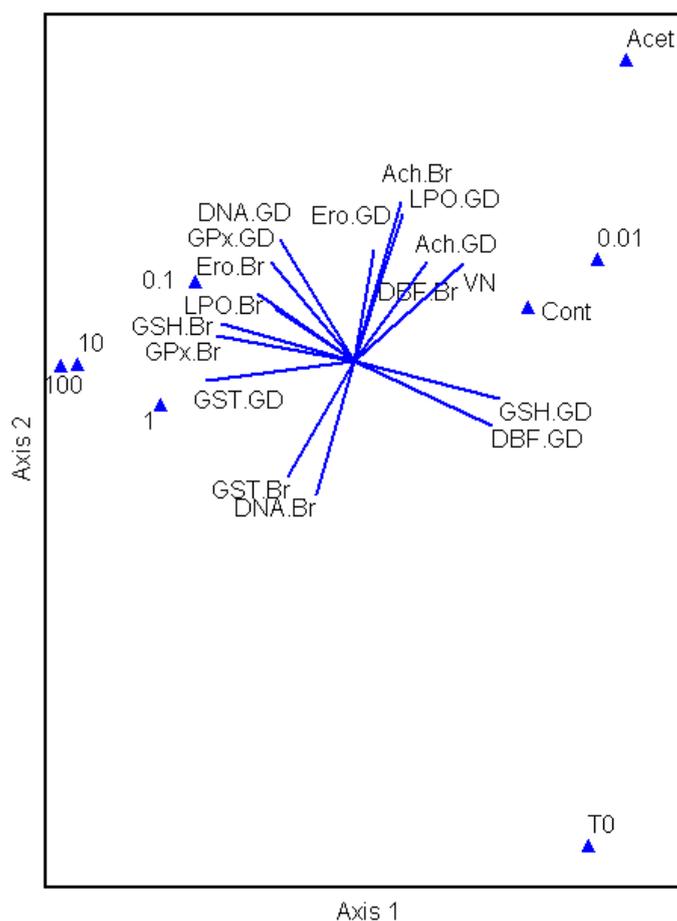
**Tab 2.** Resultados do PCA integrando todos os biomarcadores realizados nas exposições com diferentes concentrações de diclofluanida em água. (\* indica correlação significativa dentro da respectiva componente principal. Br = Brânquias; GD = Glândula Digestiva; NR = Vermelho Neutro.

PC	Eigenvalue	% Variance	Cumulative Variance
PC1	6.115	35.969	35.969
PC2	4.858	28.579	64.547
	PC1	PC2	
DNA.Br	-0.2396	<b>-0.7522</b>	
LPO. Br	-0.4947	0.3001	
AchE. Br	0.2921	<b>0.9020</b>	
Erod. Br	<b>-0.6054</b>	0.3845	
DBF Br	0.1005	0.2684	
GPx. Br	<b>-0.8664</b>	0.1479	
GSH. Br	<b>-0.8317</b>	0.2157	
GST. Br	-0.4159	<b>-0.6489</b>	
DNA.GD	-0.4643	<b>0.6891</b>	
LPO.GD	0.3072	<b>0.8315</b>	
AchE.GD	0.4579	<b>0.5584</b>	
Erod.GD	0.1201	<b>0.6297</b>	
DBF GD	<b>0.8668</b>	-0.3604	
GPx.GD	<b>-0.5270</b>	<b>0.5628</b>	
GSH.GD	<b>0.9133</b>	-0.2080	
GST.GD	<b>-0.9292</b>	-0.1086	
NR	<b>0.6890</b>	<b>0.5506</b>	

**Tab 3.** . Escores fatoriais do tempo inicial, do controle, controle analítico e das concentrações de diclofluanida em 96 horas nas exposições em água (Concentrações expressas em µg/L).

	Eixos	
	1	2
T0	2.3061	-4.7990
T96_Controle	1.7034	0.5302
T96_Acetona	2.6713	2.9812
T96_0,01	2.3832	1.0069
T96_0,1	-1.5558	0.7802
T96_1	-1.9012	-0.4294
T96_10	-2.7225	-0.0230
T96_100	-2.8845	-0.0470

Na projeção das variáveis em relação aos dois fatores extraídos pela PCA é possível perceber que os dados foram agrupados em três grupos plotados no plano formado pelas componentes 1 e 2 (Fig 11). T0 apresenta-se isolado dos demais. Depois um segundo grupo foi composto pelo controle, branco analítico e a concentração mais baixa (0,01 µg/l). E por último, um grupo que contém as demais concentrações de diclofluanida (0,1 µg/l, 1 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l) (Fig 11). Esses dados sugerem um efeito metabólico nos animais expostos às concentrações acima de 0,1 µg/l.



**Fig 11.** Projeção das variáveis num plano formado pelos fatores 1 e 2.

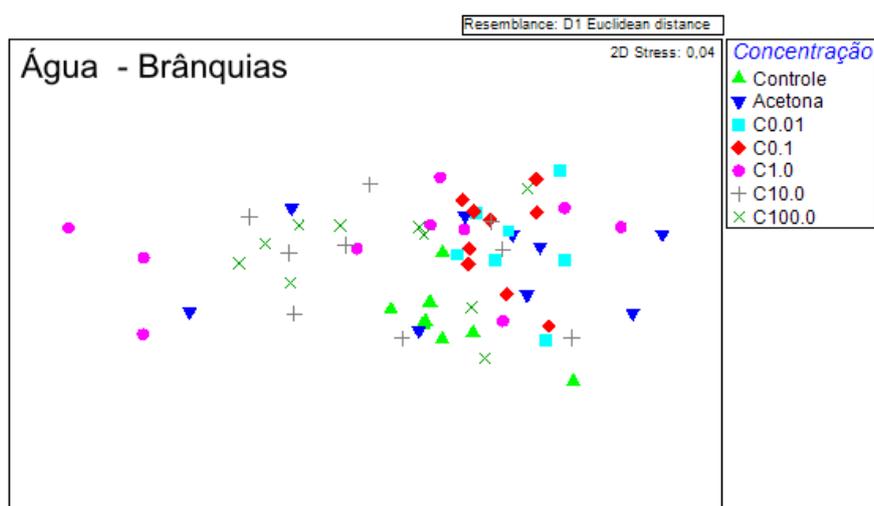
### PERMANOVA

A seguir são apresentados os resultados da PERMANOVA realizada com todos os biomarcadores para os diferentes tecidos (brânquias e glândula digestiva). Resultados adicionais podem ser observados nos apêndices J e K.

Para os resultados com as brânquias não foi possível observar efeitos dos biomarcadores quando comparamos as diferentes concentrações de diclofluanida ao branco analítico (acetona) (Tab 4). Através da projeção das variáveis pela distância

euclidiana é possível observar que as projeções da acetona distribuem-se por todo o espaço e dessa forma não existem conjuntos de pontos que apresentem uma distância significativa desta e por tanto através dessa análise, não foi possível observar qualquer efeito do conjunto dos biomarcadores (Fig 12).

Para os dados de glândula digestiva é possível observar que dentro do conjunto de biomarcadores foi possível observar diferença significativa em quase todos as concentrações de diclofluanida com excessão da mais baixa de 0,01 µg/l (Tab 5). Na projeção das distâncias euclidianas é possível observar que os dados encontram-se agrupados de maneira mais ordenada apresentando um padrão e distâncias menores dentro de um conjunto de dados (Fig 13).



**Fig 12.** Projeção das distâncias euclidianas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando em conta todos os biomarcadores analisados em brânquias.

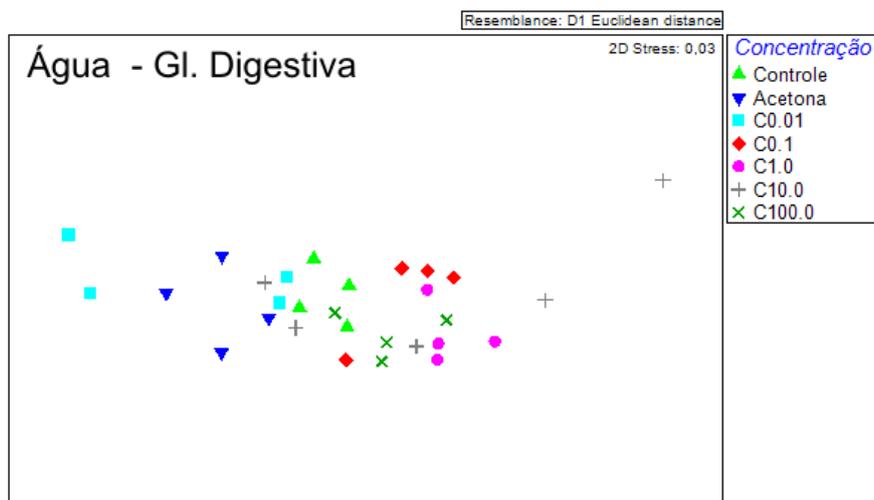
**Tab 4.** Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pela distancia euclidiana para as brânquias levando em consideração todos os biomarcadores analisados.

	df	SS	MS	Pseudo-F	P(Perm)	Perms.	P(MC)
Concentração	6	1,816E6	3,0266E5	2,6116	0,015	999	<b>0,015</b>
Residual	55	6,374E6	1,1589E5				
Total	61	8,19E6					

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Acetona x Controle	0,91971	0,394	975	0,39
Acetona x 0,01	0,92354	0,427	962	0,402
Acetona x 0,1	1,1708	0,257	976	0,244
Acetona x 1	1,3402	0,211	995	0,198

Acetona x 10	1,4703	0,131	980	0,146
Acetona x 100	1,7642	0,089	995	0,085



**Fig 13.** Projeção das distâncias euclidianas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando em conta todos os biomarcadores analisados em glândula digestiva.

**Tab 5.** Tabela de resultados da PERMANOVA. Cálculo realizado pela distância euclidiana para as glândulas digestivas levando em consideração todos os biomarcadores analisados.

	df	SS	MS	Pseudo-F	P(Perm)	Perms.	P(MC)
Concentração	6	6,1491E5	1,0249E5	4,6095	0,001	999	<b>0,002</b>
Residual	22	4,8914E5	22234				
Total	28	1,1041E6					

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Acetona x Controle	2,7277	0,026	35	<b>0,013</b>
Acetona x 0,01	0,80243	0,506	35	0,514
Acetona x 0,1	3,9257	0,032	35	<b>0,005</b>
Acetona x 1	5,4178	0,03	35	<b>0,001</b>
Acetona x 10	2,2638	0,073	126	<b>0,05</b>
Acetona x 100	3,8582	0,031	35	<b>0,004</b>

Os lisossomos são organelas que lidam com nutrição e reparação dos tecidos. Esta organela é o principal sítio de sequestro e detoxificação de compostos orgânicos já relatados em diversos estudos (Lowe et al., 1995; Moore, 1985; Viarengo et al.,

1987). Quando esses processos ocorrem, em paralelo acontecem danos nas membranas e extravasamento do conteúdo dos lisossomos ao citoplasma. Os lisossomos possuem características ácidas mantidas pelo  $Mg^{2+}$ -ATPase, dependente da bomba de íons  $H^+$  da membrana (Ohkuma et al., 1982). Quando essas organelas entram em contato com contaminantes, pode ocorrer o extravasamento dos lisossomos para o citoplasma devido a danos na bomba de íons  $H^+$  presente nessas membranas lisossômica (Lowe et al., 1992). Para a diclofluanida estudos já mostraram que este composto é capaz de induzir citotoxicidade (Suzuki et al., 2004). Alguns estudos afirmam que a retenção do vermelho neutro é afetada minimamente por efeitos naturais, sendo na totalidade dos casos afetado pelos contaminantes (Ringwood et al., 1998). Esses resultados mostram importante relevância ambiental visto que a sensibilidade das membranas lisossomais é bastante utilizada para detecção inicial dos efeitos de compostos tóxicos (Repetto et al., 2008).

Para análise de biomarcadores de forma isolada e para as análises multivariadas (como a PCA) é possível observar que há um efeito significativo nos biomarcadores que são ou utilizam a glutathiona (GSH, GST, Gpx). Isso pode ser explicado pelo modo de ação da diclofluanida. Trata-se de um composto reativo com as sulfidrilas presentes nas glutathionas (Yamano and Morita, 1995, 1993). Este estudo demonstrou um aumento da produção de GSH nas brânquias, que são o primeiro órgão de combate aos xenobióticos, e a principal via de exposição em bivalves se dá pelas brânquias. Isso pode estar diretamente relacionado com os processos de biotransformação da diclofluanida ou de possíveis espécies reativas de oxigênio geradas na presença do xenobiótico (Keppler and Ringwood, 2001). A PERMANOVA foi capaz de mostrar que as glândulas digestivas foram mais responsivas do que as brânquias, sugerindo que a diclofluanida é incorporada pelos bivalves, sendo transportada para a glândula, onde ocorrem processos de depuração. Outros estudos mostram que as glândulas digestivas podem ser os tecidos mais sensíveis na exposição a xenobióticos, em algumas espécies de bivalves (Banni et al., 2009; Barreira et al., 2007; Ramos-Gómez et al., 2011; Zhang et al., 2010).

