

EFEITOS SUBLETAIS DO DCOIT ASSOCIADO A
NANOMATERIAIS ANTI-INCRUSTANTES
INOVADORES SOBRE O MEXILHÃO *PERNA PERNA*

ISABELLA BEVERARI COUTO

SÃO VICENTE – SP

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

EFEITOS SUBLETAIS DO DCOIT ASSOCIADO A
NANOMATERIAIS ANTI-INCRUSTANTES
INOVADORES SOBRE O MEXILHÃO *PERNA PERNA*

ISABELLA BEVERARI COUTO

DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE – SP

2025

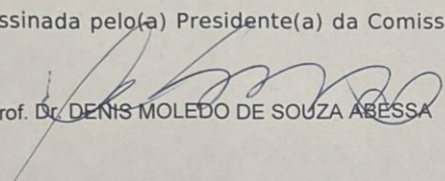
B571e Beverari, Isabella
Efeitos subletais do DCOIT associado a nanomateriais anti-incrustantes inovadores sobre o mexilhão Perna perna. / Isabella Beverari. -- São Vicente, 2025
55 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Denis Abessa

1. toxicidade. 2. biomarcadores. 3. DCOIT. 4. nanopartículas. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELLA BEVERARI COUTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 30 dias do mês de maio do ano de 2025, às 14h, no(a) Sala 03 do IB/CLP, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ISABELLA BEVERARI COUTO, intitulada **Efeitos subletais do DCOIT associado a nanomateriais anti-incrustantes inovadores sobre o mexilhão Perna perna**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / IB/CLP - UNESP, Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / IB/CLP - UNESP, Dr. LUCAS BURUAEM MOREIRA (Participação Presencial) do(a) UNIFESP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, principalmente meus pais: Gabriela e Nilton pelo apoio durante toda essa trajetória, assim como todo o suporte necessário, sem vocês isso não seria possível. Meu avô Jurandir por estar sempre presente e me lembrar da felicidade dos momentos simples. E uma homenagem a minha avó Marile, você sempre será meu exemplo, minha maior saudade e o meu maior amor no mundo, te amo infinitamente. A Bibia, que você saiba que pode conquistar tudo que deseja.

Segundamente gostaria de agradecer as minhas melhores amigas: Deep e Drica, por serem o melhor trio que eu poderia desejar no mundo, não importa a distância, espero retribuir pelo menos um pouquinho do vocês fazem por mim. Ao “Grupinho Bom” (Deep, Drica, Dinha, Conso e Dezza) eu prometo nunca esquecer de todos os nossos momentos, espero passar a vida comemorando as conquistas de cada uma de vocês. Aos meus melhores amigos Catu e o Mongo por todo o carinho e cuidado, não existe uma vida em que eu seja feliz sem a companhia de vocês. A “Ana” Flávia pela companhia da vida, do lab, dos sorrisos e das lágrimas, dividir a vida com você torna tudo mais fácil. Ao Seu Jorge, ao Shibinha e o Xulalla, pela amizade, pela compreensão, pela ajuda e por estarem presentes sempre que eu precisei. Ao Vinícius obrigada por estar presente independentes das dificuldades da vida.

Ao meu orientador Denis, que desde o primeiro dia no laboratório me deu liberdade para ser a pesquisadora que eu gostaria, sou muito grata pela oportunidade de trabalhar com você, obrigada por todo o aprendizado. A Guacira, que continua sendo um pilar em todos os meus trabalhos, além de se tornar uma grande amiga. Espero ser que nem você quando crescer. Ao NEPEA, pelas pessoas que dividem as dificuldades diárias, principalmente, Bussola e Rabicó (desculpa te atormentar todos os dias), pelas risadas, pelas louças lavadas e por todo o conhecimento que vocês me transmitem diariamente. Um destaque para Xêpa que vai ser sempre a duplinha de lab mais incrível, saudades. Aos agregadas: Paloma e Aline.

A minha turma, XVI, pelos cinco anos que passamos juntos, por todos os momentos de alegria e tristeza, eu não poderia fazer parte de uma turma melhor, lembrarei de cada um. E ao VIVA por me acompanharem e me permitirem viver momentos inesquecíveis.

Por fim, a CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

RESUMO

A bioincrustação, consiste no processo de colonização de superfícies por micro e macroorganismos, e possui relevância econômica e ambiental. Tintas anti-incrustantes contendo biocidas são eficazes para combater a bioincrustação, mas podem causar efeitos nocivos a organismos não-alvo. O DCOIT possui uma ampla ação biocida e apresenta rápida degradação no ambiente, no entanto, é tóxico para espécies não-alvo. O uso de nanocápsula mesoporosas de sílica (SiNC) ou sua forma impregnada de prata, contendo o biocida DCOIT, visa diminuir os riscos ambientais e manter a efetividade da ação anti-incrustante. Esse trabalho investigou os efeitos subletais do DCOIT, em suas formas livre e nanoestruturada, sobre o molusco *Perna perna*, por meio de biomarcadores bioquímicos (Dano em DNA, LPO, GST, GSH, GPx e AChE) e celular (Tempo de Retenção do Vermelho Neutro). Organismos adultos foram expostos em condições controladas por 72 h aos diferentes compostos livres (SiNC e DCOIT) e suas respectivas formas nanoencapsuladas (SiNC-DCOIT e SiNC- DCOIT-Ag), e posteriormente analisados. Os resultados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade, e submetidos à ANOVA de uma via seguida da comparação múltipla pelo teste de Dunnett. Para integrar os dados, utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e o cálculo do "Integrated Biomarker Response" – versão 2 individual (IBRv2). O DCOIT foi o único composto a apresentar efeito agudo (letalidade) durante a exposição dos organismos. Em Brânquias, todos os compostos apresentaram ao menos um biomarcador indicando estresse oxidativo ou efeito. Em Glândula Digestiva, apenas DCOIT na concentração 100 apresentou dano em DNA e inibição da atividade da GPx. O Vermelho Neutro apresentou resultados em todos os compostos, exceto DCOIT. De modo geral, foram observados efeitos subletais nos organismos expostos aos diferentes compostos, porém sem haver redução dos efeitos nos organismos expostos às formas nanoestruturadas do DCOIT. Há necessidade de mais estudos para compreender os efeitos a longo prazo na disponibilidade destes nanomateriais no ambiente marinho.

Palavras-chave: toxicidade, DCOIT, biomarcadores, nanopartículas

ABSTRACT

Biofouling is the process of colonization of surfaces by micro and macroorganisms, and is of economic and environmental relevance. Anti-fouling paints containing biocides are effective in combating biofouling, but can have harmful effects on non-target organisms. DCOIT has a broad biocidal action and shows rapid degradation in the environment; however, it is toxic to non-target species. The use of mesoporous silica nanocapsules (SiNC) or their silver-impregnated form, containing the biocide DCOIT, aims to reduce environmental risks and maintain the effectiveness of the anti-fouling action. This study investigated the sublethal effects of DCOIT, in its free and nanostructured forms, on the mollusc *Perna perna*, using biochemical (DNA damage, LPO, GST, GSH, GPx and AChE) and cellular (Neutral Red Retention Time) biomarkers. Adult organisms were exposed under controlled conditions for 72 h to the different free compounds (SiNC and DCOIT) and their respective nanoencapsulated forms (SiNC-DCOIT and SiNC- DCOIT-Ag), and then analyzed. The results were checked for normality and homoscedasticity and submitted to one-way ANOVA followed by multiple comparison using Dunnett's test. Principal Component Analysis (PCA) and the calculation of the "Integrated Biomarker Response" - individual version 2 (IBRv2) were used to integrate the data. DCOIT was the only compound to show an acute effect (lethality) when the organisms were exposed. In the Gills, all the compounds showed at least one biomarker indicating oxidative stress or effect. In the Digestive Gland, only DCOIT at concentration 100 showed DNA damage and inhibition of GPx activity. Neutral Red showed results for all compounds except DCOIT. In general, sublethal effects were observed in organisms exposed to the different compounds, but there was no reduction in effects in organisms exposed to nanostructured forms of DCOIT. Further studies are needed to understand the long-term effects of the availability of these nanomaterials in the marine environment.

Keywords: toxicity, DCOIT, biomarkers, nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de varredura.	15
Figura 2. Exemplar de mexilhão <i>Perna perna</i> .	17
Figura 3. Exposição dos organismos.	20
Figura 4. Efeitos bioquímicos em <i>P. perna</i> exposto a nanomateriais (Dano DNA).	26
Figura 5. Efeitos bioquímicos em <i>P.perna</i> exposto a nanomateriais (LPO).	27
Figura 6. Efeitos bioquímicos em <i>P.perna</i> exposto a nanomateriais (GST).	28
Figura 7. Efeitos bioquímicos em <i>P.perna</i> exposto a nanomateriais (GSH).	30
Figura 8. Efeitos bioquímicos em <i>P.perna</i> exposto a nanomateriais (GPx).	31
Figura 9. Efeitos bioquímicos em <i>P.perna</i> exposto a nanomateriais (AChE).	32
Figura 10. Ensaio do Tempo de Retenção de Vermelho Neutro.	33
Figura 11. Ordenação gráfica da PCA (Brânquias).	36
Figura 12. Ordenação gráfica PCA (Glândula Digestiva).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos compostos, concentrações e biomarcadores.	34
Tabela 2. Resultados da Análise de Componentes Principais (Brânquias).	36
Tabela 3. Resultados da Análise de Componentes Principais (Glândula Digestiva).	38
Tabela 4. Resultados do Índice de Resposta Integrada (IBRv2i).	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
AgNP	Nanopartícula de prata.
ANOVA	Análise de Variância de Uma Via
Br	Brânquia
BSA	Albumina Soro Bovina
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrofenilglutathione
DCOIT	4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolina-3-um
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético.
GD	Glândula Digestiva
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione-S-Transferase
IBRv2	Resposta Integrada de Biomarcadores – versão 2 individual
IMO	Organização Marítima Internacional
KCl	Cloreto de Potássio
LPO	Lipoperoxidação Lipídica
NADPH	Nucleotídeo de Nicotinamida Adenina
NM	Nanomateriais Manufaturados
NP	Nanopartícula
PCA	Análise de Componentes Principais
PCs	Componentes Principais
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
SiNC	Sílicas mesoporosas.
SiNC-DCOIT	Nanocápsula mesoporosa de sílica associada ao DCOIT.
SiNC-DCOIT-Ag	Nanocápsula mesoporosa de sílica associado ao DCOIT e impregnada a prata
TBA	Ácido-2-tiobarbitúrico
TBARS	Método do Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TMP	Tetramethoxypropane
VN	Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO	17
3.	METODOLOGIA	18
3.1	ORGANISMO-TESTE: <i>PERNA PERNA</i>	17
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL	18
3.3	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	18
3.4	ENSAIO DE EXPOSIÇÃO	18
3.5	BIOMARCADORES	20
3.5.1	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	21
3.5.2	BIOMARCADOR CELULAR	23
3.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	24
4.	RESULTADOS	25
4.1	INTEGRAÇÃO DA RESPOSTA DE BIOMARCADORES POR PCA	34
4.2	ÍNDICE IBRV2I	39
5.	DISCUSSÃO	39
6.	CONCLUSÃO	46
7.	REFERÊNCIAS	47

1. Introdução

A bioincrustação consiste em um processo de rápida colonização de superfícies submersas por micro e macroorganismos, que inicia com a adsorção de moléculas orgânicas, permitindo o assentamento de microrganismos pioneiros na formação do biofilme (Dobrestoy *et al.*, 2006). Esses organismos secretam um muco gelatinoso provendo interações, nutrientes, proteção e estímulo ao estabelecimento de novos organismos (Chambers *et al.*, 2006; Martins & Vargas, 2013). Embora seja um processo natural que ocorre em todo tipo de substrato consolidado, em embarcações e estruturas costeiras a bioincrustação acarreta problemas econômicos, estimando-se um gasto anual de 450 milhões de dólares em prevenção, evitando prejuízos na ordem dos bilhões (Da Gama *et al.*, 2009), devido ao incremento de gastos com manutenção geral, e do aumento do atrito gerado pelos cascos de embarcações com um consequente aumento do consumo de combustível (Jacobson & Willingham, 2000).

Ademais, a bioincrustação apresenta implicações ambientais preocupantes como o aumento da emissão de gases de efeito estufa (consequência do maior consumo de combustível pelos navios e demais embarcações) e a bioinvasão, na qual o transporte de espécies incrustadas não nativas para outras regiões, resulta em prejuízos para a biodiversidade local ou regional, através de diferentes formas de interação ecológica, como competição, predação ou introdução de patógenos (Kolzsch & Blassius, 2011; Demires *et al.*, 2017).

Visando prevenir e controlar os efeitos da bioincrustação, os revestimentos marítimos contendo biocidas, também conhecidos como anti-incrustantes, passaram a ser desenvolvidos. Tintas à base de compostos organoestânicos, como o tributilestanho (TBT), foram amplamente utilizadas a partir dos anos 1970, devido a sua elevada eficiência contra uma diversidade de organismos incrustantes (Bellas, 2007; Parks *et al.*, 2010). No entanto, estudos apontaram efeitos deletérios associados à sua persistência ambiental e extrema

toxicidade para organismos não-alvo, como a atrofia durante crescimento, ausência de reprodução, anomalias na calcificação da concha e alterações na embriogênese e no desenvolvimento larval de ostras em concentrações extremamente baixas (Alzieu, 1991; His & Robert, 1993), além de induzir alterações sexuais irreversíveis ("imposex") em fêmeas de gastrópodes (Horiguchi *et al.*, 2006).

Estas preocupações levaram à proibição de tintas à base de organoestânicos, pela Organização Marítima Internacional (IMO), em 2008, devido aos riscos ecológicos associados à sua alta toxicidade (Fillmann *et al.*, 2018), elevada capacidade de bioacumulação (Jacobson & Willingham, 2000) e potencial para causar desregulação endócrina (Chen & Lam, 2017). Consequentemente houve, a necessidade de uma nova geração de substâncias capazes de evitar a bioincrustação com menor impacto ambiental (Bellas, 2007). Essa nova geração de substâncias inclui tanto compostos à base de metais, principalmente o cobre, quanto aditivos orgânicos (Dafforn *et al.*, 2011), dos quais se destacam os seguintes: Diuron, Irgarol 1051, Clorotalonil, Diclofluanida, Tiram, Trifenilbormano Piridina, e 4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolina-3-um (ou DCOIT, também conhecido como Sea-Nine 211) (Silva *et al.*, 2019). Contudo, estudos sobre o comportamento e a toxicidade destes biocidas de nova geração têm evidenciado riscos ambientais, como o Irgarol 1051 e o Tiram, que tiveram seu uso banido e restrito, respectivamente, na Europa, devido a sua potencial toxicidade (Abreu *et al.*, 2020; European Chemicals Agency (ECHA), 2020).

