



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



ECOLOGIA

ISABELA MARTINS

**TOXICIDADE DE NOVOS NANOMATERIAIS
ANTI-INCRUSTANTES SOBRE O CORAL-
SOL (*Tubastraea coccinea*).**

Rio Claro – SP
2023

A large, stylized graphic of a coral polyp, specifically Tubastraea coccinea, is positioned in the bottom right corner. It features a light blue and white geometric pattern that mimics the structure of the coral's skeleton.

ISABELA MARTINS

**TOXICIDADE DE NOVOS NANOMATERIAIS ANTI-INCRUSTANTES
SOBRE O CORAL-SOL (*Tubastraea coccinea*).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

Coorientadora: Kátia Cristina Cruz Capel

Supervisor: Milton Cezar Ribeiro

Rio Claro - SP
2023

M386t Martins, Isabela
Toxicidade de novos nanomateriais anti-incrustantes sobre o coral-sol (*Tubastraea coccinea*) / Isabela Martins. -- Rio Claro, 2023
29 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio
Claro

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa
Coorientadora: Kátia Cristina Cruz Capel, Milton Cezar Ribeiro

1. Toxicologia ambiental. 2. Ecologia marinha. 3. Ciências da vida.
I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

ISABELA MARTINS

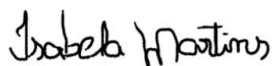
**TOXICIDADE DE NOVOS NANOMATERIAIS ANTI-INCRUSTANTES
SOBRE O CORAL-SOL (*Tubastraea coccinea*).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de **Ecóloga**.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa (orientador)
Profa. Dra. Kátia Cristina Cruz Capel (coorientador)
Prof. Dr. Milton Cezar Ribeiro (supervisor)
Profa. Dra. Kaline de Mello
Prof. Dr. Caio Cesar Ribeiro

Aprovado em: 02 de junho de 2023



Assinatura do discente

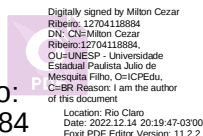


Assinatura do(a) orientador(a)



Assinatura do(a) coorientador(a)

Milton
Cezar
Ribeiro:
12704118884



Digitally signed by Milton Cezar
Ribeiro, 12704118884
DN: CN=Milton Cezar
Ribeiro, 12704118884,
OU=UNESP - Universidade
Estadual Paulista, Julio de
Mesquita Filho, O=CPEdu,
C=BR Reason: I am the author
of this document
Location: Rio Claro
Date: 2022.12.14 20:19:47-03'00'
Foxit PDF Editor Version: 11.2.2

Assinatura do(a) supervisor(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram das experiências e aprendizados vividos durante o desenvolvimento do trabalho.

Primeiramente aos meus pais, irmão e irmã, por todo o amor, suporte, por compreenderem meus sonhos e sempre acreditarem em mim. Da mesma maneira, agradeço meus amigos que possuem um papel fundamental na minha formação como pessoa durante a graduação, por dividirmos e compartilharmos momentos de felicidade, angústia e medo ao longo desses quatro anos.

Ao Prof. Dr. Denis Abessa por ter sido um ótimo orientador, me ajudou em um dos meus sonhos de trabalhar com o ambiente marinho e me receber em sua unidade UNESP Campus Litoral Paulista e a Dra. Katia Capel pela orientação e as valiosas contribuições para esse estudo, agradeço muito aos dois pela confiança e oportunidade.

Aos alunos, mestrandos e doutorandos do laboratório NEPEA em São Vicente, que mereceram de braços abertos com todo suporte e ajuda que eu precisava.

Aos programas de financiamento de pesquisa, do qual o presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) - Bolsa para iniciação científica, PIBIC/PIBITI – Edital PROPe UNESP num. 04/2021, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2020/03004- 0, e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR-USP).

Muito obrigada a todos.

RESUMO

Biocidas usados na composição de tintas anti-incrustantes para evitar o processo de bioincrustação marinha podem sofrer lixiviação gradual e alguns podem ser persistentes no ambiente marinho e causar efeitos ambientais perigosos para organismos não alvo. Novas técnicas, como o encapsulamento em nanomateriais, têm sido desenvolvidas com o propósito de controlar a velocidade de liberação e reduzir os efeitos tóxicos deste biocida. Neste estudo, além das formas livres (DCOIT e SiNC), foi utilizado o encapsulamento em nanocápsulas mesoporosas de sílica (SiNC-DCOIT) e prata (SiNC-DCOIT-Ag), que apontam ser opções benéficas e favoráveis ecologicamente, atenuando os impactos ambientais, sem comprometer sua eficácia para organismos de ambiente temperado. O organismo alvo do estudo foi o coral- sol (*Tubastraea coccinea*). Esta espécie é considerada invasora no litoral brasileiro e a utilização da mesma serve como alternativa para se estimar os riscos às espécies nativas. Desta forma, o estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade e efeitos de letalidade do biocida anti-incrustante DCOIT e suas versões nanoencapsuladas em organismos de *T. coccinea* e observar a ocorrência de efeitos sub letais aos animais. A coleta das colônias foi feita no Arquipélago de Alcatrazes, SP, Brasil e as colônias foram expostas individualmente em frascos de 500mL com diferentes concentrações das substâncias, sendo, 3,33, 10, 33 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DCOIT livre; 500, 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o SiNC; e 74,1, 222,2, 666,7 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag, por um período de 96 horas, com aeração e temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo natural (12h claro, 12h escuro). Após o tempo de exposição, nenhum efeito letal foi observado, no entanto, foi possível observar alguns efeitos subletais, como o esqueleto calcário aparente em praticamente todas as concentrações e réplicas, porém ausentes nos controles, e a fragilização e branqueamento do esqueleto nas concentrações mais altas. A espécie *T. coccinea* foi considerada pouco sensível às substâncias testadas. Essa resistência pode indicar uma maior capacidade de proliferação da espécie, sendo favorecida em substrato contendo tintas anti-incrustantes, em detrimento das espécies nativas.