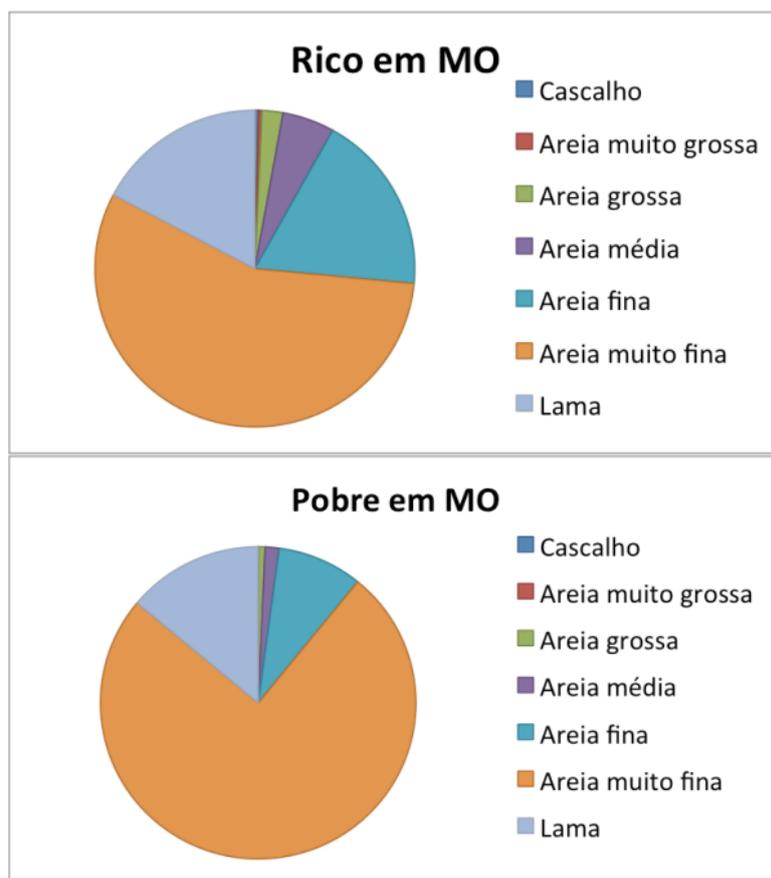
Levando-se em consideração todas as análises realizadas é possível observar que em água existe algum efeito da diclofluanida sobre os biomarcadores de exposição, nas maiores concentrações testadas, porém não se observou dano em DNA ou neurotoxicidade; entretanto foram observados efeitos nas membranas lisossomais. Muitos estudos mostram que a diclofluanida tende rapidamente a se degradar em água tendo sua meia vida em poucas horas e gerando alguns subprodutos como o DMSA, anilina diclorometano (Sakkas et al., 2001; Thomas et al.,

2003; Vouvoulis et al., 2000), porém no presente estudo as soluções-teste foram renovadas, visando manter as concentrações iniciais. Por outro lado, Sakkas et al. (2001) mostrou que a presença da matéria orgânica dissolvida na água interfere na degradação do biocida e na formação de seus subprodutos. Na presença de matéria orgânica dissolvida é possível observar a diminuição da taxa de degradação devido à diminuição do processo de fotólise, já que a matéria orgânica dissolvida aumentaria a turbidez da água, reduzindo a ação da luz. Dessa forma, os compostos podem estar disponíveis para serem assimilados por organismos filtradores como é o caso do mexilhão *Perna perna*.

### 3.2. Exposição em sedimento

#### Análises sedimentológicas

A figura 14 mostra as porcentagens de cada classe granulométrica dos diferentes sedimentos coletados, enquanto a tabela 6 mostra as porcentagens de carbonato de cálcio, matéria orgânica contido nos sedimentos e porcentagem de peso seco. Ambos os sedimentos eram predominantemente compostos de areia fina, muito fina e lama. Dessa forma, possíveis efeitos subcrônicos não foram causados pela mudança na granulometria do sedimento. O sedimento coletado no Ariri (rico em MO) apresenta uma porcentagem significativamente maior de matéria orgânica que o sedimento do Arrozal (pobre em MO). Quando as porcentagens de  $\text{CaCO}_3$  foram observadas, os sedimentos analisados não apresentaram diferenças significativas, portanto este fator possivelmente não interferiu nos resultados de efeito subcrônico.



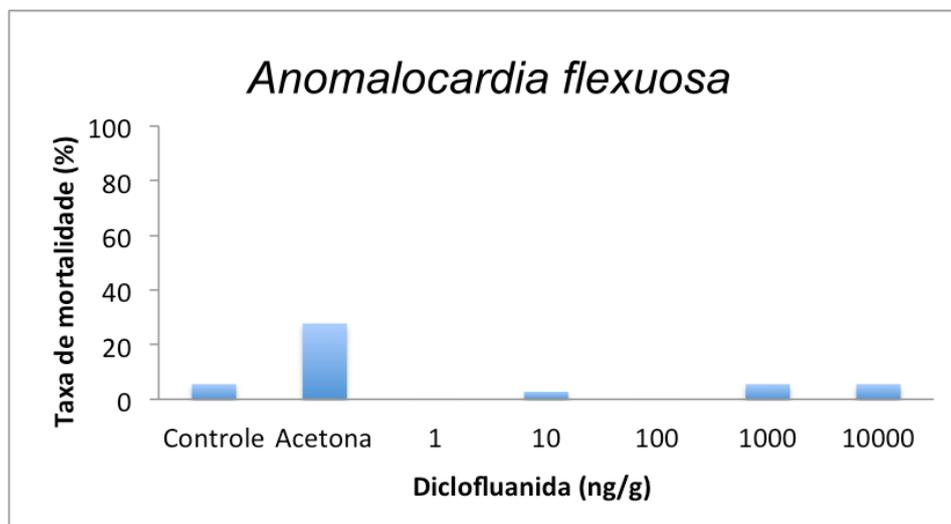
**Fig 14.** Distribuição granulométrica nos sedimentos coletados em Cananéia - SP e utilizados nas exposições de sedimentos contaminados testes com diclofluanida.

**Tab 6.** Porcentagens de matéria orgânica (MO), Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e porcentagem de peso seco após secagem em estufa dos sedimentos coletados em Cananéia – SP.

	MO(%)	$\text{CaCO}_3$ (%)	Peso úmido (%)
<b>Rico em MO</b>	10.38 ± 0.19	7.38 ± 0.13	57.18
<b>Pobre em MO</b>	4.00 ± 0.07	5.88 ± 0.27	49.52

#### Exposição de *Anomalocardia flexuosa*

O experimento com sedimento rico em MO não resultou na mortalidade de organismos. Já o experimento com sedimento pobre em MO apresentou mortalidade, porém inferior a 30% (Fig 15).



**Fig 15.** Taxa de mortalidade do bivalve *Anomalocardia flexuosa* ao longo de 21 dias de experimento para sedimento pobre em matéria orgânica.

Foram realizadas as exposições com o bivalve *Anomalocardia flexuosa* nas diferentes concentrações de diclofluanida, considerando as duas condições de enriquecimento orgânico dos sedimentos. Os parâmetros físico-químicos da água nas câmaras-teste durante os experimentos estão apresentados no apêndice j.

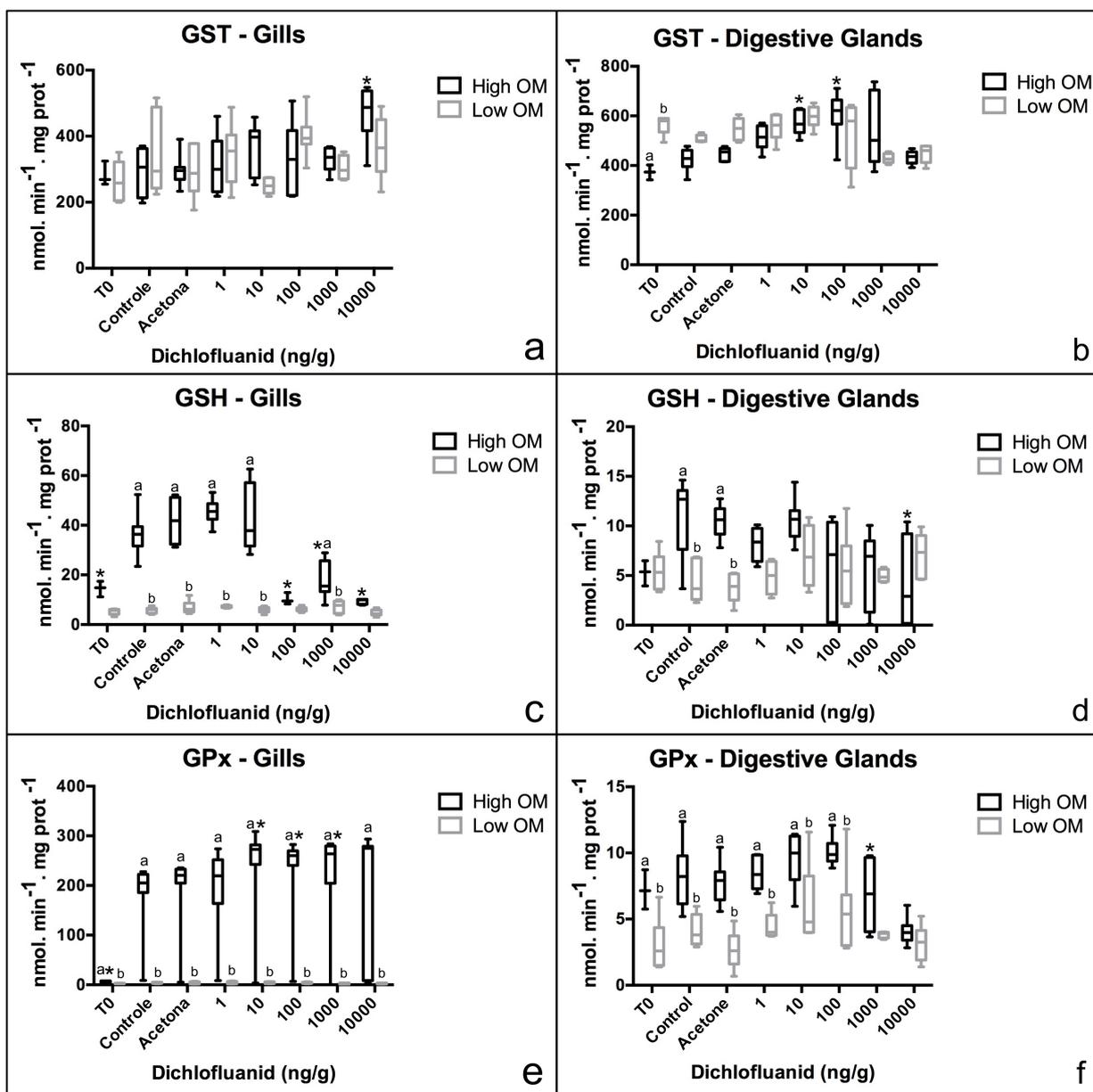
#### Biomarcadores de exposição e de efeito

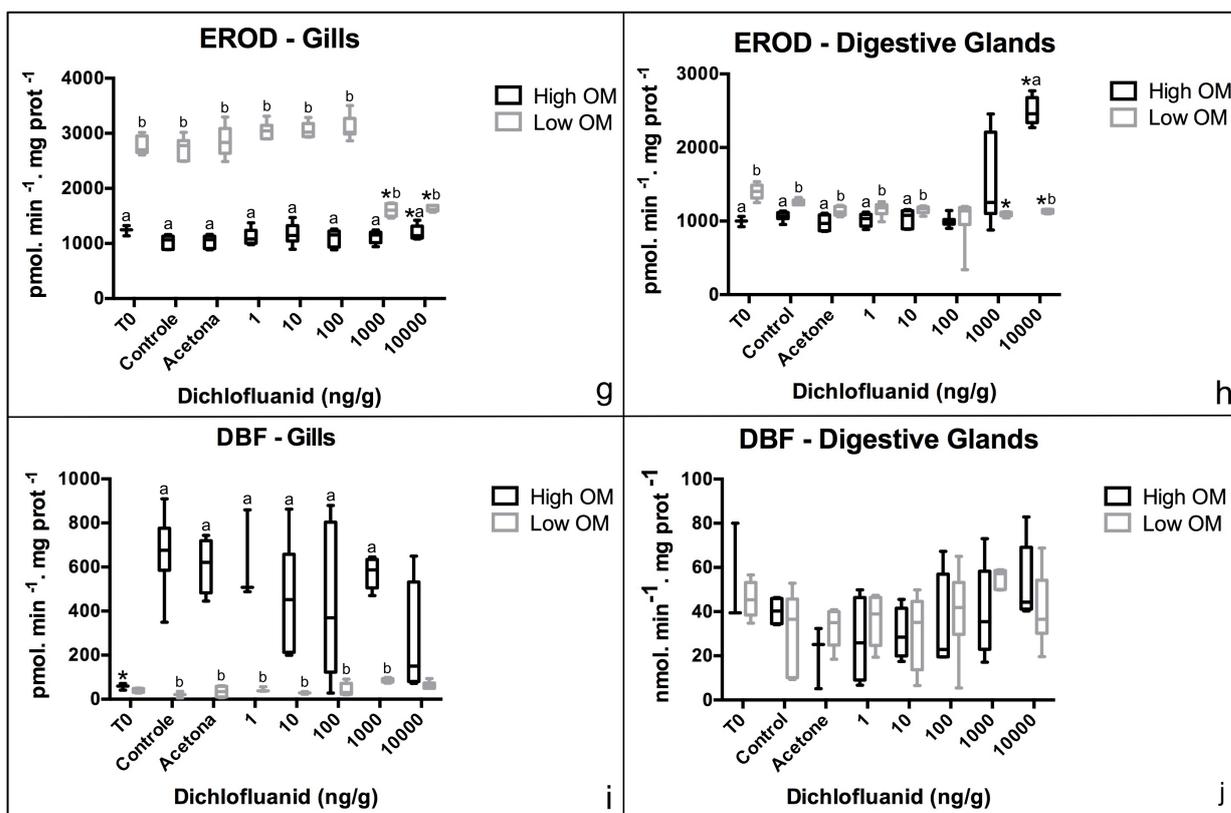
A seguir estão apresentados os resultados para os biomarcadores medidos no experimento de exposição de *Anomalocardia flexuosa* em sedimento (Fig. 16 e 17). Nas brânquias foi possível observar que no sedimento com alto teor de matéria orgânica houve um aumento da atividade da GST e da EROD na maior concentração (10000 ng/g), uma diminuição da quantidade de GSH e aumento da atividade da GPx e da AChE nas três maiores concentrações (100, 1000 e 10000 ng/g) e um aumento nos níveis de LPO em concentrações intermediárias (1 e 10 ng/g). Já para o sedimento com baixa matéria orgânica foi possível observar apenas uma diminuição da atividade da EROD nas maiores concentrações (1000 e 10000 ng/g).