O DCOIT, um biocida criado em 1996 por Rohm & Haas, foi desenvolvido especialmente para as tintas anti-incrustantes, pois possui uma ação eficaz contra diversos organismos incrustantes (Cima *et al.*, 2013). Este composto foi considerado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos um anti-incrustante ecologicamente adequado devido a sua rápida degradação química e biológica (USEPA, 1996) em água e sedimento (Bellas, 2007). No entanto, sua meia vida pode apresentar uma ampla variabilidade de

acordo com as condições e a matriz ambiental analisada, variando de 2,6 dias em água do mar natural, a 30°C e sem incidência de luz solar (Harino *et al.*, 2005) até períodos superiores a 7 dias em água marinha reconstituída, não estéril a 25°C (Figueiredo *et al.*, 2019).

Alguns estudos indicam que o DCOIT apresenta uma alta toxicidade para organismos marinhos (Chen & Lam, 2017), como estresse oxidativo em coral (Cima *et al.*, 2013), desregulação endócrina e reprodutiva em peixes (Chen & Lam., 2017), dano oxidativo, ativação do sistema de defesa antioxidante e comprometimento da neurotransmissão de ostras (Campos *et al.*, 2022a). No entanto, poucos estudos voltados às espécies não-alvo e, principalmente, de ambientes tropicais, foram desenvolvidos (Campos *et al.*, 2022b), demonstrando que os riscos associados a este contaminante ainda são pouco conhecidos.

Como uma alternativa para mitigar a lixiviação indesejada dos revestimentos marítimos e reduzir seus impactos ambientais, o encapsulamento de compostos anti-incrustantes em nanopartículas (NP), partículas com dimensões inferiores a 100 nanômetros (Maia *et al.*, 2015), vêm se mostrando uma tecnologia promissora. Essa nanotecnologia oferece vantagens como aumento da estabilidade e durabilidade dos revestimentos, redução do impacto ambiental e menor risco para o ecossistema (Figueiredo *et al.*, 2019; Hoch *et al.*, 2019). As NP contendo sílica, especialmente sílicas mesoporosas (SiNCs), têm ganhado destaque como agentes conservantes ideais para o encapsulamento de biocidas como o DCOIT, principalmente por sua estrutura oca, elevada área de superfície, tamanho de poro ajustável, biocompatibilidade e síntese de baixo custo (Ferreira *et al.*, 2023). Sua morfologia esférica e regular favorece o encapsulamento bem-sucedido e a liberação controlada dos biocidas anti-incrustantes (Maia *et al.*, 2015; Ruggiero *et al.*, 2019; Michailidis *et al.*, 2020).

A prata, quando incorporada a nanopartículas (geralmente nanopartículas de prata, AgNP) é utilizada por sua potente ação microbiana (Rai *et al.*, 2009), resultante de suas

propriedades físico-químicas vantajosas como tamanho reduzido, formato variado e elevada área de superfície, conferindo-lhe uma capacidade bactericida.

Estudos tem demonstrado a toxicidade de diferentes tipos de AgNP em diversos organismos. Rai *et al.* (2009) reportaram sua eficácia antimicrobiana em diferentes tipos de bactérias, enquanto Mazieiro *et al.* (2019) observaram citotoxicidade em microcrustáceos (*Daphnia similis*) e embriotoxicidade em peixes (*Danio rerio*) em comparação com células de mamíferos, com as menores NP tendendo a ser mais tóxicas. Asharani *et al.* (2008) sugeriram que AgNP podem induzir uma toxicidade dose-dependente em embriões de peixes (*Danio rerio*). Apesar dessas evidências, os riscos associados à introdução das AgNP no ambiente marinho ainda são relativamente pouco conhecidos.

Em busca de novas respostas acerca dos anti-incrustantes associados as nanopartículas, pesquisadores da Universidade de Aveiro (UA), em parceria com a empresa Smallmatek Ltda, propuseram o encapsulamento do biocida DCOIT em nanomateriais manufaturados (NM), nomeadamente em nanocápsula mesoporosas de sílica (SiNCs) com diâmetro médio de 100 nm e estas mesmas nanocápsulas impregnadas com prata (SiNC-Ag), para serem utilizados como princípio ativo em tintas anti-vegetativas (Figura 1). No entanto, para seu uso comercial é necessário compreender os riscos ambientais associados a estes novos compostos.

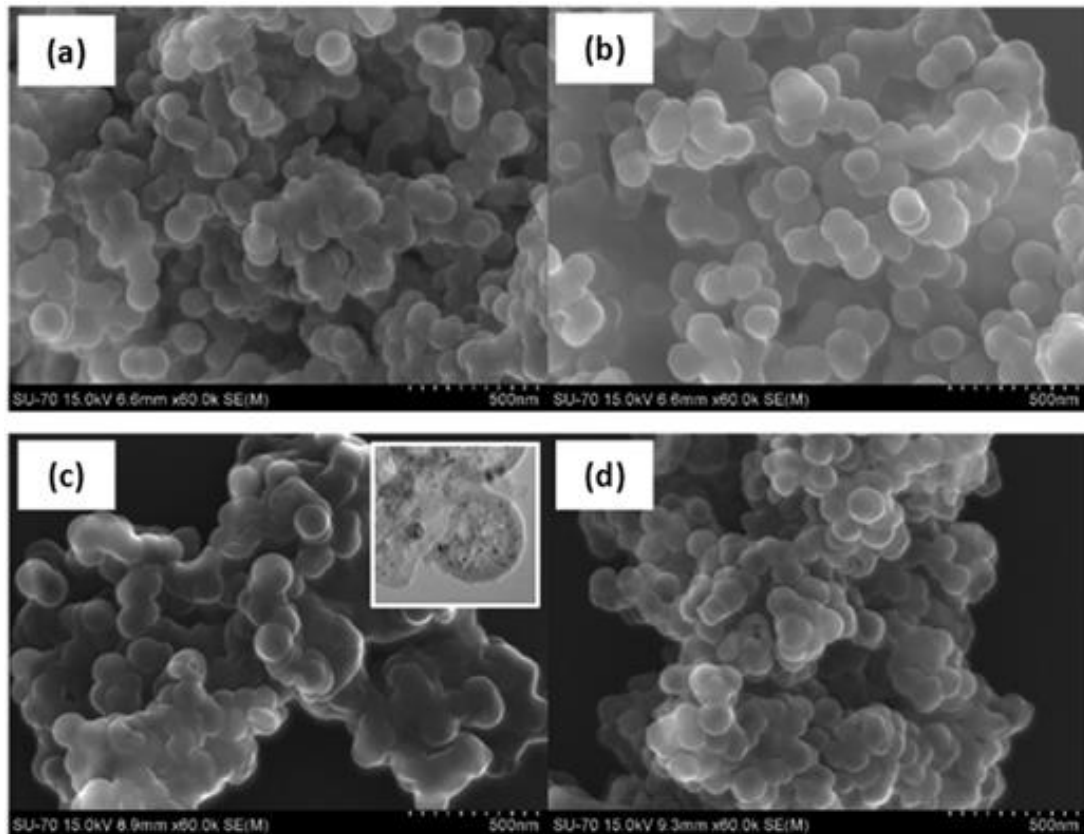


Figura 1. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de a) SiNCs vazios; b) SiNCs com DCOIT encapsulado; c) SiNCs revestidos com prata; d) SiNCs com DCOIT encapsulado e revestido com prata. Fonte: Figueiredo *et al.*, 2019.

Nesse contexto, uma tendência nos estudos de toxicidade é a análise de biomarcadores, que são definidos como respostas bioquímicas, fisiológicas ou histológicas mensuráveis que indicam a presença ou os efeitos de contaminantes no ambiente (Monserrat *et al.*, 2007) e fornecem respostas sensíveis e rápidas sobre efeitos subcrônicos, antes que efeitos mais severos e irreversíveis ocorram. Biomarcadores têm sido utilizados para avaliar os efeitos adversos em diferentes níveis de organização – de molecular a histológico (Abessa, 2016). Uma de suas características mais importantes é o potencial de antecipar as mudanças em níveis superiores de organização biológica (Cajaraville *et al.*, 2000) e sua maior vantagem é a rápida resposta. Portanto, análises de biomarcadores permitem a detecção rápida de efeitos biológicos adversos de substâncias bioativas (Dinan *et al.*, 2001), como por exemplo os biocidas.

Espécies bioindicadoras têm sido tradicionalmente aplicadas em estudos de avaliação

de risco ambiental (Friberg *et al.*, 2011). Dentre tais espécies, os moluscos bivalves são comumente utilizados, uma vez que estão em contato direto com os compartimentos contaminados, sejam as substâncias dissolvidas na água (Dohery, 1990) ou ligadas a partículas em suspensão (Fournier *et al.*, 2005), sendo particularmente sensíveis a estressores ambientais e com elevada capacidade de bioacumular contaminantes (Gagné *et al.*, 2006; Bonnail *et al.*, 2018), além de sua fisiologia ser razoavelmente bem conhecida. Nesse sentido, o mexilhão *Perna perna* tem sido amplamente utilizado como um bioindicador para estimar o grau de contaminação e efeitos de poluentes na biota (Dos Santos *et al.*, 2021), especialmente em estudos analisando biomarcadores (Almeida *et al.*, 2004).

O baixo número de estudos envolvendo a toxicidade do DCOIT, especialmente quando associado a nanopartículas, projeta a importância de entender sua toxicidade sobre organismos marinhos não-alvo, considerando diferentes níveis de organização biológica.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de bivalves marinhos da espécie *Perna perna* a nanomateriais manufaturados (NM) inovadores com ação biocida, considerando as formas livres (DCOIT e SiNC) e nanoestruturadas (SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag), através da análise de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica (níveis bioquímico e celular).

Com base nessas informações as seguintes hipóteses foram levantadas:

- O encapsulamento reduz a toxicidade dos anti-incrustantes para organismos não-alvo, em comparação com os compostos livres, em diferentes níveis de organização biológica.
- A toxicidade dos NMs (SiNC-DCOIT) é modificada com a cobertura do agente microbiano (SiNC-DCOIT-Ag).

Desse modo, o presente estudo possui caráter inédito e inovador, tendo rápida

aplicação prática ao avaliar o efeito da exposição do DCOIT em sua forma livre e nanoencapsulado, tanto em nanopartículas mesoporosas de sílica quanto associadas a prata, sobre o metabolismo de mexilhões.

3. Metodologia

3.1 Organismo-teste: *Perna perna*

O mexilhão *P. perna* (Linnaeus, 1758) (Figura 2) é um bivalve marinho intertidal amplamente distribuído por regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes (Dos Santos *et al.*, 2021). Suas características, como o modo de vida sésil na fase adulta, a ampla distribuição e abundância, tolerância a diferentes condições ambientais (variações de salinidade e temperatura) e a facilidade de manuseio em todos os estágios do ciclo de vida, tornam-no um organismo desejável para aplicações em biomonitoramento (Rittschof & McClellan-Green, 2005; Cortez *et al.*, 2019; Silva dos Santos *et al.*, 2018). Além disso, por serem filtradores, podem acumular diversas classes de poluentes, incluindo biocidas (Birnstiel *et al.*, 2019; Ortega *et al.*, 2019), apresentando respostas em diferentes níveis biológicos dependendo da concentração e características químicas do contaminante (Silva dos Santos *et al.*, 2018).



Figura 2. Exemplar de mexilhão *Perna perna*. Fonte: Museu Nacional do Rio de Janeiro

Exemplares adultos dos mexilhões utilizados nesse trabalho foram adquiridos junto a um cultivo localizado na Praia da Cocanha – município de Caraguatatuba (SP), local que apresenta boas condições de balneabilidade e qualidade ambiental (CETESB, 2017). Em

laboratório, os animais foram mantidos em aquários com água do mar filtrada, sob aeração e temperatura constante de 24°C, para o período de aclimação de 07 dias, sendo alimentados a cada 48 h com uma solução de mistura de algas *Seachem Reef Phytoplankton Marinho*. Após esse período, foi realizada a exposição dos organismos aos compostos de interesse.

3.2 Desenho experimental:

O desenho experimental consistiu na exposição do bivalve *P. perna* a diferentes compostos livres (SiNC e DCOIT) e suas respectivas formas encapsuladas (SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag), e em diferentes concentrações, visando avaliar os efeitos letais e agudos, em nível individual. Em seguida, foram dissecados os tecidos das brânquias e glândulas digestivas para a análise de biomarcadores, visando avaliar as respostas em nível bioquímico.

3.3 Preparação de amostras:

As soluções estoques dos compostos foram preparadas em água do mar filtrada (filtro CUNO de 100 µm) nas concentrações 10, 100 e 1.000 µg L⁻¹, além do controle negativo (água do mar filtrada). O composto livre de sílica mesoporosas (SiNC) e os nanomateriais contendo o biocida DCOIT (SiNC-DCOIT) e SiNC-DCOIT impregnado com prata (SiNC-DCOIT-Ag) foram produzidos pela Smallmatek Lda. O DCOIT livre foi adquirido na Sigma-Aldrich Brasil Ltda (4,5-DICHLORO-2-OCTYL-ISOTHIAZOLON, CDS003259-1G). As concentrações de exposição dos nanomateriais foram calculadas com base no conteúdo de DCOIT, correspondendo a 18,3% para SiNC-DCOIT e 14,3% para SiNC-DCOIT-Ag.

3.4 Ensaio de exposição

Realizamos dois experimentos semi-estáticos com exposição de 72 h, com fotoperíodo de 12:12 h (claro: escuro), sob aeração, temperatura (24°C ± 2°C) e salinidade

constantes. No primeiro dia os organismos receberam alimentação composta por solução de algas *Seachem Reef Phytoplankton Marinho*. O primeiro experimento, conduzido em dezembro de 2022, avaliou os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag. A avaliação do DCOIT livre não pôde ser realizada em conjunto devido a um atraso na aquisição e exportação desse composto. O segundo experimento, em fevereiro de 2024, testou a forma livre do DCOIT. No presente estudo, em cada concentração utilizamos 2 réplicas (em baldes de 15 L); contendo 10 mexilhões por réplica ($n = 20$ organismos por tratamento) em 10 litros de água do mar filtrada (controle) ou solução-teste (1 organismo por litro) (Figura 2A).