Palavras-chaves: *Tubastraea coccinea*; Anti-incrustante; DCOIT; Nanoencapsulamento.

ABSTRACT

Biocides used in the composition of antifouling (AF) paints to avoid the marine biofouling process can undergo gradual leaching and some can be persistent in the marine environment and cause harmful environmental effects to non-target organisms. New techniques, such as the use of nanoengineered materials containing the AF compounds, have been developed with the purpose of controlling the release rate and reducing the toxic effects of the biocide. In this study, in addition to the free forms (DCOIT and SiNC), encapsulation in mesoporous nanocapsules of silica (SiNC-DCOIT), which was considered an ecologically friendly alternative, and silver (SiNC-DCOIT-Ag) was used, which point to be beneficial and ecologically favorable options, mitigating environmental impacts, without compromising its effectiveness for organisms of temperate environment. The target organism of the study was the sun coral (*Tubastraea coccinea*). This species is considered invasive on the Brazilian coast and can be an alternative test organism to evaluate the risks to native species. Thus, the study aimed to evaluate the toxicity and lethal effects of the AF biocide DCOIT, in its free and nanoengineered forms, to *T. coccinea* colonies and to observe the occurrence of sublethal effects on animals. The colonies were collected in the Alcatrazes Archipelago, SP, Brazil and then they were individually exposed in 500mL flasks with different concentrations of the substances. Being 3.33, 10, 33 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for free DCOIT; 500, 1000, 2000 and 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for SiNC; and 74.1, 222.2, 666.7 and 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for SiNC-DCOIT and SiNC-DCOIT-Ag, for a period of 96 hours, with aeration and constant temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod natural (12h light, 12h dark). After the exposure time, no lethal effect was observed, however, it was possible to observe some sublethal effects, such as the limestone skeleton apparent in practically all concentrations and replicas, but absent in controls, and the embrittlement and whitening of the skeleton at higher concentrations. The *T. coccinea* species was considered little sensitive to the tested substances. This resistance may indicate a greater capacity for proliferation of the species, being favored in substrates containing antifouling paints, to the detriment of native species.

Keywords: *Tubastraea coccinea*; Antifouling; DCOIT; Nanoencapsulation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	Organismo-teste	13
2.2	Amostragem	13
2.3	Compostos químicos	15
2.4	Exposição	17
2.5	Análises estatísticas	17
3	RESULTADOS	18
4	DISCUSSÃO.....	20
5	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS.....	24
	APÊNDICE A	27
	APÊNDICE B.....	28

1 INTRODUÇÃO

Estruturas artificiais submersas a longo prazo são vulneráveis ao fenômeno indesejado de bioincrustação marinha, representado pelo acúmulo de algas, cracas, mexilhões e outros organismos bentônicos (DOS SANTOS *et al.*, 2020; GABE; GUERREIRO; SANDRINI, 2021), podendo favorecer também a bioinvasão, como é o caso reportado para o coral-sol (*Tubastraea* spp.) no litoral brasileiro. O processo de bioinvasão resulta do transporte de organismos incrustados em embarcações, os quais se estabelecem em regiões que não seriam colonizadas por dispersão natural, e que comumente provocam impactos negativos, sejam eles ambientais, econômicos ou sociais. Em relação à indústria naval, o atrito causado pelo aumento da rugosidade do casco e do peso da embarcação, associados com a presença de organismos incrustantes, reduz a eficiência operacional e aumenta os custos do transporte marítimo, uma vez que exige maior potência do motor, maior frequência de manutenção do casco e o maior consumo de combustível, esse último resultando em um aumento nas emissões de gases do efeito estufa (ABREU *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2020; JESUS *et al.*, 2021).

Para mitigar, ou minimamente gerenciar a bioincrustação, tintas anti-incrustantes têm sido desenvolvidas englobando em sua composição a adição de biocidas químicos, sendo essas tintas usadas no revestimento de cascos de embarcações, plataformas de petróleo, dutos e outras estruturas submersas (ABREU *et al.*, 2020; FONSECA *et al.*, 2020). Contudo, esses biocidas estão sujeitos a lixiviação gradual a partir da superfície, e alguns podem ser persistentes no ambiente marinho e causar efeitos ambientais perigosos para organismos não alvo (WESTPHAL; FILLMANN, 2011; ABREU *et al.*, 2020; CASTRO; GABE; GUERREIRO; SANDRINI, 2021; JESUS *et al.*, 2021).