Para as glândulas digestivas, para o sedimento rico em matéria orgânica foi possível observar um aumento da atividade da GST nas concentrações intermediárias (10 e 100 ng/g), diminuição das atividades de GSH e AChE e aumento da atividade da EROD e dos níveis de LPO na maior concentração (10000 ng/g), diminuição da atividade da GPx na concentração de 1000 ng/g e aumento do dano em DNA na contração de 10 ng/g. Para o sedimento pobre em matéria orgânica foi possível observar uma diminuição na atividade da EROD nas maiores concentrações (1000 e

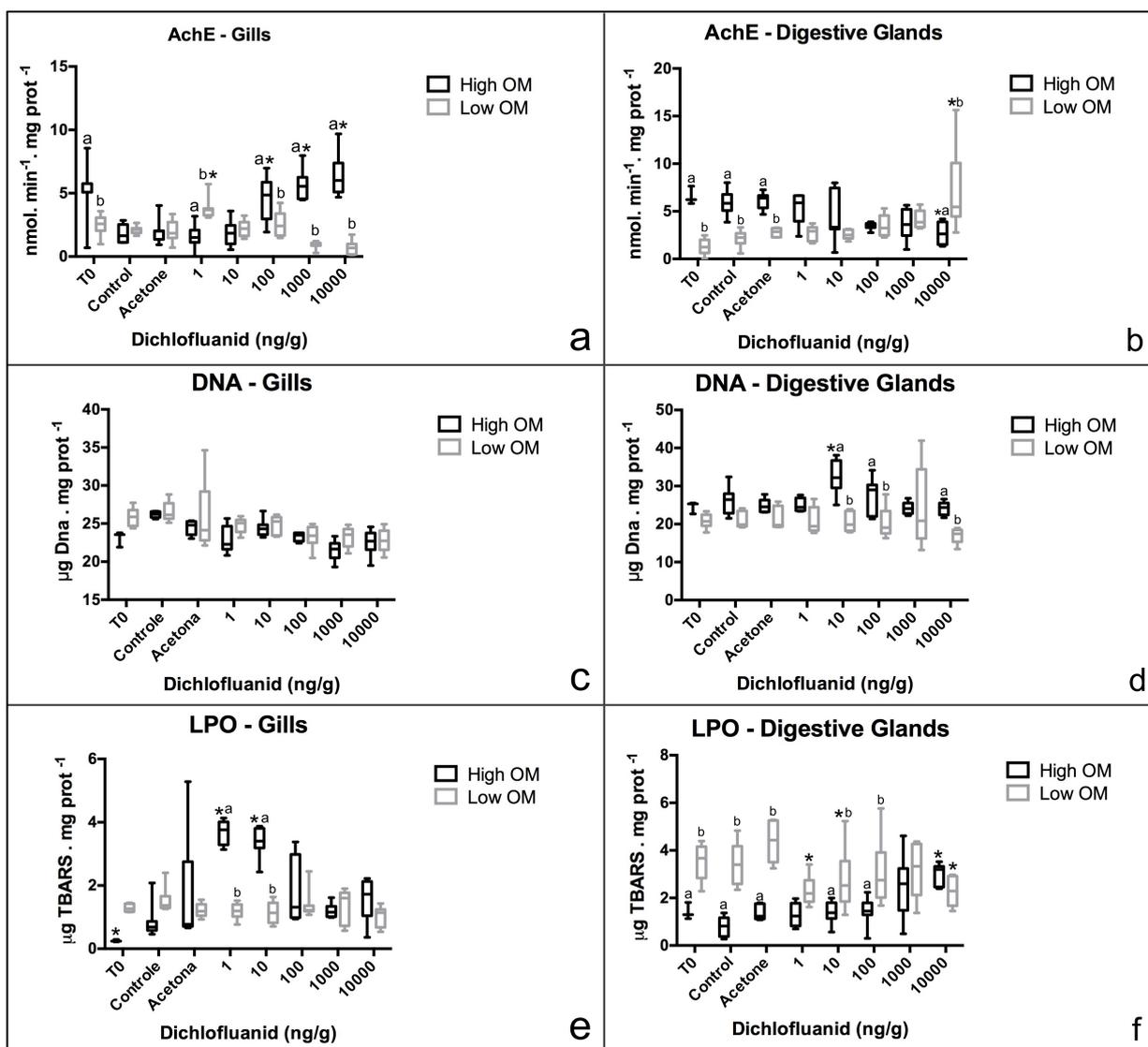
10000 ng/g), aumento da atividade de AChE na maior concentração (10000 ng/g) e uma diminuição dos níveis de LPO em concentrações variáveis (1, 10 e 10000 ng/g).

Portanto, de modo geral, observou-se, tanto em brânquias quanto em glândulas digestivas, a ocorrência de processos de biotransformação (EROD), conjugação (GST), sistema antioxidante (GPx, GSH), e efeitos relacionados (danos em DNA e LPO), além de alteração da atividade da AChE, que pode indicar neurotoxicidade.





**Fig 16.** Respostas de biomarcadores de exposição em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Anomalocardia flexuosa*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75; a linha dentro do box plot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferença significativa quando comparado com o controle acetona considerando uma determinada concentração de matéria orgânica. As letras indicam diferença significativa entre as diferentes concentração de matéria orgânica levando em consideração a mesma concentração de diclofluaniida ( $p = 0,05$ ). High MO = Rico em Matéria orgânica; Low MO = Pobre em Matéria orgânica. Fig 16.a. ANOVA,  $p=0,0035$ ; Fig. 16.b. ANOVA,  $p<0,0001$ ; Fig. 16.c. ANOVA,  $p<0,0001$ ; Fig. 16.d. ANOVA,  $p=0,0057$ ; Fig. 16.e. PERMANOVA,  $p=0,001$ ; Fig. 16.f. ANOVA,  $p<0,0001$ ; Fig. 16.g. PERMANOVA,  $p=0,001$ ; Fig. 16.h. PERMANOVA,  $p=0,001$ ; Fig. 16.i. ANOVA,  $p=0,0089$ ; Fig. 16.j. ANOVA,  $p=0,3946$ .



**Fig 17.** Respostas de biomarcadores de efeitos em brânquias (gills) e glândulas digestivas (digestive glands) de *Perna perna*. Os dados são apresentados como box plot com limites que indicam os percentis 25 e 75. A linha dentro do box plot marca o valor mediano. O uso do asterisco (\*) acima dos dados indica diferenças significativas com o controle acetona considerando uma determinada concentração de matéria orgânica. As letras indicam diferença significativa entre as diferentes concentração de matéria orgânica levando em consideração a mesma concentração de diclofluanida ( $p = 0,05$ ). High MO = Rico em Matéria orgânica; Low MO = Pobre em Matéria orgânica. ANOVA de duas vias: Fig. 17.a.  $p < 0,0001$ ; Fig. 17.b.  $p < 0,0001$ ; Fig. 17.c.  $p = 0,5284$ ; Fig. 17.d.  $p = 0,0170$ ; Fig. 17.e.  $p < 0,0001$ ; Fig. 17.f.  $p < 0,0001$ .

### Análise de Componentes Principais

A seguir estão apresentados os dados das análises multivariadas para os testes realizados em sedimentos, cujos resultados adicionais podem ser observados no apêndice K. Os 2 primeiros eixos explicam 63,93% das variâncias (Tab 7). A PCA mostrou que no eixo 1, o controle água, branco analítico (acetona), T0, bem como as concentrações de 1 ng/g e 10 ng/g de diclofluanida ficaram agrupadas enquanto as maiores concentrações (100, 1000 e 10000 ng/g) mativeram-se em um segundo grupo (Tab 8). Já no segundo eixo o T0, controle água e branco analítico se agruparam, separando-se das concentrações de 1 e 10 ng/g) enquanto as demais concentrações de diclofluanida ficaram num segundo agrupamento (Tab 8).

O fator 1 mostra para os sedimentos ricos em matéria orgânica, que nas brânquias houve associação entre GST e AChE e uma associação inversa para GSH e danos em DNA. Já as glândulas digestivas apresentaram uma associação da EROD e peroxidação lipídica (LPO) e, inversamente, foi possível observar associações entre GSH, GPx e neurotoxicidade (AChE). Para o sedimento pobre em matéria orgânica, as brânquias apresentaram associação entre EROD, GPx, dano em DNA, neurotoxicidade e peroxidação lipídica. Na glândula digestiva ocorreu associação inversa entre GST, GSH e AChE (Tab 7).

No fator 2, para os sedimentos ricos em matéria orgânica, é possível observar nas brânquias uma associação entre GPx e lipoperoxidação, e para as glândulas digestivas houve uma associação entre a GST e dano em DNA inversamente a AChE. Para o sedimento pobre em matéria orgânica é possível observar efeitos apenas para glândula digestiva: houve uma associação entre a EROD e peroxidação lipídica, a qual foi inversa à GPx (Tab 7).

Os resultados da PCA corroboram a existência de efeitos, principalmente quando há maior concentração de MO. Estes efeitos já começam a aparecer desde as concentrações mais baixas, ficando mais severos nos animais expostos às concentrações mais altas.

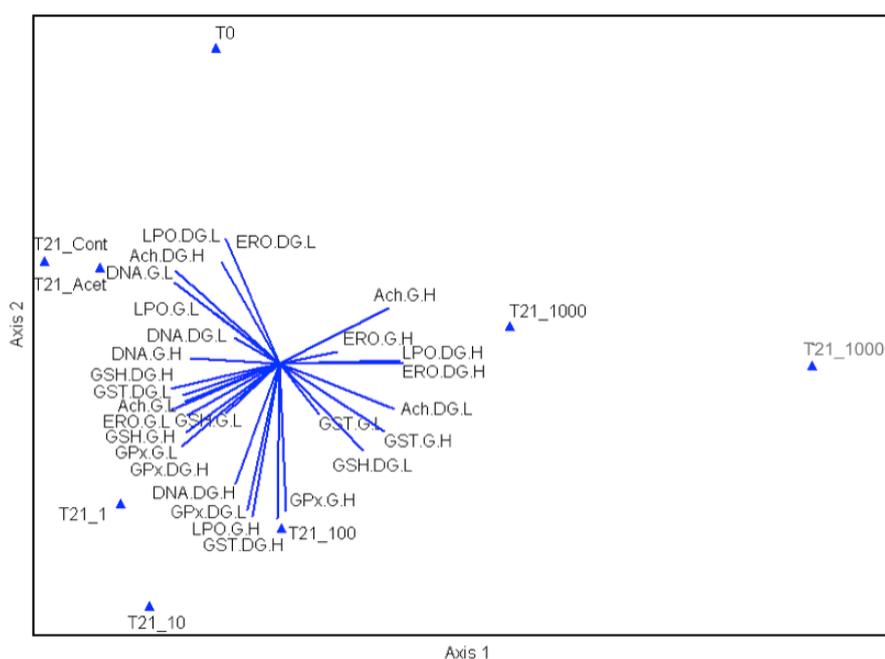
**Tab 7.** Resultados do PCA integrando todos os biomarcadores realizados nas exposições com diferentes concentrações de diclofluanida em sedimento com duas matrizes com concentrações de material orgânica diferentes. (\* indica correlação significativa dentro da respectiva componente principal. Br = Brânquias; GD= Glândula digestiva; R = Rico em material orgânica; P = Pobre em material orgânica.

PC	Eigenvalue	% Variance	Cumulative Variance
PC1	12.029	42.960	42.960
PC2	5.871	20.967	63.927
	PC1	PC2	
DNA.Br.R	<b>-0.7003</b>	0.0266	
DNA.Br.P	<b>-0.8268</b>	0.4454	
LPO. Br.R	-0.2116	<b>-0.8483</b>	
LPO. Br.P	<b>-0.5114</b>	0.2846	
AchE. Br.R	<b>0.8604</b>	0.3041	
AchE. Br.P	<b>-0.7426</b>	-0.2149	
EROD. Br.R	0.4512	0.0622	
EROD. Br.P	<b>-0.8482</b>	-0.2612	
GPx. Br.R	0.0465	<b>-0.8170</b>	
GPx. Br.P	<b>-0.7298</b>	-0.3840	
GSH. Br.R	<b>-0.7262</b>	-0.2870	
GSH. Br.P	-0.4187	-0.2786	
GST. Br.R	<b>0.8266</b>	-0.3751	
GST. Br.P	0.3123	-0.2803	
DNA.GD.R	-0.3458	<b>-0.6629</b>	
DNA.GD.P	-0.3581	0.1400	
LPO. GD.R	<b>0.9659</b>	0.0031	
LPO. GD.P	-0.4592	<b>0.5595</b>	
AchE. GD.R	<b>-0.8145</b>	<b>0.5122</b>	
AchE. GD.P	<b>0.9033</b>	-0.2504	
EROD. GD.R	<b>0.9407</b>	0.0160	
EROD. GD.P	-0.4175	<b>0.6902</b>	
GPx. GD.R	<b>-0.7682</b>	-0.4567	
GPx. GD.P	-0.2496	<b>-0.8111</b>	
GSH. GD.R	<b>-0.8527</b>	-0.1406	
GSH. GD.P	<b>0.6545</b>	-0.4808	
GST. GD.R	-0.0139	<b>-0.8625</b>	
GST. GD.P	<b>-0.7598</b>	-0.1756	

**Tab 8.** Escores fatoriais do tempo inicial, controle, branco analítico e das concentrações de diclofluanida nas exposições em sedimento (Concentração dada em ng/g).

	Eixos	
	1	2
T0	-0.8484	4.2437
T21_Controle	-3.1453	1.3821
T21_Acetona	-2.3933	1.2861
T21_1	-2.1245	-1.8929
T21_10	-1.7316	-3.2803
T21_100	0.0304	-2.2193
T21_1000	3.0814	0.5029
T21_10000	7.1312	-0.0222

Na projeção das variáveis em relação aos dois fatores extraídos pela PCA é possível perceber que os dados foram agrupados em três grupos plotados no plano formado pelos fatores 1 e 2 assim como nas exposições em água. T0 apresenta-se isolado dos demais. Depois um segundo grupo é composto pelo controle, branco analítico e as concentrações mais baixas (1 ng/g, 10 ng/g e 100 ng/g). Por fim, um grupo que contém as maiores concentrações de diclofluanida (1000 ng/g e 10000 ng/g) (Fig 18). Esses dados também sugerem um efeito metabólico mais acentuado nos animais expostos nas concentrações mais elevadas.