Ao final da exposição, os organismos que permaneceram vivos foram sacrificados e seus tecidos (brânquias e glândulas digestivas) foram coletados (Figura 2B) e transferidos para microtubos e armazenados congelados em ultra freezer a -80°C , para posterior análise de biomarcadores bioquímicos. Além disso, amostras de hemolinfa foram imediatamente retiradas e analisadas para estabilidade das membranas lisossômicas e instabilidade/quebra dos cromossomos associados ao núcleo, através do Ensaio do Tempo de Retenção de Vermelho Neutro.

Os parâmetros físico-químicos (Anexo I) das soluções-teste foram monitorados no início e no final dos experimentos. Um lote de organismos foi analisado no início dos experimentos (T0), para controle das condições fisiológicas e análise de possíveis alterações causadas pela manipulação dos organismos em laboratório.



Figura 3A. Exposição dos organismos em baldes de 15 L com aeração constante. 3B. Retirada do tecido dos organismos após exposição de 72 horas.

3.5 Biomarcadores

As amostras de tecidos foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas na proporção 1:3 (w/v) em solução tampão (Trisma-base 50 mM; Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM; 1,4-ditiotreitol (DTT) 1 mM; Sacarose 500 mM; Cloreto de Potássio (KCl) 150 mM; Fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 30mM, pH 7,6). A homogeneização ocorreu no equipamento BeadBlaster 24 (Benchmark #D2400) em 4 ciclos de 30 segundos à 4.000 rpm com intervalos de 30 segundos. O homogeneizado foi dividido em duas alíquotas: uma não centrifugada, utilizadas para a análise de Dano DNA e LPO, e outra centrifugada (12.000 g por 20 minutos a 4°C) para os demais biomarcadores. Posteriormente, o sobrenadante da alíquota foi transferido para um novo microtubo e mantido à -80°C.

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o protocolo de Bradford (1976). A curva de calibração foi preparada a partir da solução estoque de 2 mg/mL de Albumina Soro Bovina (BSA) diluída em água Mili-Q® em microplaca de 96

poços. A leitura de absorbância ocorreu por espectrofotometria a 595 nm e os resultados foram expressos em $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas no leitor de microplacas Biotek-Synergy™ HT.

3.5.1 Biomarcadores bioquímicos

Dano DNA

Os danos em DNA (*stand breaks*) foram analisados pelo ensaio de precipitação alcalina, proposto por Olive (1988), utilizando fluorescência para quantificar vestígios de DNA. De acordo com esse método, quando as células são lisadas em detergente Dodecil Sulfato de Sódio 2% seguido da adição de um volume equivalente de Cloreto de Potássio 0.12mM, forma-se um precipitado que pode ser coletado em centrifugação de baixa velocidade. O precipitado contém proteínas celulares e ácido nucléicos associados às proteínas. Na ausência de danos no DNA, a maior parte do DNA precipita no fundo, mas quando há o rompimentos devido à exposição das células a contaminantes químicos, uma quantidade de DNA é liberada e permanece no sobrenadante após a centrifugação. Assim, a proporção de DNA no sobrenadante é uma medida da quantidade de danos celulares.

Para a curva de calibração, foi utilizado DNA de esperma de salmão. As amostras foram mantidas em banho-maria por 10 minutos à 60°C, incubadas por 30 minutos à 4°C e centrifugadas a 8.000g por 5 minutos à 4°C. A leitura foi feita após agitação por 5 minutos, com excitação de 360 nm e emissão de 460 nm. Os resultados foram expressos em μg de DNA sobrenadante. mg^{-1} de proteína.

Peroxidação Lipídica

A Peroxidação Lipídica (LPO) foi realizada através de Fluorescência pelo método de TBARS – método do ácido tiobarbitúrico (Oakes & Van Der Kraak, 2003), no qual os produtos da peroxidação lipídica (i.e., oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados), reagem com o ácido-2-tiobarbitúrico (TBA). Nas amostras, foram adicionadas as soluções de ácido

tricloroacético (TCA) e TBA, agitadas e incubadas por 10 minutos a 70°C, até a formação de um pellet. A curva de calibração foi realizada a partir das soluções de Tetramethoxypropane (TMP), TCA e TBA. A leitura ocorreu por fluorescência a 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão). Os resultados foram expressos em nanomoles de hidroperóxidos. mg^{-1} de proteínas.

Glutathione S-Transferase

A atividade da Glutathione S-Transferase (GST) foi quantificada seguindo o método descrito por Keen *et al.* (1976), adaptado por Medeiros (2000). Essa família de enzimas catalisa a conjugação de diferentes compostos com a glutathione, desempenhando um papel adicional no processo de detoxificação. A atividade foi analisada pela reação de catálise de 2nM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato artificial e 1nM de Glutathione Reduzida (GSH) em meio contendo tampão Fosfato de Potássio 0,1M, pH 6,5. O produto formado pela reação, S-2,4-dinitrofenilglutathione, foi quantificado pelo aumento de absorvância a 340 nm por 5 minutos em intervalos de 50 segundos. Os resultados foram expressos em μmol de tioéter. min^{-1} . mg^{-1} de proteína.

Glutathione Reduzida

A dosagem de Glutathione Reduzida (GSH) foi medida por absorvância, por meio da quantificação dos grupos sulfidrilas presentes na amostra, diferenciando o resultado em quantidade de grupo sulfidrilas proteico e não proteico, de acordo com o método descrito por Sedlak & Lindsay (1968). O meio de reação foi composto por tampão Tris-base 0,4M e solução de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). A curva padrão foi GSH diluída em tampão Tris-base. A leitura de absorvância foi realizada em 415nm e os resultados foram expressos em nmol glutathione. mg^{-1} proteína.

Glutathione Peroxidase

A Glutathione Peroxidase (GPX) tem como principal função a eliminação de hidroperóxidos e outras espécies reativas de oxigênio, possuindo atividade antioxidante, com

função protetora para as células (Behne & Kyriakopoulos, 2001; Júnior *et al.*, 2001). A atividade de GPX foi medida na presença de Fosfato de Nucleotídeo de Nicotinamida Adenina (NADPH) como substrato a 340 nm por 3 minutos com intervalos de 1 minuto. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles de NADPH oxidado. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE), um biomarcador de neurotoxicidade, atua na degradação do acetilcolina, um importante neurotransmissor. Sua atividade foi quantificada pelo método de Ellman *et al.*, (1961), o qual consiste em detectar o 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre tiocolina (que é um produto da hidrólise da acetilcolina pela AChE) e DTNB. A leitura foi feita a 405 nm por 5 minutos com intervalos de 50 segundos. Os resultados foram expressos em $\text{nmoles de acetilcolina hidrolisada. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.5.2 Biomarcador Celular

Ensaio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

A estabilidade da membrana lisossômica foi analisada pelo procedimento do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro em lisossomos de hemócitos, como por Lowe *et al.* (1995). Com o auxílio de uma seringa hipodérmica contendo 0,5 ml de solução fisiológica, foram coletados 0,5 ml de hemolinfa do músculo adutor posterior. Cerca de 40 μl desta solução de células (hemolinfa + solução fisiológica) foram expostos ao corante Vermelho Neutro e, sistematicamente, as lâminas foram examinadas em microscópio a cada 15 minutos. O tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos foi obtido pela estimativa da proporção de células exibindo "vazamento" dos lisossomos para o citosol e/ou exibindo anormalidades no tamanho e cor dos lisossomos. O parâmetro foi determinado quando 50% ou mais das células exibiram anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol (Lowe *et al.*, 1995). O tempo de retenção médio para cada concentração foi

calculado pela média do tempo em minutos dos animais analisados em cada concentração/tratamento.

3.6 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram, inicialmente, verificados para normalidade da sua distribuição, pelo teste de Shapiro-Wilk, e homocedasticidade, por meio do teste de Levene. Os dados de toxicidade e de biomarcadores, posteriormente, foram submetidos à ANOVA de uma via seguido pelo teste a post-hoc de Dunnett, ou por teste paramétrico equivalente, para avaliar se há diferença significativa entre as concentrações dos compostos e o controle. As diferenças significativas são consideradas quando $p < 0.05$. As análises foram realizadas no software PAST (versão 4.3).

Para a integração dos dados foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), considerando os tecidos separadamente e utilizando matrizes contendo os dados dos biomarcadores em relação aos compostos e suas concentrações. As análises foram realizadas usando o software PC-ORD 6.0 (McCune e Mefford, 2011) e valores maiores que $\geq 0,45$ foram considerados como associações relevantes.

Uma visão geral das respostas dos biomarcadores foi obtida por meio do cálculo do “Integrated Biomarker Response” – versão 2 individual (IBRv2) para cada tratamento, seguindo a metodologia proposta por Sanches *et al.* (2013) e adaptada por Mattos *et al.* (2023). Essa abordagem do IBR compara a média das respostas dos biomarcadores de mexilhão exposto a estressores com a média da condição controle, mantendo os dados dos biomarcadores a nível de indivíduos, permitindo o uso de análises estatísticas convencionais e preservando a variabilidade dos dados. Neste estudo, os compostos foram analisados com seu respectivo grupo controle. O índice foi calculado como: I) transformação logarítmica ($\log_2$) dos dados; II) score Z (autovetores); III) subtração da média do score Z do controle do score Z de todos os grupos; IV) módulo do score Z para obtenção de valores absolutos;

V) soma dos score Z absolutos dos biomarcadores de cada grupo experimental com o peso atribuído a cada biomarcador de acordo com a sua importância sistêmica: GST, GSH, GPX e AChE = 1; Dano DNA, LPO e VN = 2. Os valores resultantes indicam que quanto menor o índice IBR melhor o estado de saúde do organismo e que um score maior pode indicar uma piora na condição fisiológica.

4. Resultados

Para o primeiro experimento foram expostos organismos ao composto livre SiNC e aos compostos nanoencapsulados SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag. Neste ensaio, não houve efeito agudo (i.e. mortalidade) e foram retirados tecidos e hemolinfa de oito organismos de cada tratamento. Além disso, três organismos foram separados para análise posterior de bioacumulação nos tecidos, porém essas análises não foram realizadas até o presente momento e as amostras estão armazenadas.

Para o segundo experimento, no qual os organismos foram expostos ao DCOIT, foi registrado efeito agudo na concentração de $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, na qual apenas três organismos sobreviveram até o fim do experimento (72 h). Para as concentrações de 10 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foram retirados tecidos e hemolinfa de oito organismos e separados mais três organismos para análise posterior de bioacumulação nos tecidos.

Biomarcadores bioquímicos

Dano DNA

Os resultados encontrados para Dano DNA em brânquias (Br) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) para a concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag (Figura 4A). Nas glândulas digestivas (GD) houve diferença significativa na concentração de $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ SiNC-DCOIT, que demonstrou resposta abaixo do controle, e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ DCOIT (Figura 4B).

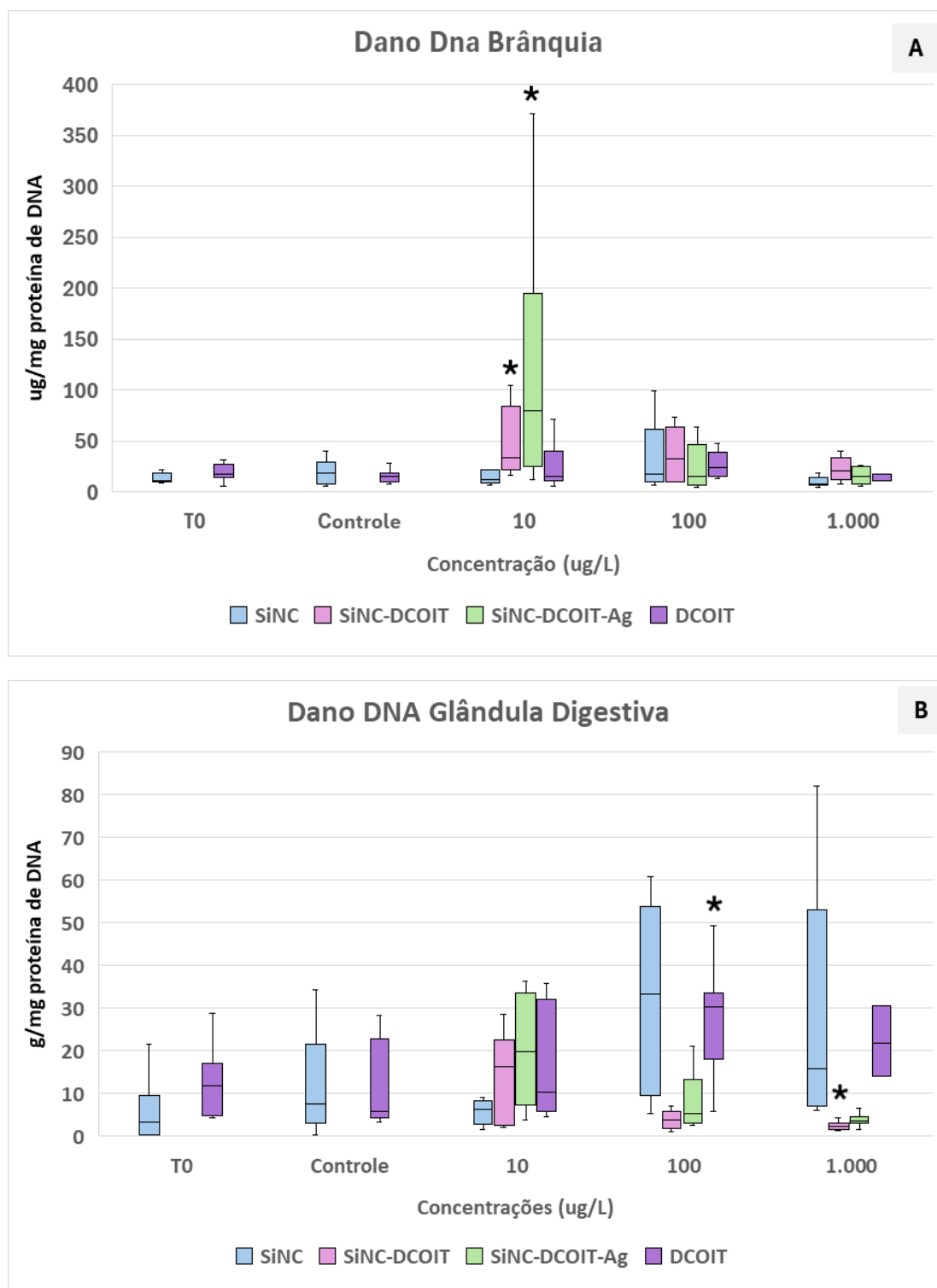


Figura 4. Efeitos bioquímicos em mexilhão *Perna perna* exposto a nanomateriais. A) Danos ao DNA em brânquias. B) Danos ao DNA em glândula digestiva. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

Peroxidação Lipídica - LPO

Os resultados dos produtos de peroxidação lipídica em Br não apresentaram diferença significativa em relação ao controle para nenhum dos compostos analisados

(Figura 5A). Já em GD foi observada diferença significativa na concentração $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ SiNC-DCOIT-Ag e nos dois T0, cujos valores estavam abaixo do controle (Figura 5B).