Os biocidas anti-incrustantes considerados de primeira geração, óxidos de cobre e zinco, foram os primeiros a serem utilizados em tintas, em meados do século XX, entretanto sua durabilidade e eficácia se restringia a apenas 1 ano após sua aplicação (FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007; CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011). Durante a segunda metade do século XX, tintas anti-incrustantes com biocidas à base de compostos organo-estânicos (segunda geração), principalmente o Tributil-Estanho (TBT), foram amplamente utilizadas, por conta da sua durabilidade e eficácia de até 7 anos contra diversas espécies incrustantes (OMAE, 2005; CASTRO; WESTPHAL;

FILLMANN, 2011; CAMPOS *et al.*, 2021). No entanto, problemas relacionados com as altas taxas de toxicidade em organismos não alvo, bioacumulação e a persistência no ambiente começaram a surgir e, em 2008, entrou em vigor, pela Organização Marítima Internacional (IMO, do inglês *International Maritime Organization*), a proibição em escala global do uso desses compostos em tintas anti-incrustantes, com o propósito de reduzir ou eliminar os efeitos nocivos ao meio ambiente marinho (apresentado em Londres, na Convenção AFS 2001, do inglês *International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships*) (GREAT BRITAIN, 2012).

A proibição favoreceu então a ascensão e o uso de biocidas de terceira geração, como Diuron, Irgarol 1051 e o 4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona, ou DCOIT (CHEN; LAN, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2020), e estes novos compostos anti-incrustantes deveriam cumprir três principais objetivos: a) dispor de rápida degradação; b) ser tóxico apenas para organismos-alvo; e c) dar origem a uma bioconcentração mínima (CIMA *et al.*, 2013). O DCOIT, também conhecido como *SeaNine*, foi reconhecido como uma possibilidade ambientalmente mais segura e foi autorizado para uso pela Agência Europeia das Substâncias Químicas (ECHA, do inglês *European Chemicals Agency*) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*), com fundamento em seu baixo nível de impacto ambiental (ABREU *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2020). O uso deste biocida foi indicado pois alguns trabalhos iniciais sugeriram menos danos ao meio ambiente, principalmente devido à sua rápida degradação (<24h em água salgada natural e <1h em sedimentos) (SHADE *et al.*, 1993; FONSECA *et al.*, 2020). Assim, o DCOIT tem sido reportado como um dos principais biocidas na formulação de tintas anti-incrustantes usadas em estruturas marítimas (ABREU *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

No entanto, pelo aumento da frequência de uso, Chen; Lam (2017) afirmam que o DCOIT tem sido constantemente identificado em todo o mundo em áreas de atividades portuárias, em níveis capazes de ocasionar efeitos tóxicos em organismos aquáticos não-alvos mesmo com sua meia-vida curta, dado que sua degradação depende de fatores ambientais, como temperatura e pH da água e luz solar. À vista disso, novas técnicas têm sido desenvolvidas como propósito de controlar a velocidade de liberação e reduzir os efeitos tóxicos deste biocida, como o encapsulamento em nanomateriais, capaz de reduzir a liberação do biocida na água, consequentemente reduzindo o nível de

impacto em espécies não alvo (JESUS *et al.*, 2021).

Nanomateriais anti-incrustantes têm sido desenvolvidos recentemente utilizando nanocápsulas mesoporosas de sílica (SiNC) (DOS SANTOS *et al.*, 2020). A tecnologia do encapsulamento traz a prevenção da interação direta do biocida com os componentes de revestimento e o controle de taxa de lixiviação, aumentando a vida útil do revestimento e reduzindo ameaças aos organismos não alvo (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Assim, foi desenvolvida uma nanoforma de DCOIT (SiNC-DCOIT) na qual o composto está encapsulado em nanocápsulas de sílica (Si). Uma outra forma foi desenvolvida visando incrementar o efeito sobre o biofilme, na qual a nanocápsula de Si foi impregnada com prata (Ag), tornando-se SiNC-DCOIT-Ag (JESUS *et al.*, 2021). Pesquisas científicas atuais (FIGUEIREDO *et al.*, 2019; FIGUEIREDO; LOUREIRO; MARTINS, 2020) compararam a eficácia da anti-incrustação e da toxicidade do DCOIT nas formas livre e encapsuladas (DOS SANTOS *et al.*, 2020) sobre organismos de ambiente temperado, e observaram que a toxicidade do DCOIT, quando encapsulado em SiNC, é reduzida em pelo menos 2 vezes, e na forma de SiNC-DCOIT-Ag, é reduzida em 5 vezes. O efeito da prata livre também foi reduzido em pelo menos uma ordem de magnitude em ambos os encapsulamentos SiNC-Ag e SiNC-DCOIT-Ag. Além disso, para onze espécies marinhas diferentes de ambiente temperado, foi demonstrado que SiNC-DCOIT-Ag pode efetivamente reduzir o nível tóxico e o perigo do biocida para as espécies, sem comprometer a eficácia do anti-incrustante (FIGUEIREDO *et al.*, 2019; FIGUEIREDO; LOUREIRO; MARTINS, 2020; JESUS *et al.*, 2021). Estes estudos sugeriram que o encapsulamento de DCOIT e Ag em SiNC aparenta ser uma opção benéfica e favorável ecologicamente em aditivos modernos de materiais anti-incrustantes, visando atenuar os impactos ambientais sem comprometer sua eficácia. Entretanto, há necessidade de realização de estudos com mais espécies, sobretudo aquelas de ambientes tropicais e subtropicais, já que as informações disponíveis se referem majoritariamente a espécies de ambientes temperados.