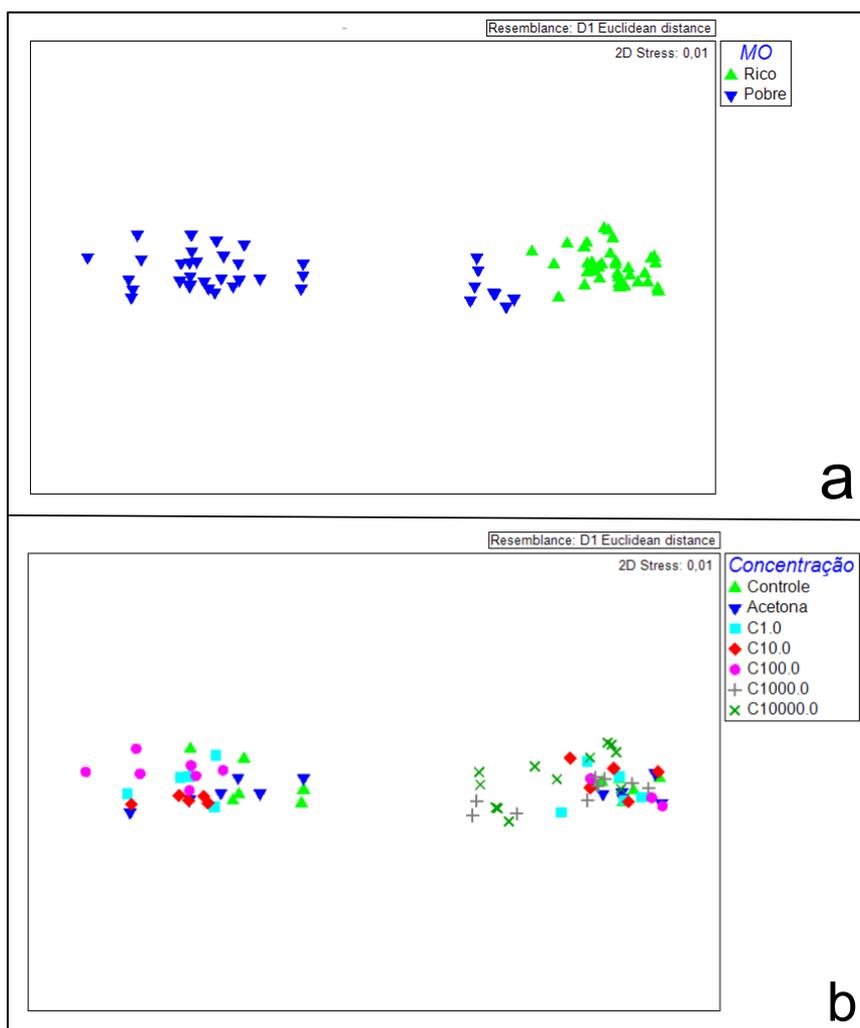
**Fig 18.** Projeção das variáveis num plano formado pelos fatores 1 e 2.

Essa análise integrada através da PCA permite condensar a informação contida nas diversas respostas biológicas e simplifica a interpretação conjunta dos dados referentes a um número relativamente grande de variáveis. Essa abordagem estatística contribui para explicar as inter-relações entre os biomarcadores, e facilita a visualização do comportamento das variáveis biológicas em relação ao biocida, sendo possível distinguir quais as respostas mais significativas e as concentrações determinantes.

### PERMANOVA

A seguir estão apresentados os dados da PERMANOVA tanto para brânquias quanto para glândula digestiva (Fig. 19 e 20 e Tab. 9 e 10). Dados adicionais das análises podem ser encontrados nos apêndices N e O. Na figura 19 é possível observar uma separação evidente entre os diferentes tipos de sedimentos. Fica claro um agrupamento do sedimento rico em MO com as mais altas concentração do sedimento pobre, e as demais concentrações do sedimento pobre em MO encontram-se em um segundo grupo para brânquias. A tabela 9 mostra que levando-se em consideração a combinação de biomarcadores tanto para o sedimento rico, como para o pobre é possível ver diferença significativas para as maiores concentrações. Nesta tabela através dos valores de p também fica evidente as diferenças entre os diferentes tipos de sedimento.

Para a glândula digestiva resultados similares foram obtidos. Fica evidente, na projeção dos pontos, que os diferentes tipos de sedimento formam agrupamentos e apenas as maiores concentrações do sedimento rico em matéria orgânica ficam isoladas. Os valores de p, levando-se em conta o conjunto de biomarcadores, demonstra diferença significativa com o controle acetona nas maiores concentrações de diclofluanida tanto para o sedimento rico em matéria orgânica quanto para o pobre em matéria orgânica. Quando são comparados os sedimentos com diferentes concentrações de matéria orgânica, esta análise permitiu mostrar diferenças significativas nos controles, bem como nas concentrações de 1, 10 e 10000 ng/g.



**Fig 19.** Projeção das distâncias euclidianas das réplicas das diferentes concentrações de diclofluanida, do controle e branco analítico levando-se em conta todos os biomarcadores analisados na brânquia. Fig 19a. Projeção das réplicas levando em conta a contração de matéria orgânica dos sedimentos; Fig 19b. Projeção das réplicas levando em consideração as concentrações de diclofluanida.

**Tab 9.** Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pelas distâncias euclidianas para as brânquias levando em consideração os biomarcadores analisados.

	df	SS	MS	Pseudo-F	P(Perm)	Perms.
Concentração	6	5,6961E6	9,4936E5	26,371	0,001	998
MO	1	3,9486E7	3,9486E7	1096,8	0,001	998
Co x MO	6	7,3653E6	1,2276E6	34,098	<b>0,001</b>	998
Residual	60	2,16E6	36001			
Total	73	6,0548E7				

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

---

 Within level 'Rico' of factor 'MO'

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Acetona x Controle	0,53529	0,752	126	0,737
Acetona x 1,0	1,4836	0,122	408	0,151
Acetona x 10,0	1,2852	0,255	125	0,241
Acetona x 100,0	0,41792	0,9	56	0,816
Acetona x 1000,0	1,5299	0,139	409	0,15
Acetona x 10000,0	2,4075	0,004	561	<b>0,017</b>

---

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Pobre' of factor 'MO'

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Acetona x Controle	0,91217	0,451	414	0,413
Acetona x 1,0	1,2326	0,246	413	0,246
Acetona x 10,0	1,3915	0,184	405	0,2
Acetona x 100,0	2,0424	0,052	747	0,056
Acetona x 1000,0	6,7453	0,014	84	<b>0,001</b>
Acetona x 10000,0	8,8525	0,002	407	<b>0,001</b>

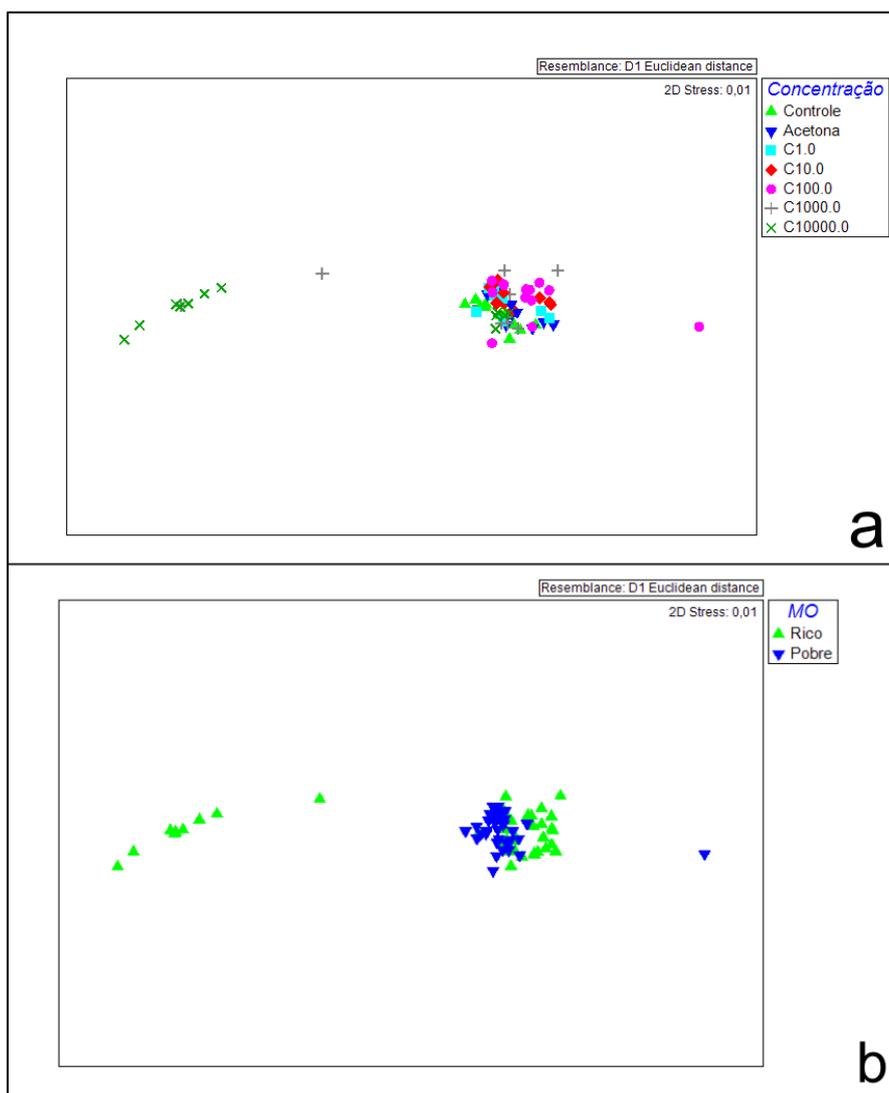
---

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'MO'

Factor 'Concentração'

Amostra	Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Controle	Rico x Pobre	14,562	0,006	401	<b>0,001</b>
Acetona	Rico x Pobre	13,179	0,003	408	<b>0,001</b>
1,0	Rico x Pobre	16,899	0,003	415	<b>0,001</b>
10,0	Rico x Pobre	18,472	0,007	126	<b>0,001</b>
100,0	Rico x Pobre	13,882	0,012	120	<b>0,001</b>
1000,0	Rico x Pobre	6,5776	0,016	84	<b>0,001</b>
10000,0	Rico x Pobre	4,8678	0,004	579	<b>0,001</b>

---



**Fig 20.** Projeção das distâncias euclidianas das réplicas das diferentes concentrações de diclofenanida, do controle e branco analítico levando-se em conta todos os biomarcadores analisados na glândula digestiva. Fig 20a. Projeção das réplicas levando em consideração as concentrações de diclofenanida; Fig 20b. Projeção das réplicas levando em conta a concentração de matéria orgânica dos sedimentos.

**Tab 10.** Tabela de resultados da PERMANOVA. Calculo realizado pelas distâncias euclidianas para as glândulas digestivas levando em consideração os biomarcadores analisados.

	df	SS	MS	Pseudo-F	P(Perm)	Perms.
Concentração	6	5,5022E6	9,1704E5	18,605	0,001	999
o			5			
MO	1	3,418E5	3,418E5	6,9345	0,01	999
Co x MO	6	5,5808E6	9,3013E5	18,871	<b>0,001</b>	999
			5			
Residual	62	3,056E6	49290			
Total	75	1,6476E7				

---

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Rico' of factor 'MO'

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Acetona x Controle	1,4047	0,178	414	0,187
Acetona x 1,0	0,39356	0,728	56	0,785
Acetona x 10,0	1,9114	0,05	560	<b>0,048</b>
Acetona x 100,0	2,3227	0,022	412	<b>0,021</b>
Acetona x 1000,0	1,701	0,098	403	0,12
Acetona x 10000,0	16,35	0,002	574	<b>0,001</b>

---

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Pobre' of factor 'MO'

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Acetona x Controle	3,0157	0,015	126	<b>0,009</b>
Acetona x 1,0	1,0786	0,337	126	0,333
Acetona x 10,0	1,2374	0,22	126	0,244
Acetona x 100,0	0,75066	0,768	576	0,49
Acetona x 1000,0	3,0765	0,017	126	<b>0,005</b>
Acetona x 10000,0	2,4867	0,019	126	<b>0,018</b>

---

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'MO'

Factor 'Concentração'

Amostra	Grupos	t	P(Perm)	Perms	P(MC)
Controle	Rico x Pobre	5,1064	0,002	411	<b>0,001</b>
Acetona	Rico x Pobre	3,1574	0,039	126	<b>0,009</b>
1,0	Rico x Pobre	3,267	0,027	56	<b>0,005</b>
10,0	Rico x Pobre	2,302	0,027	573	<b>0,039</b>
100,0	Rico x Pobre	0,45823	0,927	770	0,751
1000,0	Rico x Pobre	1,2048	0,303	209	0,269
10000,0	Rico x Pobre	16,063	0,001	567	<b>0,001</b>

---

De maneira geral, as respostas se concentram nos animais expostos ao sedimento com altas concentrações de matéria orgânica. Nesta matriz, compostos orgânicos tendem a ficar adsorvidos com a matéria orgânica e estabelecer diferentes interações químicas que influenciarão diretamente sua biodisponibilidade e toxicidade para organismos bentônicos (Huang et al., 2003, 1997; Haitzer et al., 1998; Jones e De Voogt, 1999). Alguns processos, como biodegradação e volatilização, podem influenciar a persistência desses contaminantes nos sedimentos (Jones e De Voogt, 1999; Toan e Mai, 2017). A estabilidade do composto nas matrizes sedimentares também tem relação com a taxa ou grau de decomposição da matéria orgânica (Said-Pullicino et al., 2007). Essa fração retida ao sedimentos pode ser diretamente transferida para os organismos bentônicos, como por exemplo para o *T. viscana* no presente estudo, por via alimentar. Os organismos ingerem as partículas de matéria orgânica e contaminantes ao se alimentar dos sedimentos.