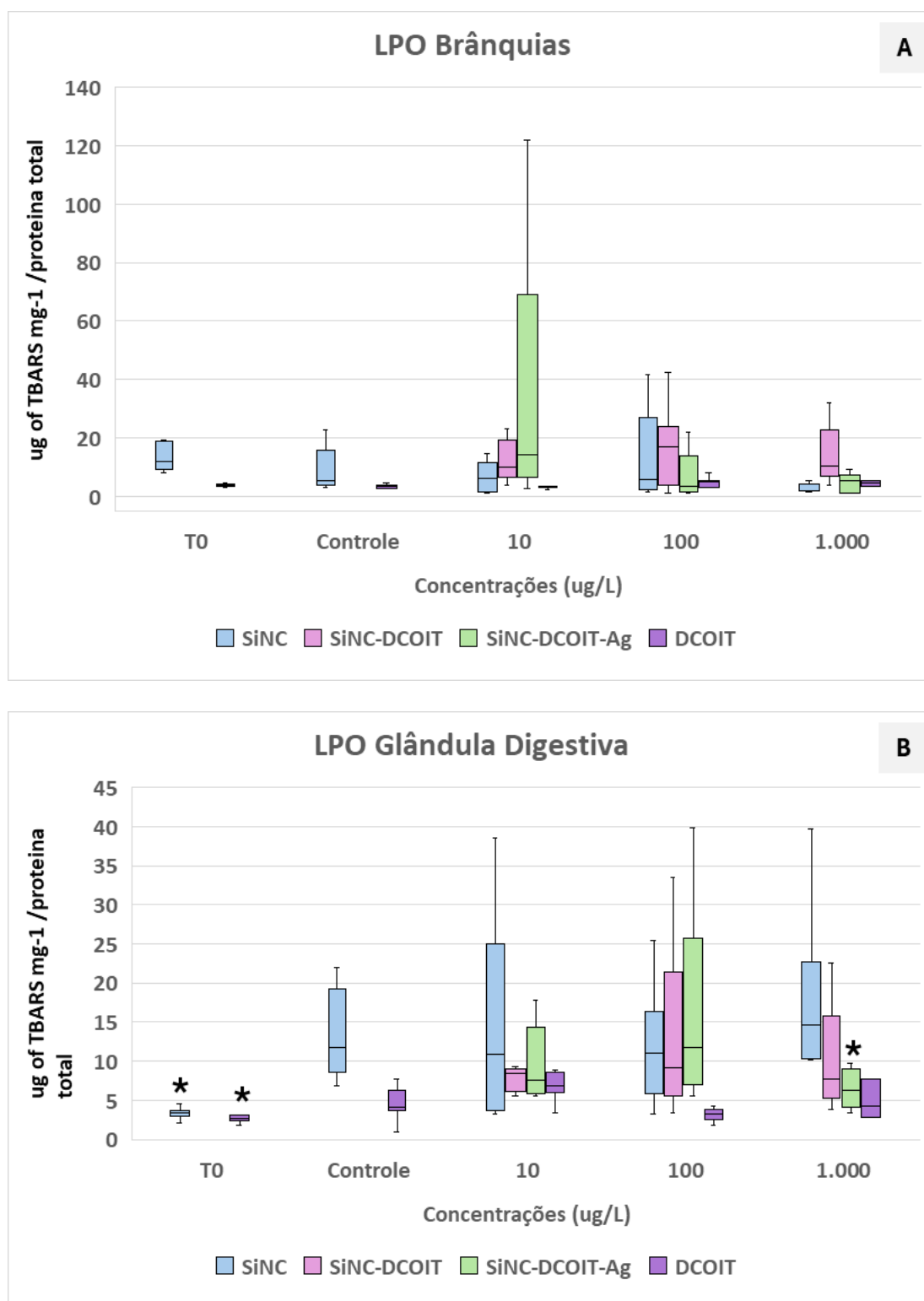
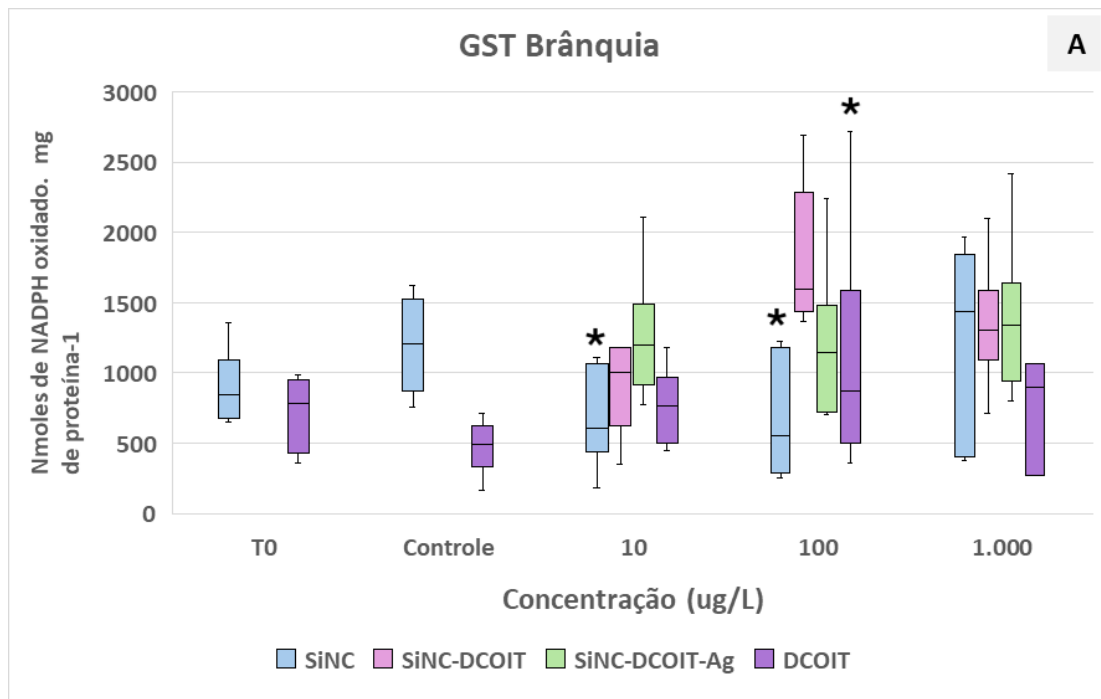


Figura 5. Efeitos bioquímicos em mexilhão *Perna perna* exposto a nanomateriais. A) LPO em brânquias. B) LPO em glândula digestiva. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

GST

Em Br, a atividade da GST apresentou diferença significativa em relação ao controle nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ SiNC, e DCOIT na concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 6A). Para GD, apenas o T0 do segundo experimento apresentou diferença significativa em relação ao controle, indicando possível estresse temporário dos organismos, o qual pode ter sido causado pela coleta ou no manuseio (Figura 6B).



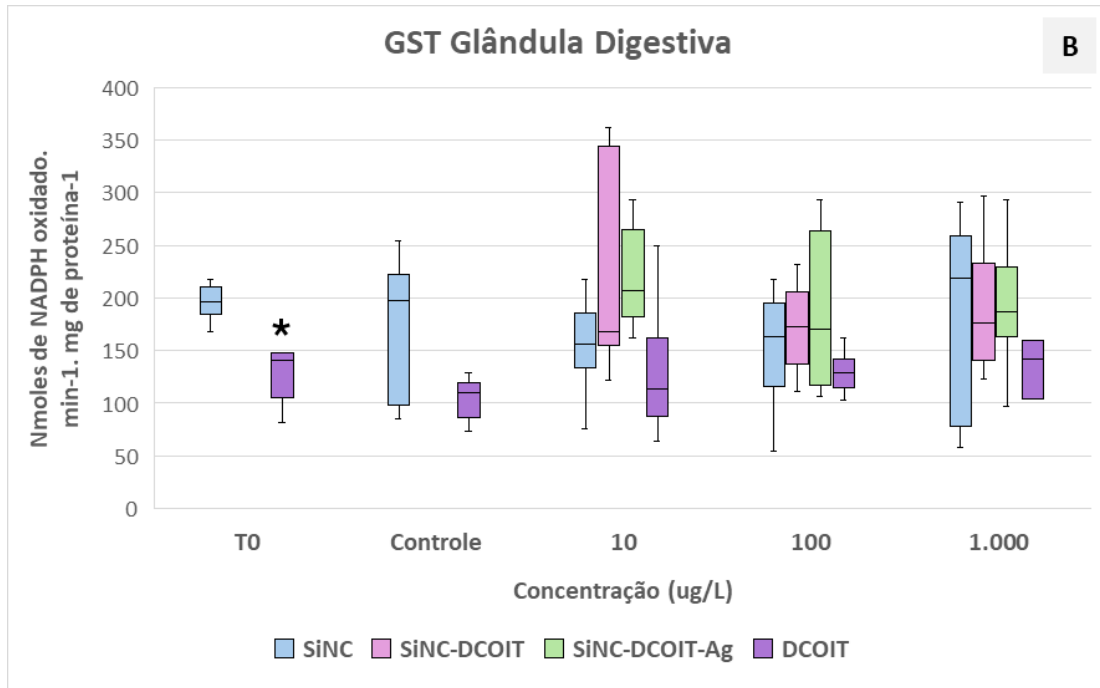


Figura 6. Efeitos bioquímicos em mexilhão *Perna perna* exposto a nanomateriais. A) Atividade de GST em brânquias. B) Atividade de GST em glândula digestiva. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

GSH

As quantidades de GSH calculadas para Br apresentaram diferença significativa em relação ao controle para T0 no primeiro experimento, assim como SiNC nas concentrações 100 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, SiNC-DCOIT-Ag na concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, e DCOIT em todas as concentrações testadas (Figura 7A). Em GD, foram observadas diferenças significativas em relação ao controle para T0 nos dois experimentos, cujo valores estavam abaixo do controle, e para a concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em SiNC e DCOIT (Figura 7B).

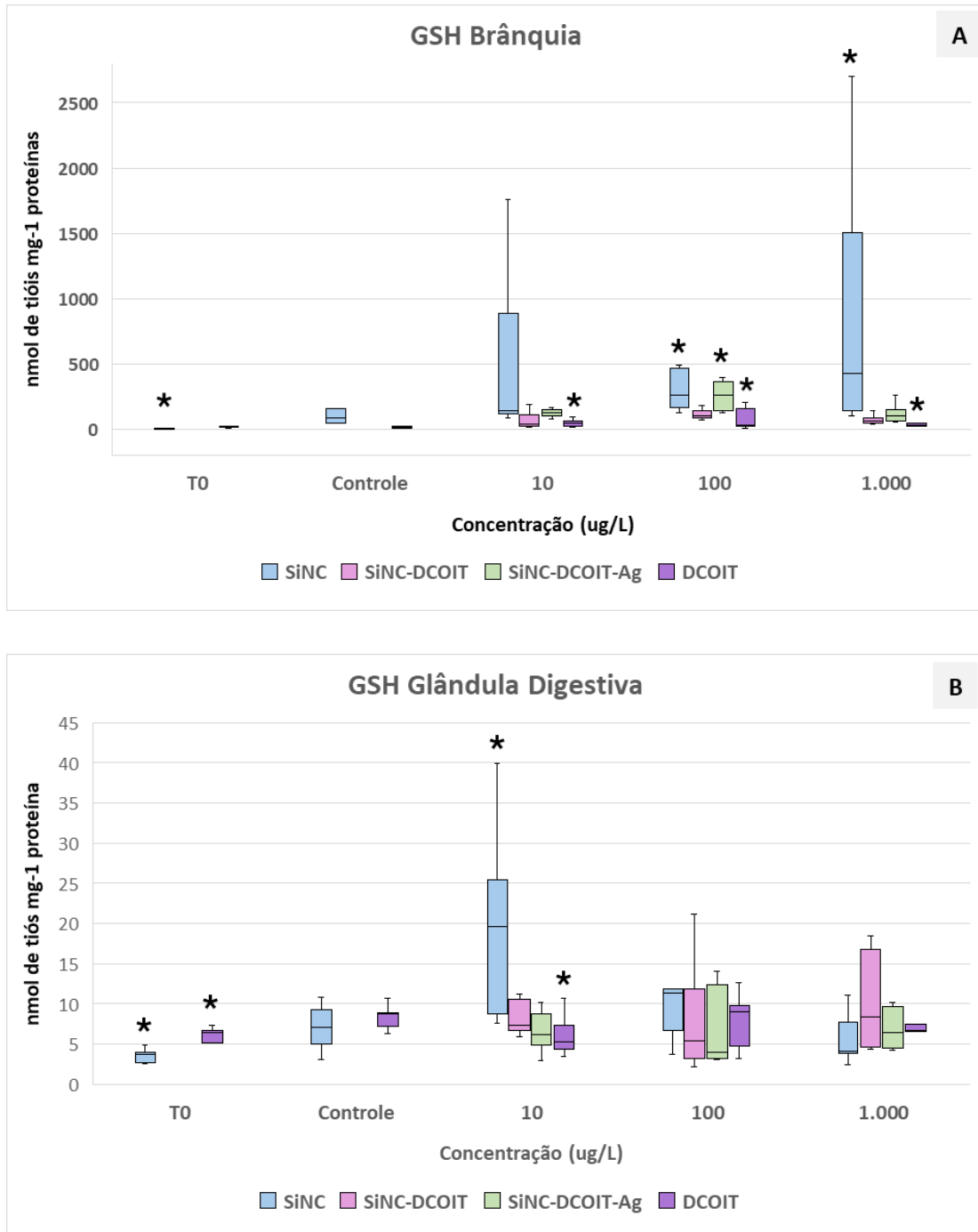


Figura 7. Efeitos bioquímicos em mexilhão *Perna perna* exposto a nanomateriais. A) Quantidade de GSH em brânquias. B) Quantidade de GSH em glândula digestiva. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

GPx

A atividade de GPx medida nas Br apresentou diferença significativa para todas as concentrações de SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag, e nas concentrações 100 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$

de SiNC (Figura 8A). Para GD, houve diferença significativa no T0, com valores menores que os do controle, e na concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DCOIT (Figura 8B).