Típicos de ambientes tropicais, os corais são animais marinhos sésseis que possuem grande diversidade e importante função ecológica, uma vez que servem de alimento e abrigo para inúmeros organismos. Infelizmente, esses animais têm sido diretamente afetados por ações humanas e pressões ambientais que afetam o equilíbrio dos recifes de corais. O gênero *Tubastraea* compreende corais duros azooxantelados (CARPES *et al.*, 2020a), do qual as espécies *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis*, popularmente conhecidas como corais-sol, são frequentemente encontradas em

ambientes recifais, particularmente em recifes rochosos, na costa brasileira. Ambas as espécies são classificadas como exóticas e invasoras no Brasil, das quais colaboram para enfraquecer e danificar as espécies nativas, se disseminando rapidamente ao longo da costa brasileira, tendo sua distribuição conhecida do estado de Santa Catarina ao Ceará, além de serem consideradas competidoras-agressivas (SANTOS; RIBEIRO; CREED, 2013; PRECHT *et al.*, 2014). Por outro lado, como o uso de espécies nativas (muitas delas ameaçadas de extinção) em estudos ecotoxicológicos pode aumentar as ameaças a esses organismos, a utilização de espécies invasoras para os ensaios pode servir como alternativa para se estimar os riscos às espécies nativas. Isso é especialmente importante para os corais brasileiros, que se encontram ameaçados e com muitas espécies marinhas, no geral, enquadradas em alguma categoria de risco ambiental, devido a pesca excessiva e ilegal, a mineração, o turismo desordenado e as mudanças climáticas (PAN Corais, 2016). De acordo com o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Ambientes Coralíneos (PAN Corais), além dos corais, a conservação de espécies que utilizam o ambiente coralíneo ao longo do seu ciclo de vida para proteção, alimentação ou reprodução, são tão importantes quanto. Dessa forma, o PAN corais lista 52 espécies da fauna brasileira de diferentes grupos taxonômicos ameaçadas de extinção, estando 7 na categoria de ameaça “Criticamente em Perigo”, 5 como “Em Perigo” e 40 como “Vulnerável”, entre eles a raia-manta, tubarão-lixo, tubarão-galhudo, meros, budiões, cavalos marinhos, estrelas do mar, anêmona-gigante, coral-vela e coral-cérebro-da-Bahia.

Assim, para se estudar os efeitos de novas substâncias anti-incrustantes em ambientes tropicais brasileiros, a utilização do coral-sol (*T. coccinea*) tem-se mostrado uma estratégia interessante, já que sua coleta e uso em bioensaios não causam impactos sobre os ambientes recifais nacionais, sendo, inclusive, estimulada a sua remoção desses locais. Como exemplo do uso de *T. coccinea*, Fukushima (2022) realizou um estudo preliminar para avaliar a toxicidade aguda e os efeitos biológicos adversos de frações solúveis de óleo, provindo do derramamento ocorrido na região Nordeste do Brasil, em 2019. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade e efeitos de letalidade do biocida anti-incrustante DCOIT e suas versões nanoencapsuladas em organismos de *T. coccinea* e observar a ocorrência de efeitos letais e sub letais aos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Organismo-teste

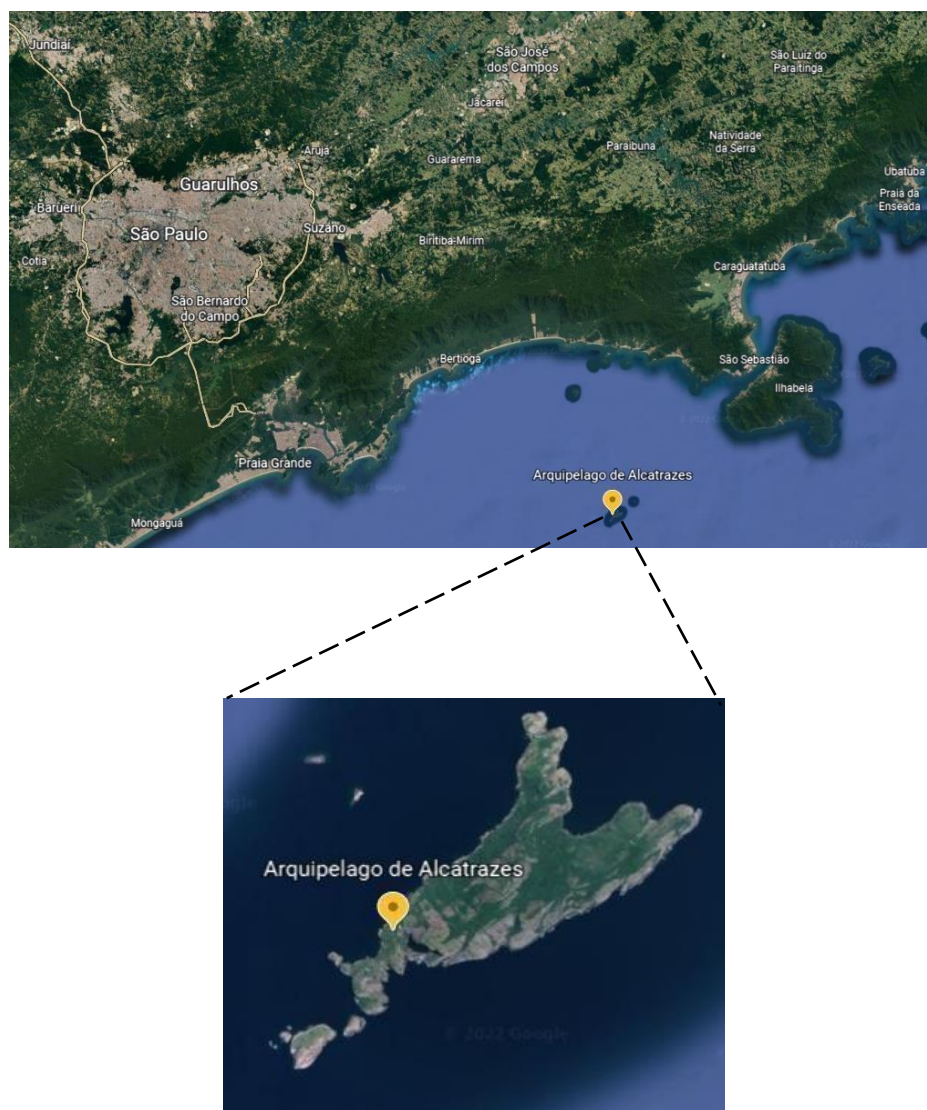
A espécie *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829, popularmente conhecida como coral-sol, é um coral da ordem Scleractinia, azooxantelado e hermafrodita, ou seja, uma mesma colônia produz gametas femininos e masculinos (DE PAULA; CREED, 2004; PRECHT *et al.*, 2014). Esta espécie é invasora no Brasil, registrada pela primeira vez na década de 1980, incrustada em plataformas de petróleo. Hoje, as duas espécies - *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* - são comumente observadas em ambientes naturais do litoral brasileiro e em estruturas artificiais, como boias, píeres, plataformas de gás e petróleo e em cascos de navios (CREED *et al.*, 2017). Sua distribuição atinge mais de 3.500 km da costa brasileira, nos litorais de Santa Catarina, São Paulo, Espírito Santo e Bahia (CREED *et al.*, 2017), Pernambuco, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará (BRAGA *et al.*, 2021), além de outras localidades no mundo, como Caribe e Golfo do México (CREED *et al.*, 2017).