Estudos com diuron, composto também presente nas tintas anti-incrustantes de terceira geração mostraram que a sorção do composto estava intimamente ligada com as concentrações de matéria orgânica, sendo intensificada em altas concentrações (Rocha et al., 2013). Para estudos com TBT, o mesmo padrão foi observado, sendo a persistência deste composto maior em sedimentos ricos em matéria orgânica (Furdek et al., 2016; Langston and Pope, 1995).

As análises de biomarcadores demonstraram uma resposta clássica para as brânquias e glândulas digestivas: ativação da EROD que participa dos processos de biotransformação seguido da ativação das enzimas que participam da conjugação dos xenobióticos como a GST com o consumo da GSH para os processos de depuração. Porém o sistema anti-oxidante não é capaz de expulsar e biotransformar totalmente a diclofluanida e dessa forma é possível observar a peroxidação lipídica. Essa resposta corrobora com estudos pretéritos como o de Suzuki et al. (2004) que observou que a diclofluanida foi capaz de induzir a peroxidação lipídica e a citotoxicidade na maioria das concentrações testadas (concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$ ). Além da peroxidação lipídica, foi possível observar neurotoxicidade também em ambos os tecidos. Este dano já foi observado em anti-incrustantes e pesticidas, inclusive para diclofluanida (Chen et al., 2014; Linz and Garling, 1995). O principal alvo de alguns pesticidas (como os organofosforados) é a enzima acetilcolinesterase (AChE), que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina. O complexo enzima-inibidor pode tornar-se "envelhecido" por uma hidrólise não enzimática e a inibição da AChE é irreversível. A AChE causa o acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, levando à superestimulação dos receptores (Bjørning-Poulsen et al., 2008). Por outro lado, alguns

resultados mostraram a indução da AChE que está intimamente relacionada com apoptose celular (Zhang et al., 2002).

Diante de todas as respostas obtidas a partir da combinação dos biomarcadores, pode-se observar a importância de serem realizados em conjunto, pois eles trazem uma sinalização prévia de alerta no biomonitoramento de ambientes aquáticos (Dailianis et al., 2003). Além disso, esse estudo pode evidenciar que os danos são intensificados na matriz sedimentar, fato que pode ser explicado pela preferência da diclofluanida em ficar adsorvida nesta matriz (Martins and Vargas, 2013).

#### 4. Conclusão

Com base nos resultados, é possível indicar que a diclofluanida causa efeitos em níveis celulares tanto para espécies alvo como também não-alvo das tintas-antiincrustantes em concentrações encontradas no ambiente tanto para água quanto para sedimento, sendo os efeitos mais evidentes e pronunciados em sedimento. Também foi possível observar que os organismos expostos em sedimento rico em matéria orgânica apresentaram alterações mais intensas do que aqueles expostos ao sedimento pobre em matéria orgânica.

## 5. Apêndices

**Ap G.** Parâmetros físico-químicos do cultivo de *Perna perna* da praia da Cocanha, Caraguatatuba, litoral norte de São Paulo.

Parâmetros água cultivo - Praia da Cocanha	
pH	8,9
Salinidade	33
OD (mg/L)	5,6

**Ap H.** Parâmetros físico-químicos apresentados para a exposição de *Perna perna*. Concentrações de diclofluanida expressas em µg/L.

Dia 1						
Conc (µg/L)	Salinidade	pH	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	33	7,2	3,8	25±2	0,00100	0,007
Acetona	34	7,3	3,7	25±2	0,00118	0,011
0,01	35	7,4	3,5	25±2	0,00103	0,012
0,1	35	7,6	3,5	25±2	0,00100	0,018
1	35	7,5	3,3	25±2	0,00058	0,008
10	35	7,5	3,1	25±2	0,00094	0,013
100	35	7,5	3,4	25±2	0,00052	0,007
Dia 2						
Conc (µg/L)	Salinidade	pH	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	34	7,67	4,4	25±2	0,0026	0,330
Acetona	33	7,67	2,3	25±2	0,0007	0,079
0,01	33	7,86	3,7	25±2	0,0006	0,012
0,1	33	7,8	2,5	25±2	0,0006	0,013
1	33	7,86	3,4	25±2	0,0006	0,019
10	33	8,03	2,2	25±2	0,0005	0,013
100	33	8,04	2,9	25±2	0,0004	0,020
Dia 3						

Conc (µg/L)	Salinidade	pH	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	33	8,21	4,2	25±2	0,00114	0,055
Acetona	33	8,51	4,7	25±2	0,00023	0,016
0,01	33	8,62	4,3	25±2	0,00033	0,054
0,1	33	8,66	4,6	25±2	0,00023	0,040
1	34	8,67	4,6	25±2	0,00018	0,032
10	34	7,59	4,5	25±2	0,00024	0,004
100	34	7,56	4,9	25±2	0,00025	0,004

---

**Dia 4**

---

Conc (µg/L)	Salinidade	pH	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	34	7,25	4,6	25±2	0,00114	0,055
Acetona	33	7,32	4,5	25±2	0,00023	0,016
0,01	33	7,02	4	25±2	0,00033	0,018
0,1	33	7,26	4,4	25±2	0,00039	0,017
1	33	7,80	4,1	25±2	0,00035	0,019
10	33	7,04	4,5	25±2	0,00011	0,022
100	34	7,14	4,4	25±2	0,00015	0,020

**Ap I.** Resultados adicionais da PCA realizada para o experimento realizado em água com *Perna perna*.

3.86 = inflation factor for biplot scores

BEGINNING RANDOMIZATIONS

RANDOMIZATION RESULTS

999 = number of randomizations

Axis	Eigenvalue	Eigenvalues from randomizations			p *
		Minimum	Average	Maximum	
1	6.1146	3.6041	4.8870	7.4203	0.012
2	4.8584	2.7826	3.7270	4.8869	0.002
3	2.4492	1.7284	2.8882	3.8736	0.934
4	1.5401	1.3494	2.2013	2.9921	0.993
5	1.2412	0.81917	1.5976	2.4164	0.923
6	0.43427	0.47288	1.0872	1.9531	1.000
7	0.36221	0.15394	0.61181	1.2868	0.882

8	0.10754E-11	0.23194E-12	0.82376E-12	0.13197E-11	0.109
9	0.19001E-15	0.10727E-15	0.27982E-15	0.58006E-15	0.924
10	0.13820E-15	0.62384E-16	0.18188E-15	0.35489E-15	0.796

\* p-value for an axis is  $(n+1)/(N+1)$ , where n is the number of randomizations with an eigenvalue for that axis that is equal to or larger than the observed eigenvalue for that axis. N is the total number of randomizations.

#### APPLICATION OF STOPPING RULES

Axis	Acronym	Explanation (see Peres-Neto, Jackson&Somers 2005)
2	Rnd-Lambda	Observed eigenvalue as compared to randomizations
2	Rnd-F	Observed pseudo-F-ratio compared to randomizations
2	Avg-Rnd	Observed eigenvalue as compared to average eigenvalue from randomizations
3	BS	Observed eigenvalue as compared to broken-stick eigenvalue

Notes:

Rnd-Lambda is relatively robust to non-normal data.

Rnd-F performs well with uncorrelated variables and multivariate normality.

Avg-Rnd performs well with multivariate normal data without uncorrelated variables.

BS performs well when variables are highly correlated.

#### VARIANCE EXTRACTED, FIRST 7 AXES

Axis	Eigenvalue	% of Variance	Cum.% of Var.	Broken-stick Eigenvalue
1	6.115	35.969	35.969	3.440
2	4.858	28.579	64.547	2.440
3	2.449	14.407	78.955	1.940
4	1.540	9.059	88.014	1.606
5	1.241	7.301	95.315	1.356
6	0.434	2.555	97.869	1.156
7	0.362	2.131	100.000	0.990

**Ap J.** Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em água com *Perna perna* em tecidos brânquiais.

---

**Matriz: Água/ Tecido: Brânquias/ PERMANOVA/ Permutacional MANOVA**

---

*Resemblance worksheet*

Name: Resem1

Data type: Distance

Selection: All

Resemblance: D1 Euclidean distance

---

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Unrestricted permutation of raw data

Number of permutations: 999

---

Factors	Abbrev	Type	Levels
Concentração	Co	Fixed	7

---

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Co	$1 \cdot V(\text{Res}) + 8,8387 \cdot S(\text{Co})$
Res	$1 \cdot V(\text{Res})$

---

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Co	$1 \cdot \text{Co}$	$1 \cdot \text{Res}$	6	55

---

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Co)	21131	145,37
V(Res)	1,1589E5	340,43

---

**PAIR-WISE TESTS**

Groups	Denominator	Den.df
Controle x Acetona	$1 \cdot \text{Res}$	15
Acetona x 0,01	$1 \cdot \text{Res}$	14
Acetona x 0,1	$1 \cdot \text{Res}$	16
Acetona x 1,0	$1 \cdot \text{Res}$	17

Acetona x 10,0	1*Res	16
Acetona x 100,0	1*Res	17

---

*Average Distance between/within groups*

	Controle	Acetona	0,01	0,1	1	10	100
Controle	221,87						
Acetona	415,25	520,82					
0,01	351,72	399,98	260,13				
0,1	350,64	410,46	228,23	215,41			
1	542,74	605,8	536,55	505,1	647,31		
10	414,29	519,47	455,84	418,42	524,85	430,75	
100	415,41	524,65	464,48	425,05	512,85	381,99	391,92

---

**Ap K.** Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em água com *Perna perna* em glândulas digestivas.

---

**Matriz: Água/ Tecido: Glândula digestiva/ PERMANOVA/ Permutacional MANOVA**

---

*Resemblance worksheet*

Name: Resem1

Data type: Distance

Selection: All

Resemblance: D1 Euclidean distance

---

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Unrestricted permutation of raw data

Number of permutations: 999

---

Factors	Abbrev	Type	Levels
Concentração	Co	Fixed	7

---

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Co	1*V(Res) + 4,1379*S(Co)
Res	1*V(Res)

---

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Co	1*Co	1*Res	6	22

---

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Co)	19394	139,26
V(Res)	22234	149,11

---

*PAIR-WISE TESTS*

Groups	Denominator	Den.df
Controle x Acetona	1*Res	6
Acetona x 0,01	1*Res	6
Acetona x 0,1	1*Res	6
Acetona x 1,0	1*Res	6
Acetona x 10,0	1*Res	7
Acetona x 100,0	1*Res	6

---

*Average Distance between/within groups*

	Controle	Acetona	0,01	0,1	1	10	100
Controle	103,49						
Acetona	187,28	130,12					
0,01	234,1	181,33	239,6				
0,1	158,53	291,32	344,18	136,78			
1	201,7	347,69	400,02	139,31	113,66		
10	246,65	336,87	395,25	232,62	235,33	332,92	
100	138,44	263,38	319,38	132,65	132,36	231,14	123,81

**Ap L.** Média dos parâmetros físico químicos do teste com *Anomalocardia flexuosa*. OD = Oxigênio Dissolvido.

Sedimento rico em COT						
T0						
Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	7,65±0,03	29,33±0,52	6,82±0,53	25±2	0,00054±0,00009	0,01113±0,0014

Acetona	7,61±0,09	30,00±0,00	6,20±0,62	25±2	0,00040±0,0001	0,00728±0,001
1	7,60±0,02	30,00±0,00	6,07±0,69	25±2	0,00041±0,0001	0,00739±0,0016
10	7,61±0,11	30,00±0,00	6,12±0,99	25±2	0,00036±0,00007	0,00698±0,0019
100	7,59±0,05	29,50±0,84	6,82±0,46	25±2	0,00044±0,00003	0,00805±0,0013
1000	7,61±0,06	29,67±0,52	6,63±0,29	25±2	0,00058±0,0001	0,01098±0,0026
10000	7,57±0,03	29,17±0,41	6,57±0,75	25±2	0,00047±0,00007	0,00822±0,0016

T7

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	7,58±0,11	30,1±2,13	6,67±0,46	25±2	0,0020±0,0009	0,0389±0,022
Acetona	7,63±0,11	30,1±1,23	6,36±0,65	25±2	0,0009±0,0004	0,0188±0,010
1	7,52±0,13	29,6±0,70	6,47±0,35	25±2	0,0017±0,0007	0,0264±0,012
10	7,61±0,08	29,2±1,14	6,5±0,69	25±2	0,0015±0,0007	0,0285±0,010
100	7,57±0,09	29,2±1,23	6,02±0,24	25±2	0,0009±0,0004	0,0155±0,005
1000	7,56±0,14	28,9±1,10	5,86±0,25	25±2	0,0020±0,0008	0,0336±0,015
10000	7,60±0,08	29,2±1,03	5,5±0,25	25±2	0,0011±0,0005	0,0206±0,014

T14

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	7,56±0,06	33,00±0,63	5,52±1,09	25±2	0,0006±0,0003	0,009±0,004
Acetona	7,62±0,03	30,33±0,82	5,30±1,00	25±2	0,0013±0,0005	0,025±0,008
1	7,60±0,10	30,83±1,17	5,37±1,10	25±2	0,0008±0,0003	0,014±0,004
10	7,60±0,02	30,39±1,21	5,21±0,97	25±2	0,0010±0,0003	0,020±0,005
100	7,70±0,11	30,33±1,03	5,57±0,84	25±2	0,0010±0,0006	0,023±0,014
1000	7,64±0,18	30,33±0,82	5,68±0,99	25±2	0,0007±0,0007	0,010±0,008
10000	7,65±0,14	30,00±0,00	5,52±0,87	25±2	0,0014±0,0004	0,028±0,006

T21

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	7,48±0,12	33,50±0,71	5,90±0,57	25±2	0,0003±0,0003	0,0045±0,005
Acetona	7,56±0,30	32,00±0,00	4,85±0,35	25±2	0,0007±0,0003	0,0149±0,014

1	7,60±0,26	30,50±0,71	5,00±0,14	25±2	0,0003±0,0001	0,0056±0,001
10	7,56±0,22	31,00±0,00	4,80±0,57	25±2	0,0004±0,00001	0,0067±0,003
100	7,74±0,05	31,00±0,00	5,10±0,57	25±2	0,0004±0,00005	0,0087±0,0004
1000	7,76±0,07	30,50±0,71	5,50±0,42	25±2	0,0002±0,00005	0,0045±0,0006
10000	7,84±0,06	31,00±0,00	5,25±0,07	25±2	0,0007±0,0004	0,0212±0,014