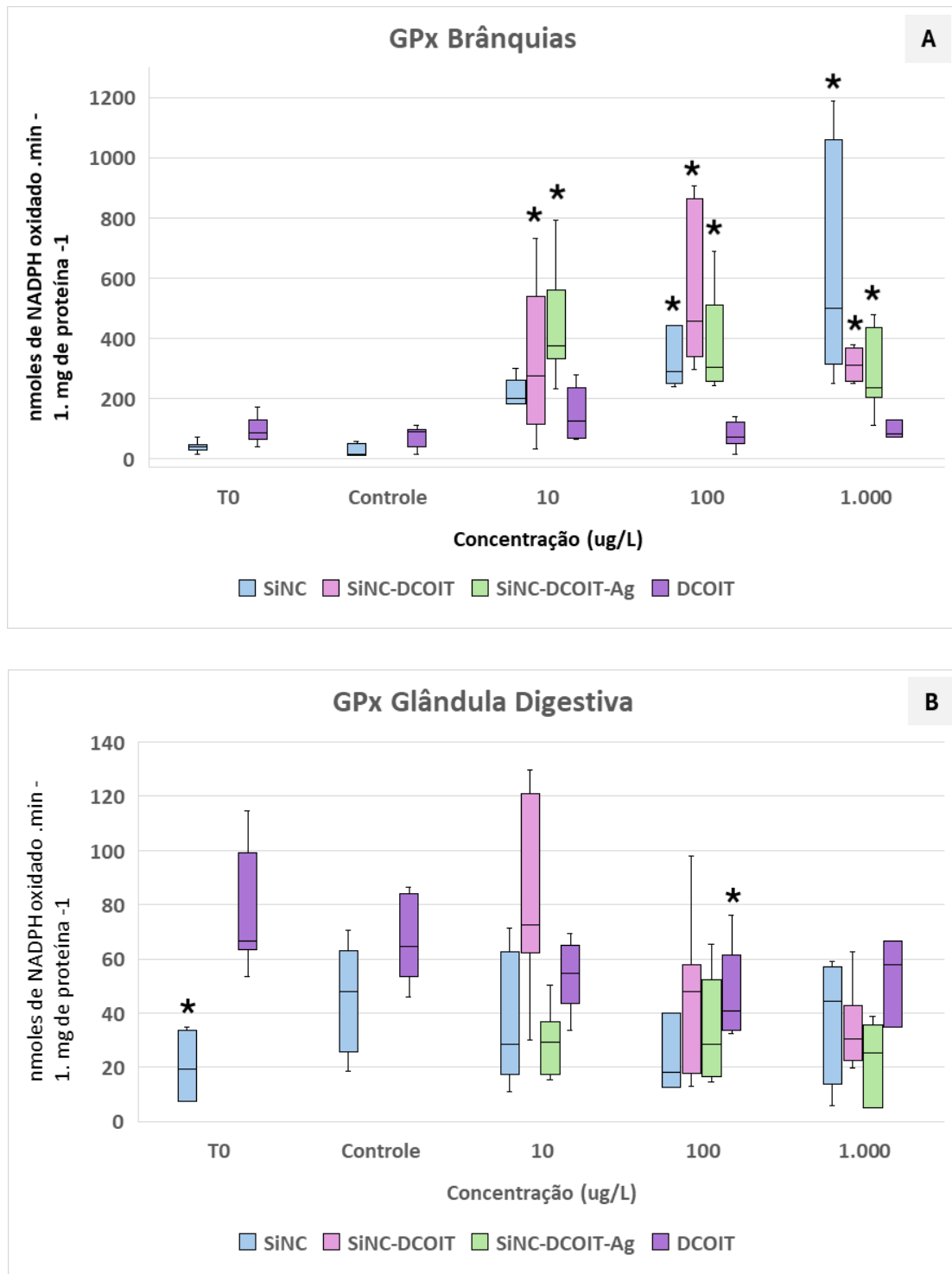


Figura 85. Efeitos bioquímicos em mexilhão *Perna perna* exposto a nanomateriais. A) A atividade de GPx em brânquias. B) A atividade de GPx em glândula digestiva. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

A atividade da enzima AChE foi medida especificamente no tecido branquial. Essa escolha metodológica ocorreu pela necessidade de refazer o processo de homogeneização, no qual o uso do inibidor de proteases Fenilmetilsulfonil Fluoreto (PMSF) apresentou um efeito inibitório sobre a atividade de AChE na primeira análise. Diante dessa necessidade de repetir o protocolo em algumas amostras e da limitação de tecido disponível, foi realizada apenas nas Br. A atividade de AChE medidas nas Br apresentou diferença significativa para todas as concentrações de SiNC-DCOIT-Ag, na concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SiNC-DCOIT e na concentração 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SiNC (Figura 9).

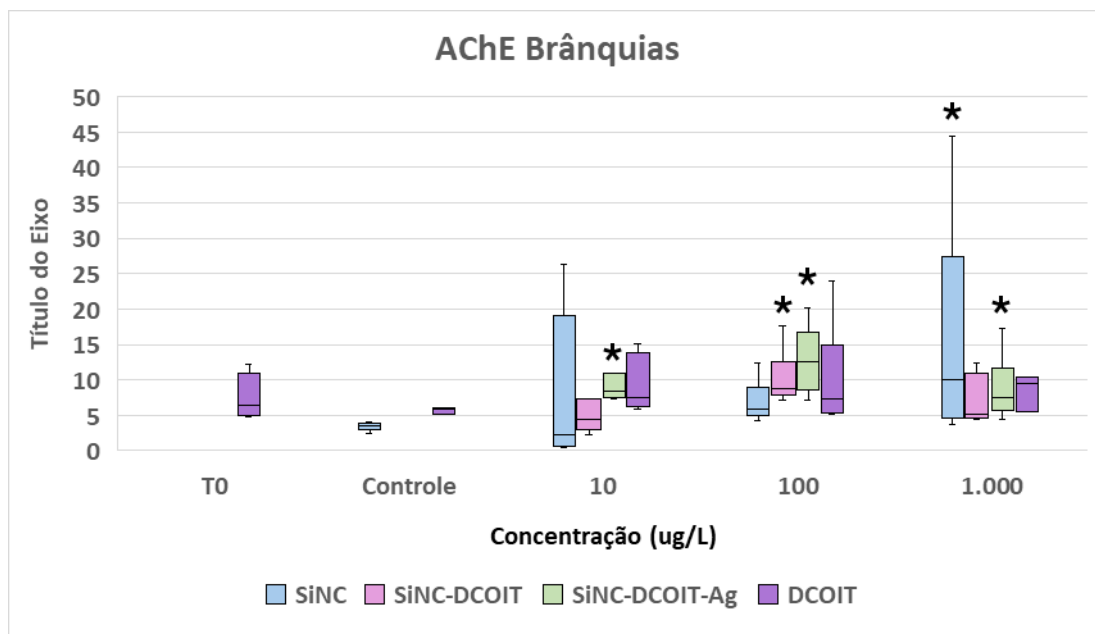


Figura 9. Efeitos bioquímicos em mexilhão *Perna perna* exposto a nanomateriais. Atividade de AChE em brânquias. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

Biomarcador celular

Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

No ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (VN) o controle do primeiro experimento apresentou valor médio de 72.86 minutos e o segundo experimento 81.43 minutos. O SiNC-DCOIT, apresentou diferença significativa para todas as concentrações testadas, com valores médios de 47.14 minutos, 35.63 minutos, 46.88 minutos. Em SiNC houve diferença significativa nas concentrações de 100 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores médios

de 43.13 minutos e 34.29 minutos, respectivamente. Em SiNC-DCOIT-Ag houve diferença nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores médios de 45 minutos e 42.86 minutos, respectivamente (Figura 10).

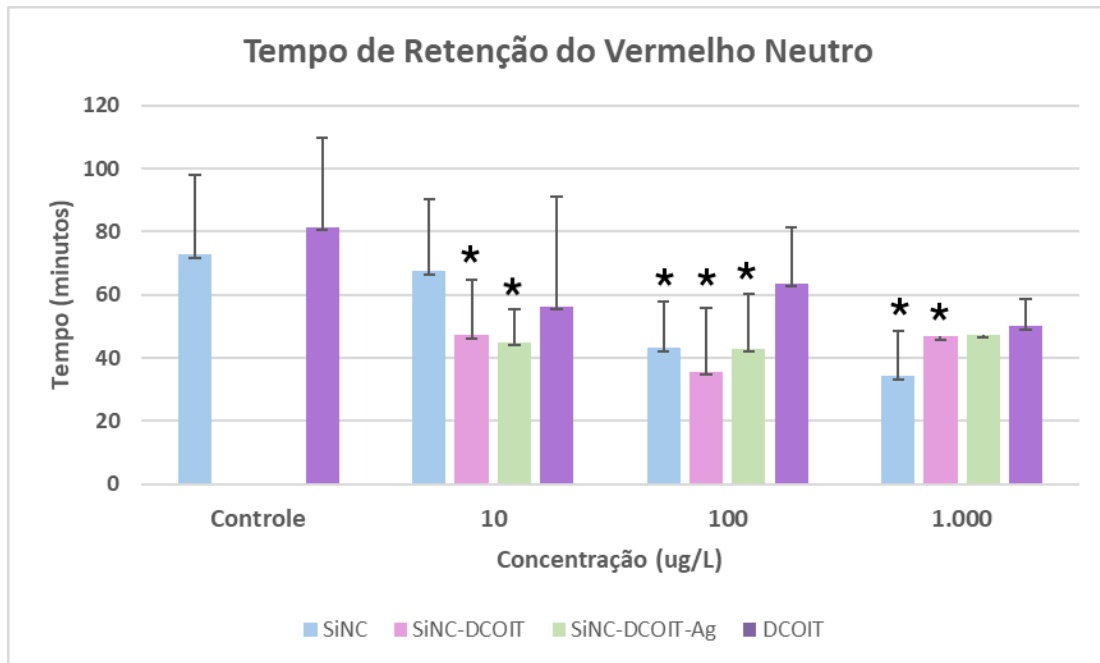


Figura 10. Ensaio do Tempo de Retenção de Vermelho Neutro. Os compostos SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag estão relacionados com o primeiro T0 e Controle, enquanto o DCOIT está relacionado ao segundo T0 e Controle. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle correspondente.

Na Tabela 1, estão dispostos os biomarcadores que apresentaram diferença significativa em relação ao controle, de acordo com o composto, as concentrações e o tipo de resposta exibida, seja ativação (indicado pela seta para cima) ou inibição (indicado pela seta para baixo), permitindo uma melhor visualização dos dados em conjunto. No caso do Vermelho Neutro, a tabela mostra as concentrações onde houve efeito significativo.

Tabela 1. Relação dos compostos e suas concentrações com os biomarcadores que apresentaram diferença significativa em relação ao controle correspondente. A seta para cima indica o aumento da atividade, enquanto a seta para baixo indica atividade abaixo do controle. Estrelas indicam diferenças significativas em relação ao controle.

Brânquias	SiNC	SiNC-DCOIT	SiNC-DCOIT-Ag	DCOIT
10	↓ GST	↑ Dano DNA ↑ GPx	↑ GPx ↑ AChE ↑ Dano DNA	↑ GSH
100	↑ GSH ↑ GPx ↓ GST	↑ GST ↑ GPx ↑ AChE	↑ GSH ↑ GPx ↑ AChE	↑ GST ↑ GSH
1.000	↑ GSH ↑ GPx ↑ AChE	↑ GPx	↑ GPx ↑ AChE	↑ GSH
Glândula Digestiva	SiNC	SiNC-DCOIT	SiNC-DCOIT-Ag	DCOIT
10	↑ GSH			↓ GSH
100				↑ Dano DNA ↓ GPx
1.000		↓ Dano DNA	↓ LPO	
Vermelho Neutro	SiNC	SiNC-DCOIT	SiNC-DCOIT-Ag	DCOIT
10		★	★	
100	★	★	★	
1.000	★	★		

4.1. Integração da resposta de biomarcadores por PCA

Os resultados da PCA integraram os dados de resposta dos biomarcadores na brânquia e na glândula digestiva (separadamente) com as concentrações dos compostos testados, determinando o grau de associação entre os fatores. Nesta análise, foram consideradas relevantes todas as variáveis cujos coeficientes foram maiores ou iguais a 0.45. Em BR, três componentes principais (PCs) explicaram 81,2% da variância dos dados (Tabela 2). A PC1 explicou 42,7% da variância dos dados e mostrou associações negativas para todos os biomarcadores, exceto a atividade de GSH. A PC2 explicou 21,9% da variância dos dados, demonstrando uma associação negativa nos níveis de LPO e positiva para a atividade de GSH.

A PC3 explicou 16,7% da variância dos dados, resultando em uma associação

positiva na atividade enzimática de GPx e estabilidade da membrana lisossômica (VN) (Figura 11).

A PCA demonstrou a formação de grupos distintos entre os tratamentos. Observou-se a formação de um grupo coeso, compreendendo os tratamentos: Controle (Cont), Controle do DCOIT (Cont_DC), DCOIT em todas as concentrações (DC10, DC100, DC1.000), SiNC na concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SiNC10) e SiNC-DCOIT-Ag na concentração 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AG1.000). Esse agrupamento sugere uma resposta mínima ou ausente nos biomarcadores analisados, o que se reflete em valores similares ou inferiores aos observados nos controles para tais biomarcadores.

Um segundo grupo distinto é formado por SiNC-DCOIT nas concentrações 10, 100 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SD10, SD100 e SD1.000), SiNC e SiNC-DCOIT-Ag na concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (S100 e AG100). Este grupo está associado aos biomarcadores GST, GSH, VN e AChE (Figura 12) indica uma relação direta e possivelmente mais intensa com a indução de efeitos subletais nos organismos expostos. Os compostos SiNC-DCOIT-Ag na concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AG10) e SiNC na concentração 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (S1.000) ficaram isolados, sendo o AG10 caracterizado por maiores valores em GPx, Danos em DNA e LPO; enquanto S1.000 caracterizado por maiores valores de GSH.

Tabela 2. Resultados da Análise de Componentes Principais integrando os dados de resposta dos biomarcadores brânquias (Br) do mexilhão *Perna perna* expostos aos nanomateriais anti-incrustantes associados ao biocida DCOIT. Em negrito estão os valores relacionados ao coeficiente ($\geq 0,45$).