Diversos autores relatam razões importantes para a rápida invasão e disseminação de *T. coccinea*: a. alta capacidade reprodutiva pode acelerar o deslocamento de espécies nativas que possuem taxa reprodutiva inferior (DE PAULA; DE OLIVEIRA PIRES; CREED, 2014); b. ocorrência de múltiplos eventos de invasões (CAPEL *et al.*, 2017, 2019); c. maturidade reprodutiva precoce (GLYNN *et al.*, 2008); d. crescimento rápido e alta taxa de recrutamento (COSTA *et al.*, 2014); e. notável capacidade regenerativa (CREED *et al.*, 2017).

2.2 Amostragem

Aproximadamente 250 colônias de *T. coccinea* foram coletadas no Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes, SP, Brasil (Figura 1), no dia 17 de novembro de 2021. As coletas foram realizadas por meio do mergulho autônomo e com o uso de talhadeira e marreta. A coleta foi realizada por pesquisadores do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP) durante operações de remoção do coral-sol realizadas pelos órgãos gestores (ICMBio). As coletas foram autorizadas a partir da Licença SISBIO nº 79823-1.

Figura 1. Mapa do ponto de coleta no Arquipélago de Alcatrazes, São Paulo.



Fonte: Google Earth (2022).

As colônias foram mantidas, primeiramente, na base do CEBIMar-USP, com fluxo constante de água do mar e, em seguida transportadas para o laboratório do Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA), localizado no Campus Litoral Paulista da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (São Vicente, SP). Os animais foram acondicionados em caixas de 60L transparentes para período de aclimação antes dos experimentos (Figura 2), sendo feita a troca parcial da água do mar para água do mar reconstituída. Em laboratório, os organismos permaneceram sob aeração contínua e iluminação em fotoperíodo natural (12h claro / 12h escuro) durante 5 dias e temperatura de aproximadamente $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 2. Colônias de *T. coccinea* em aclimação antes do experimento



Fonte: própria (2022).

2.3 Compostos químicos

No presente estudo, quatro compostos químicos foram testados: a) biocidas DCOIT e SiNC, obtidos a partir da empresa *Sigma-Aldrich* (São Paulo, Brasil) e b) nanomateriais de SiNC impregnados com um ou dois biocidas (SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag), fornecidos pela empresa *Smallmatek Lda* (Aveiro, Portugal). Essa empresa, em parceria com a Universidade de Aveiro, está desenvolvendo diversos nanomateriais, incluindo os utilizados no presente estudo, visando lançá-los no mercado industrial como tintas anti-incrustantes de melhor desempenho ambiental e maior efetividade na inibição da bioincrustação.

As concentrações usadas no ensaio foram preparadas a partir dos compostos pesados em balança de precisão analítica e diluídas em água do mar reconstituída imediatamente antes do início do experimento. Primeiramente, soluções-estoque foram preparadas para cada substância, a partir da diluição em água deionizada. Em seguida, as soluções-estoque foram sonicadas por 15 minutos, e feitas diluições seriadas em água do mar reconstituída, nas concentrações-teste, conforme indicado a seguir.

Os animais foram expostos às seguintes concentrações: 3,33, 10, 33 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DCOIT livre; 500, 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o SiNC; e 74,1, 222,2, 666,7 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o SiNC-DCOIT e SiNC-DCOIT-Ag (Tabela 1), além dos controles negativos (água do mar reconstituída da marca *Red Sea®*). Estas faixas de concentrações foram escolhidas baseadas em dados de estudos ecotoxicológicos anteriores para espécies marinhas de ambiente temperado (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

Tabela 1. Concentrações das substâncias utilizadas.