---

**Sedimento pobre em COT**

---

T0

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	7,69±0,12	30,50±0,55	4,42±0,39	25±2	0,0021±0,0014	0,055±0,04
Acetona	7,78±0,05	30,50±0,55	5,90±0,26	25±2	0,0018±0,0002	0,050±0,01
1	7,79±0,04	31,17±0,41	6,22±0,16	25±2	0,0015±0,0002	0,042±0,01
10	7,78±0,07	31,83±0,41	5,83±0,45	25±2	0,0012±0,0004	0,035±0,01
100	7,77±0,09	31,17±0,75	5,82±0,48	25±2	0,0010±0,0004	0,029±0,01
1000	7,77±0,05	30,33±0,52	5,45±0,45	25±2	0,0008±0,0003	0,022±0,01
10000	7,71±0,05	30,33±0,52	5,17±1,12	25±2	0,0006±0,0002	0,013±0,003

T7

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	8,04±0,07	31,50±0,84	4,75±0,34	25±2	0,0020±0,002	0,11±0,095
Acetona	8,04±0,16	31,17±0,41	4,05±0,68	25±2	0,0020±0,0004	0,11±0,021
1	8,16±0,10	32,33±0,52	5,08±0,78	25±2	0,0023±0,0007	0,12±0,046
10	8,15±0,11	32,17±0,41	5,43±0,32	25±2	0,0025±0,0013	0,14±0,078
100	8,10±0,09	32,33±0,52	5,37±0,51	25±2	0,0022±0,0009	0,13±0,052
1000	8,12±0,13	32,00±0,89	6,37±0,16	25±2	0,0020±0,0004	0,11±0,019
10000	7,92±0,18	31,17±0,98	4,58±0,56	25±2	0,0020±0,0005	0,10±0,025

T14

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	7,95±0,27	32,17±1,72	5,23±0,47	25±2	0,0002	0,01
Acetona	7,97±0,28	31,50±1,87	4,92±0,80	25±2	0,0042±0,002	0,11±0,04

1	8,04±0,27	32,50±1,22	5,33±0,97	25±2	<LD	<LD
10	7,83±0,25	32,67±1,03	5,44±0,44	25±2	0,0033	0,09
100	7,96±0,30	33,33±1,03	5,77±0,23	25±2	0,0005±0,0005	0,01±0,01
1000	8,01±0,27	32,00±0,89	5,43±0,34	25±2	0,0013	0,02
10000	7,85±0,35	32,17±0,75	5,30±0,33	25±2	0,0013±0,0009	0,02±0,01

T21

Conc (ng/g)	pH	Salinidade	OD (mg/L)	Temperatura	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (µg/L)
Controle	8,29±0,18	33,50±0,71	5,40±0,14	25±2	<LD	<LD
Acetona	8,31±0,06	33,50±0,71	5,65±0,92	25±2	<LD	<LD
1	8,38±0,00	33,00±0,00	6,55±0,07	25±2	<LD	<LD
10	8,31±0,03	34,00±0,00	6,15±0,07	25±2	<LD	<LD
100	8,34±0,06	34,00±0,00	6,00±0,14	25±2	<LD	<LD
1000	8,35±0,04	32,00±0,00	5,80±0,28	25±2	<LD	<LD
10000	8,28±0,11	32,50±0,71	5,50±0,00	25±2	<LD	<LD

**Ap M.** Resultados adicionais da PCA realizada para o experimento realizado em sedimento com *Anomalocardia flexuosa*.

7.49 = inflation factor for biplot scores

BEGINNING RANDOMIZATIONS

RANDOMIZATION RESULTS

999 = number of randomizations

Axis	Eigenvalue	Eigenvalues from randomizations			p *
		Minimum	Average	Maximum	
1	13.567	6.1158	7.8505	10.222	0.001
2	6.4550	5.0654	6.3790	8.5782	0.428
3	4.5705	3.8662	5.2763	6.5825	0.966
4	2.7282	3.1197	4.3339	5.4014	1.000
5	2.0377	2.2409	3.5258	4.5497	1.000
6	1.6933	1.2998	2.7075	3.6831	0.997
7	0.94820	0.70957	1.9270	2.9583	0.995
8	0.79159E-12	0.41396E-12	0.86348E-12	0.10649E-11	0.780
9	0.58680E-15	0.33294E-15	0.49025E-15	0.74820E-15	0.103
10	0.51660E-15	0.24859E-15	0.38846E-15	0.60306E-15	0.005

\* p-value for an axis is (n+1)/(N+1), where n is the number of randomizations with an

eigenvalue for that axis that is equal to or larger than the observed eigenvalue for that axis. N is the total number of randomizations.

---

#### APPLICATION OF STOPPING RULES

---

Axis	Acronym	Explanation (see Peres-Neto, Jackson&Somers 2005)
1	Rnd-Lambda	Observed eigenvalue as compared to randomizations
2	Rnd-F	Observed pseudo-F-ratio compared to randomizations
3	Avg-Rnd	Observed eigenvalue as compared to average eigenvalue from randomizations
5	BS	Observed eigenvalue as compared to broken-stick eigenvalue

Notes:

Rnd-Lambda is relatively robust to non-normal data.

Rnd-F performs well with uncorrelated variables and multivariate normality.

Avg-Rnd performs well with multivariate normal data without uncorrelated variables.

BS performs well when variables are highly correlated.

---

#### VARIANCE EXTRACTED, FIRST 7 AXES

---

Axis	Eigenvalue	% of Variance	Cum.% of Var.	Broken-stick Eigenvalue
1	13.567	42.397	42.397	4.058
2	6.455	20.172	62.569	3.058
3	4.570	14.283	76.852	2.558
4	2.728	8.526	85.377	2.225
5	2.038	6.368	91.745	1.975
6	1.693	5.292	97.037	1.775
7	0.948	2.963	100.000	1.608

**Ap N.** Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em sedimentos com *Anomalocardia flexuosa* em brânquias.

---

**Matriz: Sedimento/ Tecido: Brânquias/ PERMANOVA/ Permutacional MANOVA**

---

*Resemblance worksheet*

Name: Resemblance

Data type: Distance

Selection: All

---

---

 Resemblance: D1 Euclidean distance
 

---

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Permutation of residuals under a reduced model

Number of permutations: 999

Factors	Abbrev	Type	Levels
Concentração	Co	Fixed	7
MO	MO	Fixed	2

---

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Co	$1*V(\text{Res}) + 10,086*S(\text{Co})$
MO	$1*V(\text{Res}) + 34,764*S(\text{MO})$
Co x MO	$1*V(\text{Res}) + 5,0429*S(\text{CoxMO})$
Res	$1*V(\text{Res})$

---

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Co	1*Co	1*Res	6	60
MO	1*MO	1*Res	1	60
Co x MO	1*Co x MO	1*Res	6	60

---

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Co)	90559	300,93
S(MO)	1,1348E6	1065,3
S(CoxMO)	2,3628E5	486,09
V(Res)	36001	189,74

---

**PAIR-WISE TESTS**

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Rico' of factor 'MO'

Groups	Denominator	Den.df
Controle x Acetona	1*Res	8
Acetona x 1,0	1*Res	9

Acetona x 10,0	1*Res	8
Acetona x 100,0	1*Res	6
Acetona x 1000,0	1*Res	9
Acetona x 10000,0	1*Res	10

---

*Average Distance between/within groups*

Within level 'Rico' of factor 'MO'

	Controle	Acetona	0,01	0,1	1	10	100
Controle	149,94						
Acetona	144,37	174,15					
1,0	191,37	211,26	228,5				
10,0	198,95	215,62	214,62	247,93			
100,0	193,67	189,56	247,11	243,7	251,44		
1000,0	166,79	184,06	182,9	187,73	207,12	159,47	
10000,0	273,99	308,2	266,44	263,08	333,56	251,72	251,78

---

*PAIR-WISE TESTS*

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Pobre' of factor 'MO'

Groups	Denominator	Den.df
Controle x Acetona	1*Res	10
Acetona x 1,0	1*Res	9
Acetona x 10,0	1*Res	9
Acetona x 100,0	1*Res	11
Acetona x 1000,0	1*Res	7
Acetona x 10000,0	1*Res	9

---

*Average Distance between/within groups*

Within level 'Pobre' of factor 'MO'

	Controle	Acetona	0,01	0,1	1	10	100
Controle	305,26						
Acetona	315,5	356,4					
1,0	372,03	324,35	256,82				

10,0	381,85	297	212,84	171,52			
100,0	444,18	390,27	254,33	268,81	286,42		
1000,0	1078,8	1204,7	1387,6	1397,1	1478	166,04	
10000,0	1101,9	1228,9	1409,2	1422,9	1497,4	146,64	144,87

---

*PAIR-WISE TESTS*

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'MO'

---

Within level 'Controle' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	9

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	149,94	
Pobre	1704,4	305,26

---

Within level 'Acetona' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	9

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	174,15	
Pobre	1855,8	356,4

---

Within level '1,0' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	9

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	228,5	
Pobre	1901,6	256,82

---

Within level '10,0' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	8

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	247,93	
Pobre	1955,5	171,52

---

*Within level '100,0' of factor 'Concentração'*

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	8

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	251,44	
Pobre	2135,8	286,42

---

*Within level '1000,0' of factor 'Concentração'*

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	7

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	159,47	
Pobre	599,18	166,04

---

*Within level '10000,0' of factor 'Concentração'*

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	10

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	251,78	
Pobre	517,11	144,87

---

**Ap O.** Resultados adicionais da PERMANOVA realizada para o experimento realizado em sedimentos com *Anomalocardia flexuosa* em brânquias.

---

**Matriz: Sedimento/ Tecido: Glândula digestiva/ PERMANOVA/ Permutacional MANOVA**

---

*Resemblance worksheet*

Name: Resemblance

---

---

Data type: Distance

Selection: All

Resemblance: D1 Euclidean distance

---

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Permutation of residuals under a reduced model

Number of permutations: 999

---

Factors	Abbrev	Type	Levels
Concentração	Co	Fixed	7
MO	MO	Fixed	2

---

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Co	$1 \cdot V(\text{Res}) + 10,567 \cdot S(\text{Co})$
MO	$1 \cdot V(\text{Res}) + 36,137 \cdot S(\text{MO})$
Co x MO	$1 \cdot V(\text{Res}) + 5,2837 \cdot S(\text{CoxMO})$
Res	$1 \cdot V(\text{Res})$

---

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Co	$1 \cdot \text{Co}$	$1 \cdot \text{Res}$	6	62
MO	$1 \cdot \text{MO}$	$1 \cdot \text{Res}$	1	62
Co x MO	$1 \cdot \text{Co x MO}$	$1 \cdot \text{Res}$	6	62

---

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Co)	82117	286,56
S(MO)	8094,5	89,97
S(CoxMO)	1,6671E5	408,3
V(Res)	49290	222,01

---

*PAIR-WISE TESTS*

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Rico' of factor 'MO'

Groups	Denominator	Den.df
--------	-------------	--------

Controle x Acetona	1*Res	9
Acetona x 1,0	1*Res	6
Acetona x 10,0	1*Res	10
Acetona x 100,0	1*Res	9
Acetona x 1000,0	1*Res	9
Acetona x 10000,0	1*Res	10

---

*Average Distance between/within groups*

Within level 'Rico' of factor 'MO'

	Controle	Acetona	0,01	0,1	1	10	100
Controle	106,94						
Acetona	129,36	141,64					
1,0	149,62	128,92	167,99				
10,0	195,14	191,98	176,09	161,74			
100,0	209,58	186,38	168,36	149,97	119,71		
1000,0	537,98	574,55	568,36	511,48	539,24	721,27	
10000,0	1423,6	1501,5	1509,3	1461,6	1522,8	1070,8	219,46

---

*PAIR-WISE TESTS*

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'Concentração'

Within level 'Pobre' of factor 'MO'

Groups	Denominator	Den.df
Controle x Acetona	1*Res	8
Acetona x 1,0	1*Res	8
Acetona x 10,0	1*Res	8
Acetona x 100,0	1*Res	10
Acetona x 1000,0	1*Res	7
Acetona x 10000,0	1*Res	8

---

*Average Distance between/within groups*

Within level 'Pobre' of factor 'MO'

	Controle	Acetona	0,01	0,1	1	10	100
Controle	57,23						

Acetona	139,43	102,24					
1,0	105,79	94,062	90,786				
10,0	135,77	90,327	79,603	72,875			
100,0	283,8	224,34	233,64	218,47	352,27		
1000,0	182,99	151,15	178,61	194,17	273,67	56,194	
10000,0	137,25	125,99	139,36	156,96	260,38	68,573	60,747

---

*PAIR-WISE TESTS*

Term 'CoxMO' for pairs of levels of factor 'MO'

---

Within level 'Controle' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	9

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	106,94	
Pobre	215,01	57,23

---

Within level 'Acetona' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	8

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	141,64	
Pobre	208,79	102,24

---

Within level '1,0' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	6

*Average Distance between/within groups*

	Rico	Pobre
Rico	167,99	
Pobre	251,26	90,786

---

Within level '10,0' of factor 'Concentração'

Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	10
<i>Average Distance between/within groups</i>		
	Rico	Pobre
Rico	161,74	
Pobre	164,25	72,875
<hr/>		
Within level '100,0' of factor 'Concentração'		
Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	11
<i>Average Distance between/within groups</i>		
	Rico	Pobre
Rico	119,71	
Pobre	274,09	352,27
<hr/>		
Within level '1000,0' of factor 'Concentração'		
Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	8
<i>Average Distance between/within groups</i>		
	Rico	Pobre
Rico	721,27	
Pobre	518,98	56,194
<hr/>		
Within level '10000,0' of factor 'Concentração'		
Groups	Denominator	Den. Df
Rico x Pobre	1*Res	10
<i>Average Distance between/within groups</i>		
	Rico	Pobre
Rico	219,46	
Pobre	1350,8	60,747
<hr/>		

## Conclusão Final

Para os testes de toxicidade, os níveis de efeito em água foram mais acentuados na concentração de 1000 µg/l, enquanto em sedimento os efeitos foram detectados nos testes agudos a partir da concentração 1 ng/g, porém com efeitos mais consistentes a partir de 1000 ng/g apenas em sedimentos com maiores concentrações de matéria orgânica. Para os biomarcadores foi possível observar efeito nos organismos a partir da concentração de 0,1 µg/l (ou 100 ng/l) em água, enquanto em sedimento é possível observar efeitos a níveis subcelulares a partir da concentração de 1000 ng/g (Tab. 11).