PC BR	Eigenvalue	% of Variance	Cum.% of Var.
1	2.98	42.66	42.66
2	1.53	21.88	64.54
3	1.16	16.63	81.17
Correlações			
Var BR	PC1	PC2	PC3
GSH	-0.26	0.81	0.18
GST	-0.66	0.35	-0.30
GPx	-0.54	-0.35	0.69
DNA	-0.74	-0.41	-0.42
LPO	-0.82	-0.50	0.08
AChE	-0.76	0.29	-0.38
VN	-0.63	0.37	0.50

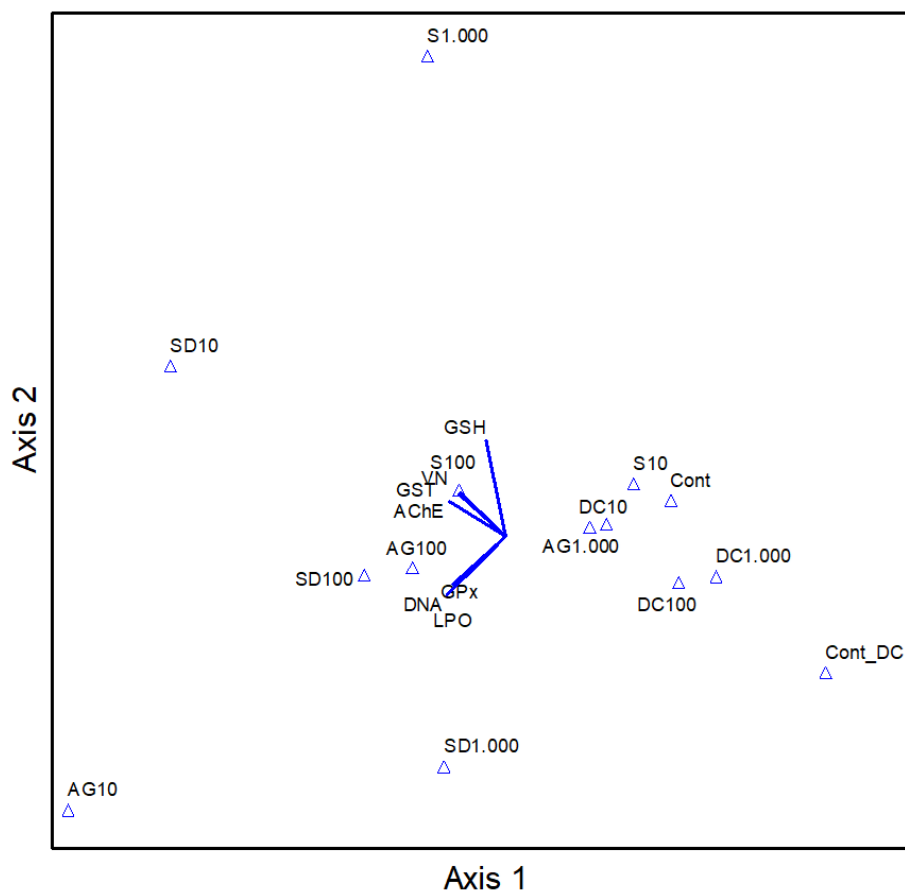


Figura 11. Ordenação gráfica da PCA, para os eixos 1 e 2, mostrando as projeções das correlações das variáveis e dos tratamentos, no caso de respostas de biomarcadores em brânquias de mexilhão *Perna perna* expostos ao biocida DCOIT e a nanomateriais anti-incrustantes. As linhas azuis indicam os biomarcadores e os triângulos indicam os compostos e suas concentrações correspondentes.

Em GD, três PCs explicaram 78,10% da variância dos dados (Tabela 3). A PC1 explicou 39,8% da variância dos dados, com associação negativa entre a atividade enzimática de GST, estabilidade da membrana lisossômica e níveis de LPO, além da associação positiva na atividade enzimática de GPx. A PC2 explicou 21,0% da variância dos dados e demonstrou associação negativa da atividade enzimática GPx e associação positiva na atividade de GSH. A PC3 explicou 17,3% da variância dos dados demonstrando associação inversa entre atividade da GST (positiva) e danos ao DNA (negativa) (Figura 12). Os scores da PCA, relacionados com cada composto e concentração estão no anexo II.

A PCA também demonstrou a formação de grupos distintos entre os tratamentos. Observou-se a formação de um grupo coeso, compreendendo os tratamentos: Controle (Cont), Controle do DCOIT (Cont_DC), DCOIT em todas as concentrações (DC10, DC100, DC1.000). Esse agrupamento é similar ao encontrando em Br.

Um segundo grupo distinto é formado por SiNC-DCOIT na concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SD100), SiNC-DCOIT na concentração de 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SD1.000) e SiNC-DCOIT-Ag nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AG10 e AG100). Esse agrupamento apresenta maiores valores de LPO, GST, VN e danos em DNA, com os maiores efeitos subletais nos organismos expostos. O terceiro e último grupo distinto é formado pelos tratamentos com maiores níveis de GSH, sendo composto pelas menores concentrações de SiNC (S10 e S100) e SiNC-DCOIT-Ag na concentração 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AG1.000).

Tabela 3. Resultados da Análise de Componentes Principais integrando os dados de resposta dos biomarcadores glândula digestiva (GD) do mexilhão *Perna perna* expostos as nanomateriais anti-incrustantes associados ao biocida DCOIT. Em negrito estão os valores relacionados ao coeficiente ($\geq 0,45$).

PC GD	Eigenvalue	% of Variance	Cum.% of Var.
1	2.39	39.83	39.83
2	1.26	20.98	60.81
3	1.04	17.29	78.10
Correlações			
Var GD	PC1	PC2	PC3
GSH	0.20	0.87	-0.05
GST	-0.75	-0.03	0.49
GPx	0.52	-0.65	0.16
DNA	-0.36	-0.20	-0.87
LPO	-0.86	0.07	-0.04
VN	-0.81	-0.15	0.06

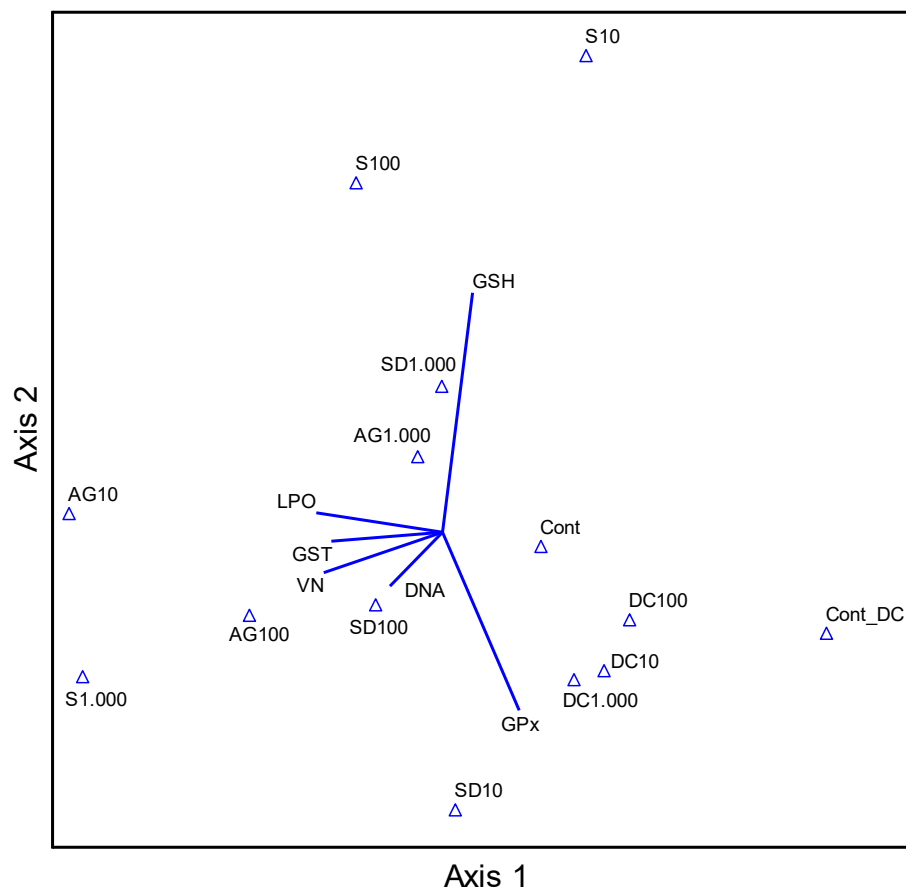


Figura 12. Ordenação gráfica da PCA, para os eixos 1 e 2, mostrando as projeções das correlações das variáveis e dos tratamentos, no caso de respostas de biomarcadores em glândulas digestivas de mexilhão *Perna perna* expostos ao biocida DCOIT e a nanomateriais anti-incrustantes. As linhas azuis indicam os biomarcadores e os triângulos indicam os compostos e suas concentrações correspondentes.

4.2 Índice IBRv2i

O Índice de Resposta Biológica demonstrou a integração das respostas dos biomarcadores frente aos diferentes compostos estudados e considerando diferentes pesos aos biomarcadores de efeito. Em Br, observou-se uma maior interação entre os biomarcadores quando expostos ao SiNC-DCOIT 1.000, seguindo a ordem decrescente de interação: SD 1.000 > Ag 10 > Ag 100 > S 1.000 > S 100 > DC 100 > SD 10 > DC 10. Em contraste, a análise do IBR em GD revelou uma maior interação dos biomarcadores especificamente na condição de exposição a DC 10, indicando uma resposta bem distinta entre os tecidos. (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do Índice de Resposta Integrada (IBRv2i) integrandos as médias dos dados de resposta dos biomarcadores na brânquia e na glândula digestiva do mexilhão *Perna perna* expostos as nanomateriais anti-incrustantes associados ao biocida DCOIT. Os dados foram analisados com seus respectivos controles.

Brânquia		Glândula Digestiva	
Amostra	Média	Amostra	Média
Controle	5,16	Controle	5,79
S10	8,68	S10	6,89
S100	11,23	S100	8,36
S1.000	12,85	S1.000	8,93
SD10	10,88	SD10	7,98
SD100	13,36	SD100	9,47
SD1.000	8,72	SD1.000	8,70
AG10	13,09	AG10	8,93
AG100	12,86	AG100	9,00
AG1.000	9,84	AG1.000	8,78
Cont. DC	5,1	Cont. DC	6,16
DC10	10,37	DC10	10,60
DC100	11,18	DC100	8,56
DC1.000	8,69	DC1.000	8,00

5. Discussão

Neste estudo, a hipótese principal previa a redução da toxicidade do DCOIT nas formas nanoestruturadas, o que de fato ocorreu quando o efeito agudo (i.e mortalidade) é considerado. Observou-se mortalidade significativa (62,5%) apenas entre os mexilhões expostos ao DCOIT, na maior concentração (1.000 µg L⁻¹) evidenciando sua alta toxicidade

para organismos marinhos não-alvo. Portanto, o encapsulamento em SiNC reduziu a toxicidade do DCOIT, corroborando com a função da nanocápsula em controlar a liberação do biocida. Contudo, é importante ressaltar que a redução da toxicidade aguda não implica a ausência de efeitos subletais. O DCOIT possui a capacidade de rápida penetração nas membranas celulares, inibindo enzimas com tióis intracelulares, desencadeando uma cascata de radicais livre e consequente estresse oxidativo (Cima *et al.*, 2013). Tal mecanismo pode levar a alterações celulares severas, culminando em morte por apoptose, conforme demonstrado em hemócitos de ascídia colonial *Botryllus schlosseri* (Cima *et al.*, 2008).

Corroborando com a toxicidade do DCOIT, Campos *et al.* (2022b) também reportaram letalidade total (100%) na mesma concentração em ostras *Crassostrea gigas*. No entanto, é importante notar que este resultado foi obtido em um teste de toxicidade crônica com duração de 14 dias, o que ressalta a importância do tipo de organismo e da duração da exposição na avaliação da toxicidade. Contudo, a sensibilidade do DCOIT demonstra ser variável entre diferentes grupos taxonômicos e estágios de desenvolvimento.

Além dos efeitos letais observados nos animais expostos à maior concentração de DCOIT, outros tratamentos induziram respostas bioquímicas ou celulares em brânquias e glândulas digestivas de *P. perna*.

A avaliação de danos ao DNA revelou padrões distintos entre os tecidos Br e GD de *P. perna*. Nas brânquias, observamos aumento significativo nos organismos expostos à menor concentração ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) de SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag. Embora reversíveis, danos ao DNA podem acarretar graves consequências fisiológicas ao organismo, podendo comprometer funções vitais, levar a mutações e reduzir a variabilidade genética (Dickmann *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2011). A literatura sugere que a genotoxicidade de agentes químicos pode estar atribuída à capacidade de gerar radicais de oxigênio, promovendo quebras de fita simples e dupla (Viarengo *et al.* 2007). Em contraste, na GD, o dano significativo ao DNA ocorreu apenas com a exposição a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em DCOIT, um

tratamento que também apresentou inibição da atividade da enzima antioxidante GPx. Por outro lado, a maior concentração ($1.000 \mu\text{g L}^{-1}$) de SiNC-DCOIT apresentou níveis de dano ao DNA menores que os do controle, sugerindo uma resposta complexa, possivelmente por uma ativação mais ampla dos sistemas de depuração e antioxidantes: neste tratamento observou-se aumento da atividade de GST e da GPx.

A ausência de danos ao DNA ou a redução nos seus níveis, tanto em Br quanto em GD, sugerem que a exposição pode estimular diferentes mecanismos de defesa ou reparo para neutralizar ou prevenir danos ao DNA. No presente estudo, a PCA indicou que, nas Br, os danos ao DNA estiveram associados com GST e GPx. Por sua vez, o sistema de reparo de DNA em mexilhões pode ser ativado após o acúmulo de substâncias tóxicas acima de um determinado limite (Ching *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2014; Fontes *et al.*, 2018). Em relação a outros estudos, nossos resultados em Br, para DCOIT divergem daqueles encontrados por Campos *et al.* (2022a), que não reportaram danos ao DNA. Já na GD, nossos resultados para o DCOIT $100 \mu\text{g L}^{-1}$ corroboram com os de Campos *et al.* (2022a), onde danos foram observados nas duas maiores concentrações (57 e $151 \mu\text{g L}^{-1}$) em ostra *Crassostrea brasiliana*. Em suma, os resultados sugerem que SiNC-DCOIT, SiNC-DCOIT-Ag e DCOIT possuem um potencial genotóxico, de acordo com o composto, a concentração e o tecido analisado.