Substância	Concentrações
DCOIT	3,33µg/L
	10µg/L
	33µg/L
	100µg/L
SiNC	500µg/L
	1000µg/L
	2000µg/L
	4000µg/L
SiNC-DCOIT	74,1µg/L
	222,2µg/L
	666,7µg/L
	2000µg/L
SiNC-DCOIT-Ag	74,1µg/L
	222,2µg/L
	666,7µg/L
	2000µg/L

Fonte: Dados da pesquisa – própria (2022).

2.4 Exposição

A água do mar reconstituída foi preparada em baldes de 10L com água doce, dissolvendo 350 g de sal marinho em cada balde para atingir a salinidade ideal de 35 ± 1 , medida com o auxílio de um refratômetro e mantendo em aeração constante por no mínimo 30 minutos para eliminar o Cloro residual, que poderia interferir negativamente sobre a saúde dos corais.

Os testes de exposição foram realizados durante 96 h, em uma temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo natural (12h claro, 12h escuro). Colônias de coral-sol foram individualmente e aleatoriamente acondicionadas em frascos transparentes (500mL) de vidro com tampa, completados com 400mL das soluções teste e água do mar reconstituída para o controle. Os experimentos foram mantidos sob aeração constante individual. Foram preparadas três réplicas de cada concentração, sendo quatro concentrações diferentes para cada uma das quatro substâncias, além dos três controles negativos, totalizando 51 colônias e testes/frascos. Parâmetros físico-químicos, como Oxigênio Dissolvido (OD), potencial Hidrogeniônico (pH) e temperatura ($T^{\circ}\text{C}$) foram medidos após a montagem do experimento (início) e antes da desmontagem (final). Após as 96 h de exposição, as colônias foram observadas para a contagem do número de pólipos mortos e também aqueles que sofreram alguma possível alteração do seu estado inicial, como fragilização ou exposição do esqueleto calcário.

2.5 Análises Estatísticas

As análises de estimativa da concentração letal média (CL50) foram calculadas por meio do *Software GraphPad Prism, Inc.*, através de um modelo de regressão não linear com intervalo de confiança a 95%.

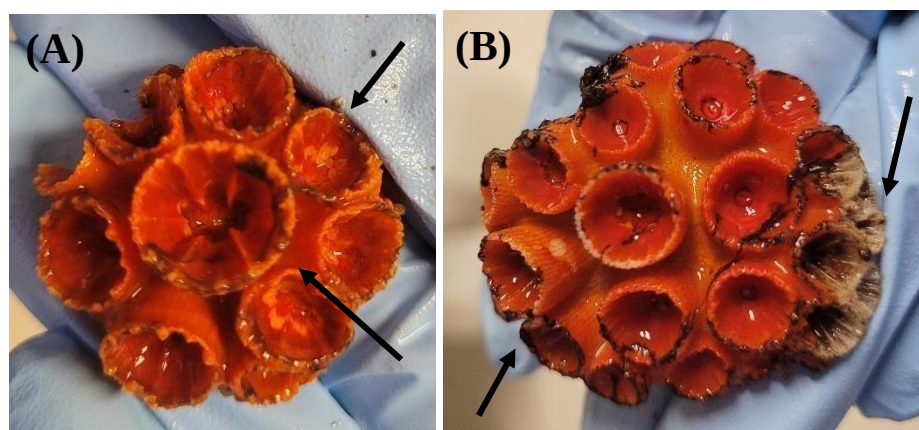
Dados de normalidade e homocedasticidade foram verificados usando o Teste de Shapiro-Wilks e o Teste de Bartlett, respectivamente. Diferenças entre os controles e cada tratamento foram verificadas por meio da análise de variância ANOVA ($p < 0.05$), seguida do Teste Post Hoc de Dunnett, indicando a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observada (CEO).

3 RESULTADOS

Os ensaios apresentaram 100% de sobrevivência dos organismos para o tratamento controle e para a maioria das diluições, sendo observados entre 1-5 pólipos esbranquiçados em apenas duas das concentrações, isto é, SiNC em 4000 μ g/L e SiNC-DCOIT-Ag em 2000 μ g/L. Sendo assim, para mortalidade não foi possível calcular CL50 e CEO-CENO para nenhum dos poluentes testados, assim como não houve efeitos letais significativos em nenhuma concentração.

Efeitos subletais como a perda de tecido com a exposição aparente do esqueleto calcário na porção septal de alguns pólipos foram observados em praticamente todas as concentrações e réplicas, porém foram ausentes nos controles, e pode ser explicado pelo estresse gerado durante a aclimação e/ou experimento. Outro efeito subletal observado exclusivamente nos organismos expostos às substâncias foi a fragilidade do esqueleto ao final do experimento nas concentrações mais altas, quando foram observadas algumas colônias com pólipos quebrados nas bordas e, também, esbranquiçados, sendo considerados mortos (Figura 3). Contudo, nenhum dos resultados indicou diferenças significativas.

Figura 3. Efeitos observados ao final do experimento. (A) - Pólipos quebrados e perda tecidual na concentração 100 μ g/L de DCOIT; (B) - Pólipos com presença de algas e esbranquiçados na concentração 2000 μ g/L de SiNC-DCOIT-Ag.



Fonte: própria (2022).