As análises de biomarcadores mostraram que os efeitos mais severos aconteceram em concentrações mais baixas do que testes de toxicidade (a partir de 0,1 µg/l), evidenciando efeitos em níveis menores de organização biológica (Tab 11), o que poderia ser esperado, já que estes efeitos ocorrem rapidamente e em níveis menores de organização biológica. Também é possível elucidar que em ambas matrizes os efeitos aconteceram em concentrações que podem ser encontradas no ambiente, porém esses estão mais evidentes em sedimento, principalmente quando houve maiores níveis de matéria orgânica. Esse fato pode ser explicado pelas características físico-químicas da diclofluanida, que pode ser rapidamente degradada quando dissolvida na água; porém devido ao seu alto Kow, essa substância pode adsorver aos sedimentos, em especial na MO, mantendo uma estabilidade e persistência; dessa forma os efeitos são mais observados nesta matriz.

**Tab 11.** Tabela de efeitos da diclofluanida para os diferentes "endpoints" testados. Verde: não indica efeito; Amarelo: indica efeitos brandos; Vermelho: efeito pronunciado. NT = Não Testado.

Água (µg/l)	0,01	0,1	1	10	100	1000
Toxicidade	NT					
Biomarcadores						NT

Sedimento Rico MO (ng/g)	1	10	100	1000	10000
Toxicidade					
Biomarcadores					
Sedimento Pobre MO (ng/g)	1	10	100	1000	10000
Toxicidade					
Biomarcadores					

Os dados de biomarcadores corroboraram com os testes de toxicidade. Em água é possível observar um efeito aos organismos nas maiores concentrações testadas e em sedimento é possível observar um aumento de efeito nos organismos nos sedimentos ricos em matéria orgânica. Na análise de biomarcadores este fato ficou bastante evidenciado, indicando que as concentrações de matéria orgânica do sedimento afetam nos efeitos da diclofluanida e sua estabilidade.

Com base nos resultados adquiridos nesta tese, é possível evidenciar a importância da utilização de diferentes linhas de evidência para que resultados mais robustos sejam adquiridos. Os ensaios de ecotoxicidade em conjunto com os biomarcadores, bem como o estudo em diferentes matrizes, trouxe resultados mais claros e pode elucidar efeitos relacionados a diclofluanida. Diante dos testes realizados, a diclofluanida mostrou-se uma substância que causa danos tanto a organismos não-alvo (*Nitocra* sp., *Echinometra lucunter*, *Tiburonella viscana* e *Anomalocardia flexuosa*), como também a espécies alvos das tintas (*Perna perna*), e dessa forma, pode trazer risco ecológico potencial para o ambiente. O estudo deu subsídios para conhecer a toxicidade da diclofluanida e danos a nível sub-celular dentro de condições pré estabelecidas e com organismos específicos. Como próximos passos, esses resultados podem ser transformados em índices que possibilitem fazer uma avaliação do risco ecológico. Estes dados podem ser repassados para os órgãos competentes de gestão e qualidade ambiental para tomadas de decisão.

Com base nos dados obtidos apenas neste estudo, poderiam ser sugeridos 3 níveis de concentrações limites de diclofluanida para o ambiente: em água as concentrações limites permitidas no ambiente poderiam ser inferiores a 1 µg/l, já que essa foi a concentração que não apresentou qualquer tipo de efeito aos organismos. Sedimento das regiões costeiras poderiam ser limitadas à concentrações inferiores a 1 ng/g por se tratar de uma zona que recebe maiores quantidades de matéria orgânica provenientes de rios e outros despejos antrópicos, bem como por ser uma região altamente impactada pelo homem por outros inúmeros fatores e compostos. Para zonas marinhas, mais distantes da costa e que possivelmente tem menores concentrações de matéria orgânica, podem ser estabelecidas a concentrações ambientais limite de 10 µg/g. São poucos os resultados apresentados até o momento para afirmar que esses são as concentrações ideais para estabelecimento de diretrizes e concentrações limites para o ambiente. Porém esses dados em conjunto com os demais que estão sendo adquirido pela rede nacional de tintas anti-incrustantes de terceira geração pode se tratar de um material valioso para estabelecimento de concentrações ambientais permitidas.

Outras formas de minimizar impactos nas zonas costeiras pelos compostos anti-incrustantes seria o controle do tempo em que embarcações poderiam permanecer atracadas nas zonas portuárias (estas deveriam se manter nesta área apenas durante o tempo de carregamento ou descarregamento). Estas poderiam ficar fundeadas em regiões longe da costa, aguardando até que possam realizar suas atividades dentro do porto. Também poderiam optar por novas tintas ou alternativas tecnológicas, como por exemplo, tintas que não sejam facilmente lixiviadas dos cascos, ou baseadas em propriedades físicas.

Pode-se dizer que comparado a compostos já banidos da composição de tintas anti-incrustantes, (e.g. TBT) a diclofluanida constitui um composto que aparentemente representa menores danos ao ambiente. Mesmo não sendo um composto ideal, pela toxicidade comprovada no presente estudo, esta substância ainda pode ser uma alternativa recomendada como o princípio das tintas anti-incrustantes, até que compostos menos tóxicos sejam desenvolvidos.

#### Observações secundárias

Com os estudos realizados nesta tese, um fator secundário que pode ser observado foi que em grande parte dos testes ecotoxicológicos os organismos expostos ao controle acetona pareceram apresentar melhor condição do que aqueles expostos ao controle água. Esse resultado pode ser explicado pelo efeito de hormêse. Trata-se de um conceito muitas vezes ignorados em estudos de ecotoxicologia. Consiste em um efeito estimulatório que ocorre em organismos expostos a baixas concentrações de determinada substância, ainda ou mesmo que ocorram efeitos negativos quando em altas concentrações. Ao que tudo indica as baixas concentrações de acetona utilizadas para dissolver a diclofluanida parecem gerar efeitos positivos no desenvolvimento das larvas de ouriço-do-mar e de náuplios e copepoditos do copepoda *Nitocra* sp.

#### **Agradecimentos**

Os meus mais sinceros agradecimentos aos meus colegas de laboratório do NEPEA-UNESP por toda a assintência nas análises e nos experimentos. Esse trabalho teve suporte da Fundação de Amparo a Pesquisa - FAPESP (Processo #2016/02029-4), Financiamento de Estudos e Projetos - FINEP (Processo #1111/13) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo #456372/2013-0).

## Referências

- Abessa, D. de S., 2002. Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil. Dr. Thesys Universidade São Paulo Inst. Ocean.
- Abessa, D.M. de S., Zaroni, L.P., Sousa, E.C.P.M. de, Gasparro, M.R., Pereira, C.D.S., Rachid, B.R. de F., Depledge, M., King, R.S., 2005. Physiological and cellular responses in two populations of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 217–225.
- ABNT, N., 2012. 15350, 2012. Ecotoxicologia Aquática–Toxicidade Crônica Curta Duração–Método Ens. Com Ouriço--Mar Echinodermata Echinoidea.
- ABNT, N., 2008. 15638/2008. Qual. Água - Determinação Toxicidade Aguda Sedimentos Mar. Ou Estuarinos Com Anfípodos.
- Albanis, T.A., Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., 2002. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere* 48, 475–485.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007a. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coat.* 59, 2–20.
- Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., de Melo Loureiro, A.P., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., 2007b. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600.
- ASTM, 2008. Standard Guide for “Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for Selection of Samplers Used to Collect Benthic Invertebrates.”
- Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clearandeu, C., Jebali, J., Boussetta, H., 2009. Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in clams *Ruditapes decussatus* sampled from Tunisian coastal areas. *Environ. Monit. Assess.* 155, 119–128.
- Barreira, L.A., Mudge, S.M., Bebianno, M.J., 2007. Oxidative stress in the clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon body burden. *Environ. Toxicol. Int. J.* 22, 203–221.
- Bellas, J., 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 367, 573–585.
- Bjørning-Poulsen, M., Andersen, H.R., Grandjean, P., 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ. Health* 7, 50.

- Bonnineau, C., Moeller, A., Barata, C., Bonet, B., Proia, L., Sans-Piché, F., Schmitt-Jansen, M., Guasch, H., Segner, H., 2012. Advances in the multibiomarker approach for risk assessment in aquatic ecosystems, in: *Emerging and Priority Pollutants in Rivers*. Springer, pp. 147–179.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Kratke, R., Fishelson, L., Hansen, P.-D., 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgol. Mar. Res.* 53, 219–243.
- Brito, I.A., 2010. Avaliação da qualidade da água de três reservatórios do Rio Paraíba do Sul através de biomarcadores em *Pimelodus Maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae) e *Oligosarcus Hepsetus* (Characiformes, Characidae).
- Brown, R., Galloway, T., Lowe, D., Browne, M., Dissanayake, A., Jones, M., Depledge, M., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 66, 267–278.
- Burgess, R., Scott, K., 1992. The significance of in-place contaminated marine sediments on the water column: processes and effects.
- Buruaem, L.M., Castro, Í.B., Hortellani, M.A., Taniguchi, S., Fillmann, G., Sasaki, S.T., Varella Petti, M.A., Sarkis, J.E. de S., Bicego, M.C., Maranhão, L.A., Davanso, M.B., Nonato, E.F., Cesar, A., Costa-Lotufo, L.V., Abessa, D.M. de S., 2013. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 130, 179–189.
- Carbery, K., Owen, R., Frickers, T., Otero, E., Readman, J., 2006. Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 635–644.
- Carteau, D., Vallée-Réhel, K., Linossier, I., Quiniou, F., Davy, R., Compère, C., Delbury, M., Fay, F., 2014. Development of environmentally friendly antifouling paints using biodegradable polymer and lower toxic substances. *Prog. Org. Coat.* 77, 485–493.
- Castro, I.B., Perina, F., Fillmann, G., 2012a. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1781–1799.
- Castro, Í.B., Rossato, M., Fillmann, G., 2012b. Imposed reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 947–954.

- Castro, Í.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Quím. Nova* 34, 1021–1031.
- Champ, M.A., 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.* 258, 21–71.
- Chen, L., Zhang, H., Sun, J., Wong, Y.-H., Han, Z., Au, D.W., Bajic, V.B., Qian, P.-Y., 2014. Proteomic changes in brain tissues of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after chronic exposure to two antifouling compounds: Butenolide and 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT). *Aquat. Toxicol.* 157, 47–56.
- Cheung, V., Wedderburn, R., Depledge, M., 1998. Molluscan lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of a pollution gradient in Tolo Harbour, Hong Kong. *Mar. Environ. Res.* 46, 237–241.
- Choudhry, G.G., 1984. Humic substances. Structural, photophysical, photochemical and free radical aspects and interactions with environmental chemicals. Gordon & Breach Science Publishers, Inc.
- Cima, F., Bragadin, M., Ballarin, L., 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes: I. Sea-Nine 211<sup>TM</sup> and chlorothalonil. *Aquat. Toxicol.* 86, 299–312.
- Clark, T., Watkins, D.A., 1978. Photolysis of dichlofluanid. *Pestic. Sci.* 9, 225–228.
- Comber, S.D.W., Gardner, M.J., Boxall, A.B.A., 2002. Survey of four marine antifoulant constituents (copper, zinc, diuron and Irgarol 1051) in two UK estuaries. *J. Environ. Monit.* 4, 417–425.
- Cruz, A.C.F., Davanso, M.B., Araujo, G.S., Buruaem, L.M., Santaella, S.T., de Moraes, R.D., Abessa, D.M., 2014. Cumulative influences of a small city and former mining activities on the sediment quality of a subtropical estuarine protected area. *Environ. Monit. Assess.* 186, 7035–7046.
- Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E.L., 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 453–465.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 56, 443–470.
- Depledge, M., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. *Nondestruct. Biomark. Vertebr.* 271–295.
- Domingos, F.X.V., 2006. Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Evans, S., Birchenough, A., Brancato, M., 2000. The TBT ban: out of the frying pan into the fire? *Mar. Pollut. Bull.* 40, 204–211.
- Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.* 140–141, 353–365.
- Fent, K., Woodin, B.R., Stegeman, J.J., 1998. Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 121, 277–288.
- Fernandez, M.A., Pinheiro, F., 2007. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *Int. J. Environ. Health* 1, 427–448.
- Fernandez-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., Chisti, Y., 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Anal. Chim. Acta* 456, 303–312.
- Fishelson, L., Bresler, V., Manelis, R., Zuk-Rimon, Z., Dotan, A., Hornung, H., Yawetz, A., 1999. Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Sci. Total Environ.* 226, 121–131.
- Forget, J., Beliaeff, B., Bocquene, G., 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquat. Toxicol.* 62, 195–204.
- Fuchsman, P.C., Barber, T.R., 2000. Spiked sediment toxicity testing of hydrophobic organic chemicals: bioavailability, technical considerations, and applications. *Soil Sediment Contam.* 9, 197–218.
- Furdek, M., Mikac, N., Bueno, M., Tessier, E., Cavalheiro, J., Monperrus, M., 2016. Organotin persistence in contaminated marine sediments and porewaters: In situ degradation study using species-specific stable isotopic tracers. *J. Hazard. Mater.* 307, 263–273.
- Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C., 2007. Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 145, 542–552.
- Gagné, F., Blaise, C., 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res.* 27, 1669–1682.

- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Zhou, J.L., 2007. Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. *Environ. Int.* 33, 70–77.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2004. Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.* 58, 625–630.
- Godoi, A.F.L., Favoreto, R., Santiago-Silva, M., 2003. Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos. *Quím. Nova* 26, 708–716.
- Gultekin, F., Delibas, N., Yasar, S., Kilinc, I., 2001. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch. Toxicol.* 75, 88–96.
- Gusso-Choueri, P.K., Choueri, R.B., de Araújo, G.S., Cruz, A.C.F., Stremel, T., Campos, S., de Sousa Abessa, D.M., Ribeiro, C.A.O., 2015. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 18047–18065.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hagger, J.A., Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 811–816.
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C., 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms—a review—. *Chemosphere* 37, 1335–1362.
- Hamwijk, C., Schouten, A., Foekema, E.M., Ravensberg, J.C., Collombon, M.T., Schmidt, K., Kugler, M., 2005. Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. *Chemosphere* 60, 1316–1324.
- Hannam, M.L., Hagger, J.A., Jones, M.B., Galloway, T.S., 2008. Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm *Arenicola marina* (Annelida: Polychaeta). *Environ. Pollut.* 152, 342–350.
- Harino, H., 2009. Overview, in: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Eds.), . Springer, Tokyo, pp. 431–432.
- Harino, H., Arai, T., Ohji, M., Nobuyuki, M., 2009. Asia, in: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Eds.), . Springer, Tokyo, pp. 345–362.
- Heil, J., Reifferscheid, G., Hellmich, D., Hergenröder, M., Zahn, R., Setlow, R., 1991. Genotoxicity of the fungicide dichlofluanid in seven assays. *Environ. Mol. Mutagen.* 17, 20–26.
- Heimbach, F., 1983. Acute toxicity of DICHLOFLUANID (90% premix) to water fleas. Rep. No HbDm 21.

- Henderson, R., Hobbie, J., Landrigan, P., Mattisoti, D., Perera, F., Pfftaer, E., Silbergeld, E., Wogan, G., 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 7, 3–9.
- Hirota, J., Szyper, J.P., 1975. Separation of total particulate carbon into inorganic and organic components. *Limnol. Oceanogr.* 20, 896–900.
- IMO, 2005. Antifouling Systems. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. International Maritime Organization, London.
- IMO, 2000. Study of Greenhouse Gas Emissions from Ships. Final Report to the International Maritime Organization.
- Jones, K.C., De Voogt, P., 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ. Pollut.* 100, 209–221.
- Karapanagioti, H.K., Kleineidam, S., Sabatini, D.A., Grathwohl, P., Ligouis, B., 2000. Impacts of heterogeneous organic matter on phenanthrene sorption: equilibrium and kinetic studies with aquifer material. *Environ. Sci. Technol.* 34, 406–414.
- Karlsson, J., Breitholtz, M., Eklund, B., 2006. A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1661–1667.
- Keen, J.H., Habig, W., Jakoby, W., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Kehrig, H.A., Costa, M., Moreira, I., Malm, O., 2006. Total and methyl mercury in different species of molluscs from two estuaries in Rio de Janeiro State. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 1409–1418.
- Keppler, C., Ringwood, A.H., 2001. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. *Aquat. Toxicol.* 54, 195–204.
- Kim, N.S., Hong, S.H., An, J.G., Shin, K.-H., Shim, W.J., 2015. Distribution of butyltins and alternative antifouling biocides in sediments from shipping and shipbuilding areas in South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.010>
- Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.* 30, 235–248.
- Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2000. Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 893, 143–156.
- Langston, W.J., Pope, N.D., 1995. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 32–43.

- Lesueur, T., Boulangé-Lecomte, C., Restoux, G., Deloffre, J., Xuereb, B., Le Menach, K., Budzinski, H., Petrucciani, N., Marie, S., Petit, F., 2015. Toxicity of sediment-bound pollutants in the Seine estuary, France, using a *Eurytemora affinis* larval bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 169–175.
- Lins, J., Kirschnik, P.G., Queiroz, V., Cirio, S.M., 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev Acad Agrár Ambient* 8, 469–484.
- Linz, D., Garling, D., 1995. Toxicology of selected neurotoxic agents. *Environ. Med. Brooks SM Gochfeld M Herzstein J Schenker M Jackson R Eds St Louis Mosby* 129–138.
- Lotufo, G., Abessa, D., 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. *NASCIMENTO IA SOUSA ECPM NIPPER M Métod. Em Ecotoxicologia Mar. Apl. Para O Bras. São Paulo Artes Gráficas E Ind.* 151–162.
- Lowe, D., Moore, M., Evans, B., 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldendorf* 91, 135–140.
- Lowe, D., Soverchia, C., Moore, M., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 33, 105–112.
- Luczak, C., Janquin, M.-A., Kupka, A., 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia* 345, 87–94.
- Maranho, L.A., Pereira, C.D.S., Choueri, R.B., Cesar, A., Gusso-Choueri, P.K., Torres, R.J., de Souza Abessa, D.M., Morais, R.D., Mozeto, A.A., DeValls, T.A., 2012. The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys. *J. Environ. Monit.* 14, 2608–2615.
- Martin, H., Worthing, C., 1968. *Pesticide Manual*, Brit. Crop Prot Counc.
- Martinez, K., Ferrer, I., Barceló, D., 2000. Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 879, 27–37.
- Martinez, K., Ferrer, I., Hernando, M., Fernández-Alba, A.R., Marcé, R.M., Borrull, F., Barcelo, D., 2001. Occurrence of antifouling biocides in the Spanish Mediterranean marine environment. *Environ. Technol.* 22, 543–552.
- Martins, T., Vargas, V.M., 2013. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8, 1–11.

- Melo, S., Abessa, D., 2002. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando anfípodos, in: Métodos Em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações No Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria. pp. 163–178.
- Mochida, K., Fujii, K., 2009a. Further Effects of Alternative Biocides on Aquatic Organisms, in: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Eds.), . Springer, Tokyo, pp. 383–393.
- Mochida, K., Fujii, K., 2009b. Toxicity for Aquatic Organisms, in: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Eds.), . Springer, Tokyo, pp. 148–160.
- Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Pollut. Bull.
- Moser, J.R., 2011. Biomarcadores moleculares no camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda), submetido a estresse ambiental e infectado pelo vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Virus, WSSV).
- Mudroch, A., MacKnight, S.D., 1994. Handbook of techniques for aquatic sediments sampling. CRC Press.
- Mukherjee, A., Mohan Rao, K.V., Ramesh, U.S., 2009. Predicted concentrations of biocides from antifouling paints in Visakhapatnam Harbour. J. Environ. Manage. 90, S51–S59.
- Nipper, M., Bailey, H., Jose, V.F., Prósperi, V.A., 1990. Marine bioassay and their application in coastal management and biological monitoring. Presented at the II Simpósio da Costa Sul e Sudeste Brasileira - Estrutura, Função e Manejo., ACIESP, Águas de Lindóia, pp. 160–170.
- Ohkuma, S., Moriyama, Yoshino., Takano, T., 1982. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2758–2762.
- Okamura, H., Mieno, H., 2006. Present Status of Antifouling Systems in Japan: Tributyltin Substitutes in Japan, in: Konstantinou, I.K. (Ed.), . Springer-Verlag, Berlin, pp. 201–212.
- Olive, P.L., 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. Environ. Mol. Mutagen. 11, 487–495.
- Park, M.S., Kim, Y.D., Kim, B.-M., Kim, Y.-J., Kim, J.K., Rhee, J.-S., 2016. Effects of antifouling biocides on molecular and biochemical defense system in the gill of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. PLoS One 11, e0168978.
- Pereira, C.D.S., 2004. Utilização de biomarcadores como indicadores de efeito e exposição a contaminantes em mexilhões da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) provenientes do Canal de São Sebastião, SP.
- Pereira, C.D.S., Abessa, D.M., Choueri, R.B., Almagro-Pastor, V., Cesar, A., Maranhão, L.A., Martín-Díaz, M.L., Torres, R.J., Gusso-Choueri, P.K., Almeida, J.E., 2014.

- Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Mar. Environ. Res.* 96, 118–126.
- Perina, F., de Souza Abessa, D., Pinho, G., Fillmann, G., 2011. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology* 1–11.
- Perina, F.C., 2009. Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Brasil.
- Piccolo, A., 1994. Interactions between organic pollutants and humic substances in the environment. *Humic Subst. Glob. Environ. Implic. Hum. Health* 961–979.
- Power, E., Chapman, P., 1992. Assessing sediment quality. *Sediment Toxic. Assess. Lewis Publ. Boca Raton Fla.* 1992 P 1-18 3 Fig 1 Tab 42 Ref.
- Ramos-Gómez, J., Coz, A., Viguri, J.R., Luque, Á., Martín-Díaz, M.L., DelValls, T.Á., 2011. Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. *Environ. Pollut.* 159, 1914–1922.
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125.
- Richardson, S.D., Kimura, S.Y., 2015. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 88, 546–582.
- Ringwood, A., Hameedi, M., Lee, R., Brouwer, M., Peters, E., Scott, G., Luoma, S., Digiulio, R., 1999. Bivalve biomarker workshop: overview and discussion group summaries. *Biomarkers* 4, 391–399.
- Ringwood, A.H., Connors, D.E., Hoguet, J., 1998. Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 166, 163–171.
- Rocha, P., Faria, A., Borges, L., Silva, L., Silva, A., Ferreira, E., 2013. Sorção e dessorção do diuron em quatro latossolos brasileiros. *Planta Daninha* 31, 231–238.
- Rossi, S., 2008. Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei).
- Said-Pullicino, D., Erriquens, F.G., Gigliotti, G., 2007. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresour. Technol.* 98, 1822–1831.
- Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2003. Photocatalyzed degradation of the biocides chlorothalonil and dichlofluanid over aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions. *Appl. Catal. B Environ.* 46, 175–188.

- Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2001. Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* 930, 135–144.
- Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2002. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 327–332.
- Schouten, A., Mol, H., Hamwijk, C., Ravensberg, J., Schmidt, K., Kugler, M., 2005. Critical Aspects in the Determination of the Antifouling Compound Dichlofluanid and its Metabolite DMSA (N, N-dimethyl-N'-phenylsulfamide) in Seawater and Marine Sediments. *Chromatographia* 62, 511–517.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.
- Senesi, N., 1992. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Total Environ.* 123, 63–76.
- Senesi, N., Chen, Y., 1989. Interactions of toxic organic chemicals with humic substances, in: *Toxic Organic Chemicals in Porous Media*. Springer, pp. 37–90.
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287–290.
- Silva-Cavalcanti, J.S., Costa, M.F., 2011. Fisheries of *Anomalocardia brasiliensis* in tropical estuaries. *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 6, 86–99.
- Sonak, S., Pangam, P., Giriyan, A., Hawaldar, K., 2009. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. *J. Environ. Manage.* 90, S96–S108.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons.
- Stirling, R., Temiz, A., 2014. Fungicides and insecticides used in wood preservation. *Deterioration Prot. Sustain. Biomater.* 185–201.
- Sutcu, R., Altuntas, I., Buyukvanli, B., Akturk, O., Ozturk, O., Koylu, H., Delibas, N., 2007. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Toxicol. Ind. Health* 23, 13–17.
- Suzuki, T., Nojiri, H., Isono, H., Ochi, T., 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. *Toxicology* 204, 97–107.
- Thomas, K.V., Blake, S.J., Waldock, M.J., 2000. Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 739–745.
- Thomas, K.V., Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling J. Bioadhesion Biofilm Res.* 26, 73–88.

- Thomas, K.V., Langford, K.H., 2009. The Analysis of Antifouling Paint Biocides in Water, Sediment and Biota, in: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Eds.), . Springer, Tokyo, pp. 311–327.
- Thomas, K.V., McHugh, M., Hilton, M., Waldock, M., 2003. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. *Environ. Pollut.* 123, 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00343-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00343-3)
- Thomas, K.V., McHugh, M., Waldock, M., 2002. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Sci. Total Environ.* 293, 117–127.
- Toan, V.D., Mai, N.T., 2017. Contamination of Selected Persistent Organic Pollutants (POPs) in Sediment of Some Areas in Vietnam, in: *Sedimentation Engineering*. IntechOpen.
- Togni, V., 2007. Efeito da salinidade sobre a resposta do sistema antioxidante e expressão de Hsp70 em siris (gênero *Callinectes*). PhD Diss Universidade Fed. Paraná.
- Tomlin, C.D., 2009. *The pesticide manual: A world compendium*. British Crop Production Council.
- Travasso, R.A.P., 2011. Avaliação do perfil de biomarcadores enzimáticos em *Sardina pilchardus*.
- USEPA, 2000. Technical basis for the derivation of equilibrium partitioning sediment guidelines (ESGs) for the protection of benthic organisms: nonionic organics. AScl Corp., Newport, OR (United States).
- USEPA, 1993. Guidance manual: Bedded sediment bioaccumulation tests. AScl Corp., Newport, OR (United States).
- van Hattum, B., Baart, A., Boon, J., 2006. Emission Estimation and Chemical Fate Modelling of Antifoulants, in: Konstantinou, I.K. (Ed.), . Springer-Verlag, Berlin, pp. 101–120.
- Van Wezel, A.P., van Vlaardingen, P., 2004. Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat. Toxicol.* 66, 427–444.
- Verdouw, H., Van Echteld, C., Dekkers, E., 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399–402.
- Viarengo, A., Moore, M., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R., Farrar, S., 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol.* 94, 251–257.
- Vouvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in

- Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 938–946.
- Walker, C., Hopkin, S., Sibly, R., Peakall, D., 1996. Principles of ecotoxicology.
- Wentworth, C.K., 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geol.* 30, 377–392.
- Wills, E., 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. *Biochem. Toxicol. Pract. Approach.*
- World Health Organization, 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.
- Xu, X., Wang, X., Li, Y., Wang, Yonghua, Wang, Yuan, 2011. Acute toxicity and synergism of binary mixtures of antifouling biocides with heavy metals to embryos of sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1009–1021.
- Yamano, T., Morita, S., 1995. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 1–7.
- Yamano, T., Morita, S., 1993. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 271–278.
- Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology: past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* 50, 75–104.
- Zhang, X., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J., He, H., Jin, Q., Guo, L., Alemany, M., Zhang, L., Shi, Y., 2002. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ.* 9, 790.
- Zhang, Y., Song, J., Yuan, H., Xu, Y., He, Z., Duan, L., 2010. Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 19–25.