Além dos danos genéticos, também avaliamos o potencial dos compostos em induzir o estresse oxidativo através da análise de peroxidação lipídica. A LPO é um processo complexo resultante da ação de radicais livres capazes de romper os lipídios de membrana (Oliveira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). Em Br, a ausência de resultados significativos em relação ao controle na atividade de LPO, indica que o período de exposição e/ou as concentrações testadas neste estudo não foram suficientes para desencadear danos oxidativos às membranas. Para GD, os organismos expostos ao SiNC-DCOIT-Ag $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram diferenças, porém com níveis menores do que os exibidos nos organismos do

controle indicando uma inibição da peroxidação lipídica. Nossos resultados diferem daqueles encontrados por Campos *et al.* (2022a) para os dois tecidos em *C. brasiliensis*, pois os níveis de LPO aumentaram significativamente em todas as concentrações testadas (0,2, 57 e 151 $\mu\text{g L}^{-1}$) em Br e nas concentrações 0,2 e 151 $\mu\text{g L}^{-1}$ de GD. Em outro estudo, Campos *et al.* (2022b) também obtiveram resultados de aumento nos níveis de LPO, em ostras *C. gigas*, para SiNC-DCOIT-Ag na concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e DCOIT nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A atividade da GST desempenha um papel crucial na detoxificação de xenobióticos e no metabolismo celular basal, podendo ser induzida em resposta à exposição de poluentes (Abel *et al.*, 2004). Em Br, nossos resultados indicaram um padrão de atividade que sugere uma resposta bifásica: estimulação em baixas concentrações (10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SiNC e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SiNC, SiNC-DCOIT e DCOIT) e ausência de alteração significativa na maior concentração testada (1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$). No presente estudo, a PCA indicou que nas Br, a atividade de GST estava associada à enzima GPx, aos biomarcadores de efeito Dano em DNA, LPO e AChE, e ao biomarcador celular VN. Para DCOIT um resultado semelhante foi demonstrado por Mandelli *et al.* (2025) em anfípodo *Tiburonella viscana*, com uma indução significativa em baixa concentração (100 ng g^{-1}). Esse padrão de resposta bifásica é consistente com achados em outros organismos expostos ao DCOIT, como demonstrado por Cima *et al.* (2013), em corais (*Sarcophyton cf. glaucum*), e pode ser explicado por diferentes mecanismos. Em baixas doses, a indução de GST pode refletir uma ativação dos mecanismos depuração dos xenobióticos, enquanto em altas doses, a ausência de efeito pode ser consequência da sobrecarga do sistema antioxidante ou de respostas comportamentais como o fechamento das valvas para minimizar a exposição (Figueiredo *et al.*, 2019). Adicionalmente, a inibição da GST em altas concentrações pode estar relacionada ao consumo excessivo de seu substrato, a GSH, sendo corroborada pela resposta inversa encontrada na PCA.

O papel crucial da GSH na defesa antioxidante, removendo as espécies reativas de oxigênio (ROS) do meio intracelular e atuando como substrato da enzima GST (Huber *et al.*, 2008; Rover *et al.*, 2001) foi evidenciado no nosso estudo. Nas Br, a resposta predominante à exposição aos nanomateriais e ao DCOIT foi um aumento nos níveis de GSH, um resultado que corrobora com o observado por Campos *et al.* (2022a) em ostras *C. brasiliiana* expostas ao DCOIT nas concentrações de 57 e 151 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esse aumento em diferentes concentrações: SiNC 100 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$; SiNC-DCOIT-Ag 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; e em todas as concentrações de DCOIT testadas, sugere uma ativação dos mecanismos de defesa antioxidante associados ao biocida. Por outro lado, em GD, a exposição a baixas concentrações de SiNC e DCOIT 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ levou a uma redução na quantidade de GSH, um efeito também observado por Campos *et al.* (2022a) em ostras expostas a uma concentração comparável às usadas neste projeto. A diferença na resposta da GSH nos tecidos indica uma possível regulação específica em detrimento da exposição aos compostos.

A GPx é uma enzima que também faz parte do sistema antioxidante, e desempenha um papel crucial na proteção celular, catalisando a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água. A importância dessa enzima reside no fato de que o H_2O_2 é um precursor do radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), uma das (ROS) mais tóxicas (Oliveira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). Em Br, observamos alterações significativas na atividade de GPx em resposta a diversos tratamentos: todas as concentrações de SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag, além de SiNC nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em contraste, Campos *et al.* (2022) relataram um aumento na atividade de GPx em ostras expostas a uma baixa concentração de DCOIT (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e inibição em concentrações mais elevadas (57 e 151 $\mu\text{g L}^{-1}$). Na GD, a atividade da GPx foi inibida especificamente pela exposição a DCOIT 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, correlacionando com o aumento no dano ao DNA observado nesse mesmo tratamento, sugerindo que o comprometimento da defesa antioxidante pode ter contribuído para o aumento dos efeitos genotóxicos.

A análise da atividade de AChE em Br revelou um aumento significativo nos organismos expostos aos compostos nanoestruturados. Para o SiNC-DCOIT-Ag todas as concentrações testadas induziram uma resposta significativa, sugerindo um potencial neurotóxico desta formulação. Adicionalmente, a exposição a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de SiNC-DCOIT e $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ de SiNC também produziram efeito similar. O aumento da AChE, uma enzima crucial para a neurotransmissão de impulsos nervosos de sinapses colinérgicas, observado em nosso estudo, corrobora os resultados encontrados por Mandelli *et al.* (2025), no qual o DCOIT induziu a AChE nas baixas e altas concentrações (100 e 1.000 ng g^{-1}). Embora o DCOIT isolado não tenha causado um aumento significativo na atividade de AChE em nosso estudo, as respostas observadas podem indicar um efeito sinérgico entre o DCOIT, a nanocápsula de SiNC e a Ag. Além disso, a AChE está relacionada com funções não-colinérgicas, como a apoptose induzida nas células, sugerindo ações da enzima em vias de sinalização da apoptose (Aranha *et al.*, 2021; Mandelli *et al.*, 2025).

A maior sensibilidade da atividade da AChE ao SiNC-DCOIT-Ag reforça parcialmente a segunda hipótese deste trabalho, a qual indica que a impregnação da prata na nanocápsula modifica sua toxicidade, podendo induzir a sinalização da apoptose via estimulação da AChE. Apesar de não apresentar tantos efeitos relacionados ao estresse oxidativo (conforme resultados anteriores), a formulação com a prata produziu efeitos adversos em mexilhões *P. perna* por outra via metabólica.

O Ensaio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro (VN) fundamenta-se na capacidade de lisossomos intactos em células saudáveis de absorver e reter o corante vermelho neutro. Danos na membrana lisossomal, frequentemente induzidos pelo impacto de xenobióticos, comprometem essa retenção, resultando em tempos significativamente menores devido ao extravazamento do corante ((Dailianis *et al.*, 2003; Cortez *et al.*, 2012). Em nosso estudo, a estabilidade da membrana lisossomal nos hemócitos de *P. perna* foi significativamente reduzida após a exposição a SiNC nas concentrações de 100 e $1.000 \mu\text{g}$

L⁻¹, a SiNC-DCOIT em todas as concentrações testadas e a SiNC-DCOIT-Ag nas concentrações de 10 e 100 µg L⁻¹. Figueiredo *et al.* (2019) demonstraram a nocividade de SiNC não carregado para diversas espécies marinhas. A toxicidade associada ao SiNC pode ser atribuída à presença residual do surfactante catiônico CTAB, utilizado em sua síntese, mesmo após múltiplos processos de lavagem (Maia *et al.*, 2015; Avelas *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2017; Figueiredo *et al.*, 2019). É importante notar que os compostos como CTAB possuem ação tensoativa, o que os habilita a lesionar as membranas celulares mesma na ausência de espécies reativas de oxigênio (Silva *et al.*, 2019). Em contraste com nossos resultados, Campos *et al.* (2022b) observaram uma redução na estabilidade lisossomal em *C.gigas* após a exposição a todas as concentrações de DCOIT.

O SiNC vazio induziu alterações significativas em biomarcadores de exposição nas Br, sugerindo uma possível interferência no sistema antioxidante dos organismos. Essa observação corrobora com estudos anteriores. Figueiredo *et al.* (2019) demonstraram a nocividade de SiNC não carregado para diversas espécies marinhas, principalmente associada ao surfactante CTAB (mencionado acima). Em nosso estudo, a exposição ao SiNC causou alterações significativas a dois biomarcadores de efeitos: a AChE e o tempo de retenção VN. Esse resultado aponta a necessidade de investigações mais aprofundadas para elucidar os mecanismos de ação do SiNC em bivalves marinhos.

Em Br, todos os compostos em todas as concentrações testadas apresentaram pelo menos um sistema antioxidante alterado significativamente. Em bivalves, as brânquias são o primeiro órgão a entrar em contato com contaminantes presentes no substrato, além disso desempenham um papel importante na desintoxicação de xenobióticos (Fontes *et al.*, 2017; de Campos *et al.*, 2022). Nesse estudo as brânquias demonstraram maior sensibilidade aos compostos do que a glândula digestiva, o que sugere ser este o principal órgão alvo para o DCOIT e compostos nanoestruturados analisados.

Em síntese, embora a hipótese inicial do presente estudo previsse uma redução da

toxicidade do DCOIT em suas formas nanoestruturadas, e o efeito agudo (i.e mortalidade) tenha de fato diminuído, os resultados dos efeitos subletais demonstraram um cenário complexo. Os dados revelaram que o comportamento das nanocápsulas (SiNC, SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag) ainda não está definido, e os efeitos tóxicos não foram reduzidos de forma padronizada. Ao contrário, observou-se uma resposta bem distinta entre os diferentes tratamentos, com padrões variados de genotoxicidade, estresse oxidativo, alterações enzimáticas e lisossomais, que muitas vezes não seguiram uma relação dose-resposta linear. Isso ressalta a complexa interação entre as nanocápsulas, seus componentes (DCOIT e Ag), e os mecanismos biológicos dos organismos expostos, evidenciando a necessidade de mais pesquisas para compreender completamente a aplicabilidade desta tecnologia.

6. Conclusões

O presente estudo demonstrou que, embora o DCOIT seja frequentemente considerado um agente biocida ambientalmente aceitável, nossos resultados, em consonância com a literatura, evidenciam sua toxicidade, induzindo efeitos letais e subletais no mexilhão *Perna perna*. Notavelmente, o encapsulamento do DCOIT proporcionou uma redução nos efeitos agudos, observados apenas na maior concentração testada de DCOIT ($1.000 \mu\text{g L}^{-1}$). Contudo, a investigação revelou efeitos crônicos ou subcrônicos causado tanto pelo DCOIT quanto pelas suas formas nanoencapsuladas, incluindo a própria nanocápsula vazia (SiNC). Estes efeitos foram detectados através da modulação de biomarcadores bioquímicos e celulares, indicando a ativação dos sistemas de depuração (GST) e antioxidantes (GPx e GSH), presença de danos ao DNA e aumento da atividade de acetilcolinesterase, que pode indicar sinalização de apoptose.

Portanto, para biomarcadores bioquímicos e o tempo de retenção do Vermelho Neutro, não se confirmou a hipótese de redução dos efeitos após a encapsulação do DCOIT

em SiNC. No entanto, as análises integrativas (PCA e IBR) sugerem que a impregnação de Ag pode aumentar levemente a toxicidade do SiNC-DCOIT, como evidenciado nas concentrações mais baixas (AG10 e AG100). Em relação à sensibilidade tecidual, as brânquias demonstraram ser mais responsivas aos compostos testados em comparação as glândulas digestivas.

7. Referências

- Abel, E. L., Opp, S. M., Verlinde, C. L., Bammler, T. K., & Eaton, D. L. (2004). Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione S-transferases. *Toxicological Sciences*, 80(2), 230-238.
- Abessa, DMS. (2016). Avaliação de risco ecológico no Rio Ribeira de Iguape (SP, Brasil) devido à contaminação por antigas atividades de mineração. Tese de Livre Docencia, UNESP. São Vicente, SP.
- Abreu, F. E., da Silva, J. N. L., Castro, Í. B., & Fillmann, G. (2020). Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port?. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122937.
- Almeida, E.A; Gomes, O.F.; Bainy, A.C.D; Medeiros, M.H.G; Dimascio, P. (2004). Lesões oxidativas no DNA de glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* como indicadoras de estresse ambiental. *Biotemas (UFSC)*, Florianópolis, SC, Brasil.17(1):163-178.
- Alzieu, C. (1991). Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research*, 32(1-4), 7-17.
- Alzieu, C. (2000). Environmental impact of TBT: the French experience. *Science of the Total Environment*, 258(1-2), 99-102.
- Aranha, M. L. G., Garcia, M. S., de Carvalho Cavalcante, D. N., Silva, A. P. G., Fontes, M. K., Gusso-Choueri, P. K., ... & Perobelli, J. E. (2021). Biochemical and histopathological responses in peripubertal male rats exposed to agrochemicals isolated or in combination: A multivariate data analysis study. *Toxicology*, 447, 152636.
- Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25): 255102.
- Bellas, J. (2007). Toxicity of the booster biocide Sea-Nine to the early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquatic toxicology*, 83(1), 52-61.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A. (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annual review of nutrition*, 21(1), 453-473.
- Bonnail, E., Lima, R.C., Bautista-Chamizo, E., Salamanca, M.J. & Cruz-Hernández, P. (2018). *Environmental Pollution*, v. 242, p. 1659-1668.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bricker, S. B., Ferreira, J. G., Zhu, C., Rose, J. M., Galimany, E., Wikfors, G., ... & Tedesco, M. A. (2018). Role of shellfish aquaculture in the reduction of eutrophication in an urban estuary. *Environmental science & technology*, 52(1), 173-183.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blaco, J., Porte, C., Sarasquete, C. & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of The Total Environment*, v. 247, p. 295-311.

Campos, B. G., Fontes, M. K., Gusso-Choueri, P. K., Marinsek, G. P., Nobre, C. R., Moreno, B. B., ... & de Souza Abessa, D. M. (2022a). A preliminary study on multi-level biomarkers response of the tropical oyster *Crassostrea brasiliana* to exposure to the antifouling biocide DCOIT. *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113241.