Em relação aos efeitos subletais, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e os controles, no entanto, quando os dados são comparados de forma qualitativa, nota-se algumas tendências. Foi possível observar que os efeitos subletais de pólipos quebrados e/ou mortos ocorreram apenas nas concentrações consideradas mais altas das substâncias, ou seja, 100 μ g/L para DCOIT,

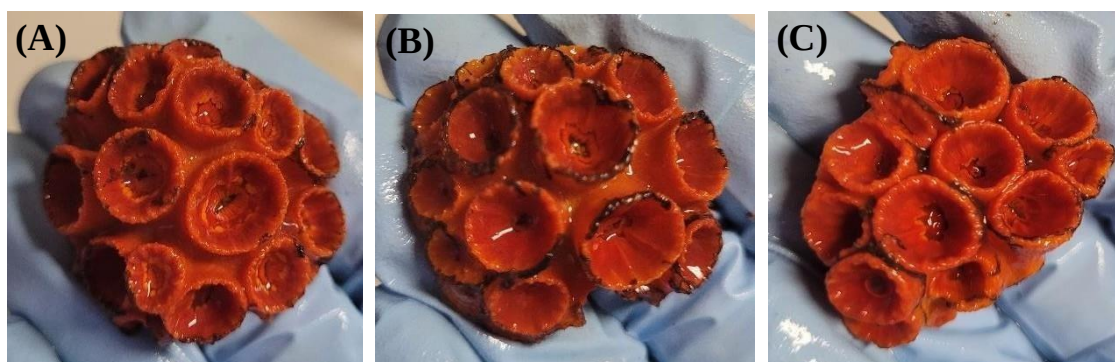
4000µg/L para SiNC, 666,7µg/L para SiNC-DCOIT e 2000µg/L para SiNC-DCOIT-Ag (Tabela 2). Os dados brutos para todas as réplicas, assim como a presença/ausência de algas nas bordas resultantes de estresse, podem ser observados no Apêndice B (Apêndices).

Tabela 2. Efeitos letais e subletais observados, por concentração.

Tratamentos	Concentrações	Perda tecidual (% do total de colônias/réplica)	Pólipo quebrado (quant.)	Pólipo morto (quant.)
Controle 1	0	*	0	0
Controle 2	0	*	0	0
Controle 3	0	*	0	0
DCOIT	3,33µg/L	100%	0	0
	10µg/L	66%	0	0
	33µg/L	100%	0	0
	100µg/L	66%	2	0
SiNC	500µg/L	66%	0	0
	1000µg/L	33%	1	0
	2000µg/L	33%	0	0
	4000µg/L	33%	2	1
SiNC-DCOIT	74,1µg/L	100%	0	0
	222,2µg/L	100%	0	0
	666,7µg/L	33%	3	0
	2000µg/L	33%	0	0
SiNC-DCOIT-Ag	74,1µg/L	100%	0	0
	222,2µg/L	66%	1	0
	666,7µg/L	66%	0	0
	2000µg/L	100%	2	5

* Para o Controle 1 e 2, as imagens sugerem que houve um começo da perda tecidual em alguns pólipos, mas não significativo para toda colônia. Para o Controle 3, toda a colônia aparenta estar saudável, sem nenhum efeito observado (Figura 4). Fonte: própria (2022).

Figura 4. Efeitos observados para o tratamento controle ao final do experimento. (A) - Controle 1; (B) - Controle 2; (C) - Controle 3.



Fonte: própria (2022).

Os parâmetros físico-químicos dos ensaios, aleatoriamente medidos em uma réplica para cada concentração, no início e final do experimento, podem ser observados no Apêndice A (Apêndices). Ao final, foi observado um padrão de aumento do pH e do oxigênio dissolvido, comparando-se ao início do experimento, mas ainda assim apresentaram-se dentro dos limites e faixa de tolerância aceitáveis para a espécie (BROCKINTON *et al.*, 2022).

4 DISCUSSÃO

Considerando a rápida degradação do DCOIT, tornando-se pouco tóxico, era esperado neste estudo uma baixa ou nenhuma mortalidade, mesmo que as concentrações sejam consideradas altas, uma vez que estão em níveis da ordem de microgramas por litro a miligramas por litro. Indícios de efeitos subletais foram, no geral, observados em concentrações mais altas, como SiNC livre (4000µg/L), SiNC-DCOIT (666,7µg/L) e SiNC-DCOIT-Ag (2000µg/L), porém, alguns dos efeitos subletais foram observados em concentrações mais baixas para o DCOIT livre (100µg/L). As substâncias testadas no presente estudo deveriam inibir e intoxicar organismos incrustantes, como o coral-sol e, portanto, podem não ser totalmente efetivas contra essa espécie, ao menos para indivíduos adultos.

Os resultados obtidos neste experimento sugerem um padrão relativamente similar ao reportado cientificamente para outras espécies marinhas. Além disso, sugerem que a espécie *Tubastraea coccinea*, como suspeitado, é tolerante a poluentes e aos biocidas testados que são utilizados em tintas anti-incrustantes, uma vez que não foi observado letalidade em nenhum tratamento. A presença dos efeitos subletais, mesmo