Campos, B. G., do Prado E Silva, M. B. M., Avelas, F., Maia, F., Loureiro, S., Perina, F., ... & Martins, R. (2022b). Toxicity of innovative antifouling additives on an early life stage of the oyster *Crassostrea gigas*: short-and long-term exposure effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(18), 27534-27547.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. (2017). Boletim da qualidade das praias. Acessado em: <http://praias.cetesb.sp.gov.br/boletim-semanal/>

Chen, L., & Lam, J. C. (2017). SeaNine 211 as antifouling biocide: A coastal pollutant of emerging concern. *Journal of Environmental Sciences*, 61, 68-79.

Cima, F., Bragadin, M., & Ballarin, L. (2008). Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes: I. Sea-Nine 211™ and chlorothalonil. *Aquatic toxicology*, 86(2), 299-312.

Cima, F., Ferrari, G., Ferreira, N. G., Rocha, R. J., Serôdio, J., Loureiro, S., & Calado, R. (2013). Preliminary evaluation of the toxic effects of the antifouling biocide Sea-Nine 211™ in the soft coral *Sarcophyton cf. glaucum* (Octocorallia, Alcyonacea) based on PAM fluorometry and biomarkers. *Marine environmental research*, 83, 16-22.

Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C., & Wood, R. J. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201(6), 3642-3652.

Ching, E. W., Siu, W. H., Lam, P. K., Xu, L., Zhang, Y., Richardson, B. J., & Wu, R. S. (2001). DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo [a] pyrene: dose-and time-dependent relationships. *Marine pollution bulletin*, 42(7), 603-610.

Cortez, F. S., Pereira, C. D. S., Santos, A. R., Cesar, A., Choueri, R. B., de Assis Martini, G., & Bohrer-Morel, M. B. (2012). Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Environmental pollution*, 168, 145-150.

Dafforn, K. A., Lewis, J. A., & Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine pollution bulletin*, 62(3), 453-465.

Da Gama, B. A. P., Pereira, R. C., & Coutinho, R. (2009). Bioincrustação marinha. *Pereira RC, Soares-Gomes A, orgs. Biologia Marinha. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência*, 299-318.

Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., & Dimitriadis, V. K. (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. *Marine Environmental Research*, 56(4), 443-470.

Demirel, Y. K., Turan, O., & Incecik, A. (2017). Predicting the effect of biofouling on ship resistance using CFD. *Applied ocean research*, 62, 100-118.

Diekmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., & Nagel, R. (2004). On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquatic toxicology*, 68(1), 27-37.

Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P., Dhadialla, T. & Hutchinson, T. (2001). Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* Bll cell in vitro assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, p. 2038-2046.

Dobretsov, S., Dahms, H. U., & Qian, P. Y. (2006). Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*, 22(1), 43-54.

Doherty, F.G. (1990). The Asian clam, *Corbicula* spp. as a biological monitor in freshwater environments. *Environ Monit Assess*, v. 15, p. 143-181.

Dos Santos, F. S., Neves, R. A., Crapez, M. A. C., Teixeira, V. L., & Krepsky, N. (2022). How does the brown mussel *Perna perna* respond to environmental pollution? A review on pollution biomarkers. *Journal of Environmental Sciences*, 111, 412-428.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

European Chemicals Agency (ECHA) – Prior Informed Consent Regulation (PIC). Acesso em 07/11/2024. <https://echa.europa.eu/pt/pic-factsheet/-/pic-detail/100.004.806>

Ferreira, V., Figueiredo, J., Martins, R., Sushkova, A., Maia, F., Calado, R., ... & Loureiro, S. (2023). Characterization and Behaviour of Silica Engineered Nanocontainers in Low and High Ionic Strength Media. *Nanomaterials*, 13(11), 1738.

Figueiredo, J., Oliveira, T., Ferreira, V., Sushkova, A., Silva, S., Carneiro, D., ... & Martins, R. (2019). Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions to marine species. *Environmental Science: Nano*, 6(5), 1418-1429.

Fontes, M. K., Gusso-Choueri, P. K., Maranhão, L. A., de Souza Abessa, D. M., Mazur, W. A., de Campos, B. G., ... & Pereira, C. D. S. (2018). A tiered approach to assess effects of diclofenac

on the brown mussel *Perna perna*: A contribution to characterize the hazard. *Water research*, 132, 361-370.

Fournier, E., Adam, C., Massabuau, J.C. & Garnier-Laplace, J. (2005). Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species. *Aquatic Toxicology*, v. 72, p. 251-260.

Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D.C., Dunbar, M.J., Edwards, F.K. & Grey, J. et al. (2011). Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems: The good, the bad and the ugly. 37. *Advances in Ecological Research*, v. 44, p. 1-68.

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E. & Strand, J. (2006). Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), 348-361.

Gosling, E. (2015). *Moluscos bivalves marinhos*. John Wiley & Filhos.

Harino, H., & Langston, W. J. (2009). Degradation of alternative biocides in the aquatic environment. In *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (pp. 397-412). Tokyo: Springer Japan.

His, E., & Robert, R. (1983). Developpement des veligeres de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalites larvaires. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*, 47(1-2), 63-88.

Hoch, E., Martins, R., Maia, F., Oliveira, T., Shpigel, M., Weis, M., ... & Benayahu, Y. (2019). Toxicity of engineered micro-and nanomaterials with antifouling properties to the brine shrimp *Artemia salina* and embryonic stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Pollution*, 251, 530-537.

Horiguchi, T., Kojima, M., Hamada, F., Kajikawa, A., Shiraishi, H., Morita, M., & Shimizu, M. (2006). Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations. *Environmental Health Perspectives*, 114(Suppl 1), 13-19.

Huber, P. C., Almeida, W. P., & Fátima, Â. D. (2008). Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Química Nova*, 31, 1170-1179.

Jacobson, A. H., & Willingham, G. L. (2000). Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Science of the Total Environment*, 258(1-2), 103-110.

Júnior, L.R., Höehr, N.F., Vellasco, A.P., Kubota, L.T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, 24(1): 112-119

Kaczerewska, O., Martins, R., Figueiredo, J., Loureiro, S., & Tedim, J. (2020). Environmental behaviour and ecotoxicity of cationic surfactants towards marine organisms. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122299.

Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of

the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188.

Kobayashi, N., & Okamura, H. (2002). Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Marine pollution bulletin*, 44(8), 748-751.

Kölzsch, A., & Blasius, B. (2011). Indications of marine bioinvasion from network theory: An analysis of the global cargo ship network. *The European Physical Journal B*, 84, 601-612.

Kotrikla, A. (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management*, 90, S77-S85.

Lathlean, J. A., & McQuaid, C. D. (2017). Biogeographic variability in the value of mussel beds as ecosystem engineers on South African rocky shores. *Ecosystems*, 20, 568-582.

Lowe, D.M; Fossato, V.U; Depledge, M.H. (1995). Contaminant-induced lysosomal membranedamage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Marine Ecology Progress Series*, 129: 189-196

Maia, F., Silva, A. P., Fernandes, S., Cunha, A., Almeida, A., Tedim, J., ... & Ferreira, M. G. S. (2015). Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications. *Chemical Engineering Journal*, 270, 150-157.

Mandelli, W. G., Alves, A. V., Abreu, F. E. L., de Moraes, B. S., Zanardi-Lamardo, E., Castro, Í. B., ... & Moreira, L. B. (2025). Biomarkers responses in the amphipod *Tiburonella viscana* exposed to the biocide DCOIT and CO₂-induced ocean acidification. *Environmental Pollution*, 372, 126018.

Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., Campillo, J. A., & Moore, M. (2008). Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(4), 490-499.

Martins, T. L., & Vargas, V. M. (2013). Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(1), 1-11.

Maziero, J. D. S. (2019). *Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em microcrustáceos aquáticos e em embriões de Danio rerio* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Michailidis, M., Gutner-Hoch, E., Wengier, R., Onderwater, R., D'Sa, R. A., Benayahu, Y., ... & Shchukin, D. G. (2020). Highly effective functionalized coatings with antibacterial and antifouling properties. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(24), 8928-8937.

Montserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chavez, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J. & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 164, p. 221-234.

Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic*

Toxicology, 63(4), 447–463.

Oliveira, M., Maria, V. L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2009). Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*—an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, 157(3), 959-967.

Olive, P.L. 1998. DNA precipitation Assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 11, 487-495.

Olivier, A. van der, Jones, L., Vay, L. L., Christie, M., Wilson, J., & Malham, S. K. (2020). A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 3-25.

Ortega, A.S.B., Maranhão, L.A., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Guimarães, R.S., Lebre, D.T., et al. (2019). Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel *Perna perna*. *Environ. Sci. Pollut. R.* 26 (27), 27569–27578.

Parks, R., Donnier-Marechal, M., Frickers, P. E., Turner, A., & Readman, J. W. (2010). Antifouling biocides in discarded marine paint particles. *Marine Pollution Bulletin*, 60(8), 1226-1230.

Pereira, C. D. S., Martin-Díaz, M. L., Zanette, J., Cesar, A., Choueri, R. B., de Souza Abessa, D. M., ... & Del Valls, T. A. (2011). Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1257-1264.

Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83.

Rittschof, D., & McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine pollution bulletin*, 50(4), 369-373.

Rover Júnior, L., Höehr, N. F., Vellasco, A. P., & Kubota, L. T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, 24, 112-119.

Ruggiero, L., Di Bartolomeo, E., Gasperi, T., Luisetto, I., Talone, A., Zurlo, F., ... & Sodo, A. (2019). Silica nanosystems for active antifouling protection: nanocapsules and mesoporous nanoparticles in controlled release applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 798, 144-148.

Silva, A. M., Martins-Gomes, C., Coutinho, T. E., Fangueiro, J. F., Sanchez-Lopez, E., Pashirova, T. N., ... & Souto, E. B. (2019). Soft cationic nanoparticles for drug delivery: Production and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Applied Sciences*, 9(20), 4438.

Schmidt, W., Rainville, L. C., McEneff, G., Sheehan, D., & Quinn, B. (2014). A proteomic evaluation of the effects of the pharmaceuticals diclofenac and gemfibrozil on marine mussels (*Mytilus spp.*): evidence for chronic sublethal effects on stress-response proteins. *Drug testing and analysis*, 6(3), 210-219.

Sedlak, J., Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192–205

Silva, E. R., Ferreira, O., Ramalho, P. A., Azevedo, N. F., Bayón, R., Igartua, A., ... & Calhorda, M. J. (2019). Eco-friendly non-biocide-release coatings for marine biofouling prevention. *Science of the Total Environment*, 650, 2499-2511.

USEPA. 1996. Sea-Nine, *Green Chemistry Challenge Awards*. Disponível em: <https://goo.gl/vxIQky>

Vaughn, C. C., & Hoellein, T. J. (2018). Bivalve impacts in freshwater and marine ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 183-208.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.

Wendt, I., Backhaus, T., Blanck, H., & Arrhenius, Å. (2016). The toxicity of the three antifouling biocides DCOIT, TPBP and medetomidine to the marine pelagic copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 25, 871-879.

Anexo I - Parâmetros Físicos Químicos

1º experimento				
Inicial	12/12/2022	Temp. 23°C		
Composto	Salinidade	pH	Oxigênio	Amônia
Controle	35	7,74	5,45	ok
SiNC 10	35	7,8	4,25	ok
SiNC 100	35	7,8	5,71	ok
SiNC 1.000	35	7,76	4,54	ok
SiNC DCOIT 10	35	7,43	4,77	ok
SiNC DCOIT 100	35	7,74	5,33	ok
SiNC DCOIT 1.000	35	7,79	5,32	ok
Ag 10	35	7,38	3,76	ok
Ag 100	35	7,25	5,23	ok
Ag 1.000	35	7,24	4,65	ok
Final	15/12/2022	Temp. 23°C		
Composto	Salinidade	pH	Oxigênio	Amônia
Controle	35	7,62	5,4	ok
SiNC 10	37	7,27	2,78	ok
SiNC 100	37	7,57	5,38	ok
SiNC 1.000	36	7,54	4,2	ok
SiNC DCOIT 10	37	7,43	2,68	ok
SiNC DCOIT 100	36	7,65	3,12	ok
SiNC DCOIT 1.000	38	7,42	3,03	ok
Ag 10	38	7,38	3,8	ok
Ag 100	37	7,25	2,39	ok
Ag 1.000	38	7,24	3,01	ok

2º experimento				
Inicial	23/02/2023	Temp. 24°C		
Composto	Salinidade	pH	Oxigênio	Amônia
Controle 1	35	7,85	5,18	ok
Controle 2	35	7,92	5,37	
DCOIT 10 1	35	7,98	5,48	ok
DCOIT 10 2	35	8,02	5,35	
DCOIT 100 1	35	7,97	5,33	ok
DCOIT 100 2	35	7,9	5,32	
DCOIT 1.000 1	35	8	6,13	ok
DCOIT 1.000 2	35	7,98	6,2	
Final	26/02/2024	Temp. 24°C		
Composto	Salinidade	pH	Oxigênio	Amônia
Controle 1	35	7,64	5,24	ok
Controle 2	35	7,72	6,06	
DCOIT 10 1	35	7,56	5,35	ok
DCOIT 10 2	35	7,64	4,32	
DCOIT 100 1	35	7,69	5,79	ok
DCOIT 100 2	35	7,72	5,97	
DCOIT 1.000 1	35	7,74	6,02	ok
DCOIT 1.000 2	35	7,65	5,08	

Anexo II – Scores da PCA

Brânquias

Tratamento	PC1	PC2	PC3
Cont.	1.36	0.24	-0.78
S10	1.05	0.36	0.28
S100	-0.37	0.32	1.03
S1.000	-0.63	3.30	0.78
SD10	-2.73	1.17	-1.70
SD100	-1.15	-0.28	1.04
SD1.000	-0.50	-1.59	2.19
AG10	-3.57	-1.89	-1.09
AG100	-0.75	-0.22	0.66
AG1.000	0.69	0.06	0.31
Cont DC	2.62	-0.95	-0.79
DC10	0.83	0.08	-0.87
DC100	1.42	-0.32	-0.96
DC1.000	1.72	-0.28	-0.11

Glândula Digestiva

Tratamento	PC1	PC2	PC3
Cont.	0.72	-0.08	0.40
S10	1.05	2.61	0.19
S100	-0.65	1.91	-1.29
S1.000	-2.65	-0.79	-0.66
SD10	0.09	-1.52	1.32
SD100	-0.50	-0.40	1.14
SD1.000	-0.02	0.80	1.37
AG10	-2.75	0.10	0.29
AG100	-1.42	-0.46	-1.44
AG1.000	-0.19	0.41	1.32
Cont DC	2.81	-0.56	-0.24
DC10	1.18	-0.76	-0.43
DC100	1.37	-0.48	-1.29
DC1.000	0.96	-0.80	-0.68