que mínimos, após 96h de exposição, sugerem a possibilidade dessas substâncias causarem efeitos significativos em períodos mais longos de exposição, o que requer novos estudos. Diversas pesquisas têm indicado que o nanoencapsulamento se mostra uma estratégia ecologicamente correta para desenvolver e utilizar compostos anti-incrustantes inovadores, reduzindo o risco ambiental sem comprometer sua eficácia. Por exemplo, os estudos pioneiros de Figueiredo *et al.* (2017; 2019) com DCOIT demonstraram que o biocida encapsulado em nanocápsulas de sílica (SiNC-DCOIT) reduz a toxicidade do DCOIT para praticamente todas as espécies testadas. Os autores também mostraram que o SiNC livre foi menos tóxico do que as formas nanoencapsuladas e, o DCOIT encapsulado com sílica e prata (SiNC-DCOIT-Ag) apresentou-se menos tóxico do que a forma livre, sugerindo uma lenta liberação dos compostos com ação biocida (DCOIT e Ag). O SiNC-DCOIT-Ag foi então considerado pelos autores um candidato promissor para diminuir o impacto ambiental de biocidas de terceira geração atualmente usados, sem comprometer sua eficácia anti-incrustante (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Em relação à eficácia, ainda nos estudos de Figueiredo *et al.* (2017; 2019), SiNC-DCOIT-Ag e SiNC-DCOIT foram os dois biocidas que demonstraram ter maior eficácia como anti-incrustante para os organismos testados. Ainda comprovando sobre eficácia, Dos Santos *et al.* (2020) demonstraram, pela primeira vez, que no estágio de pré assentamento do mexilhão (*Perna perna*), o SiNC-DCOIT apresentou uma melhor eficácia anti-incrustante quando comparado com a forma livre do DCOIT.

Como demonstrado acima, diversas espécies marinhas de ambiente temperado já foram testadas e são seriamente afetadas por poluentes, inclusive os compostos usados neste estudo. No entanto, diferentemente das espécies estudadas até o momento, o coral-sol faz jus às características de espécie invasora, sendo tolerante a agentes geralmente estressores para outras espécies marinhas, como os biocidas das tintas anti-incrustantes testados nesta investigação. Biocidas anti-incrustantes frequentemente estão presentes nas superfícies de embarcações ou plataformas artificiais inseridas no oceano, e que são justamente utilizadas como sistemas de proteção, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes. É possível que essa resistência facilite o estabelecimento do coral-sol em substratos artificiais, contribuindo para de *T. coccinea* se dispersar e colonizar novos locais. No entanto, novos estudos devem ser realizados com a espécie, especialmente com esporos e formas larvais, visando avaliar em detalhe como a espécie é afetada por poluentes e se a

presença de contaminantes de fato exerce um fator positivo para sua dispersão no ambiente marinho e colabora com a introdução não intencional de espécies exóticas em ambientes aquáticos.

Como apontado, os organismos marinhos podem ser vulneráveis aos biocidas anti-incrustantes, sendo recomendada a substituição por alternativas ecologicamente corretas, como o nanoencapsulamento (CAMPOS *et al.*, 2021). Apesar disso, além da preocupação com as embarcações e plataformas já instaladas, também se faz importante as avaliações de análises de riscos e estudos ambientais rigorosos antes das instalações de novas plataformas e ao descomissionamento de plataformas desativadas, por exemplo. Braga *et al.* (2021), apontam que o abandono das plataformas fixas de aço desativadas no estado do Ceará – ao invés da retirada com protocolos ecologicamente corretos – pode acarretar na expansão da bioinvasão de *Tubastraea spp.* para a costa norte do litoral brasileiro.

5 CONCLUSÃO

Como observado, o DCOIT nas formas livre e nanoestruturadas, não causaram efeitos letais significativos sobre o coral sol, mesmo em altas concentrações. Em relação aos *endpoints* subletais, também não houve efeitos significativos, embora nas concentrações mais altas algumas colônias tenham exibido efeitos adversos após 96h de exposição. Deste modo, a espécie parece ser tolerante aos biocidas testados, ao menos em exposições de curto prazo, o que pode conferir uma maior capacidade de dispersão a partir de estruturas submersas, incluindo aquelas revestidas com tintas anti-incrustantes.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. E. L. et al. Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port? **Journal of Hazardous Materials**, v. 398, 5 nov. 2020.
- BRAGA, M. D. A. et al. Retirement risks: Invasive coral on old oil platform on the Brazilian equatorial continental shelf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, apr. 2021.
- BROCKINTON, E. E. et al. Importance of Antropogenic Determinants of *Tubastraea coccinea* Invasion in the Northern Gulf of Mexico. **Water**, v. 14, n. 1365, 22 apr. 2022.
- CAMPOS, B. G. et al. Occurrence, effects and environmental risk of antifouling biocides (EU PT21): Are marine ecosystems threatened?. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. 20 apr. 2021.
- CAPEL, K. C. C. et al. Clone wars: Asexual reproduction dominates in the invasive range of *Tubastraea spp.* (Anthozoa: Scleractinia) in the South-Atlantic Ocean. **PeerJ**, v. 2017, n. 10, 2017.
- CAPEL, K. C. C. et al. Multiple introductions and secondary dispersion of *Tubastraea spp.* in the Southwestern Atlantic. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- CARPES, R. DE M. et al. Mutagenic, genotoxic and cytotoxic studies of invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 373–387, 1 mar. 2020a.
- CARPES, R. DE M. et al. Anti-inflammatory potential of invasive sun corals (Scleractinia: *Tubastraea spp.*) from Brazil: alternative use for management? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 633–647, 1 abr. 2020b.
- CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 1abr. 2011.
- CHAN, I. et al. Comparison of metal accumulation in the azooxanthellate scleractinian coral (*Tubastraea coccinea*) from different polluted environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 648–658, 30 ago. 2014.
- CHEN, L.; LAM, J. C. W. SeaNine 211 as antifouling biocide: A coastal pollutant of emerging concern. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 61, p. 68–79, 1 nov. 2017.
- CIMA, F. et al. 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**, v. 83, p. 16–22, fev. 2013.

COSTA, T. J. F. et al. Expansion of an invasive coral species over Abrolhos Bank, Southwestern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 252–253, 15 ago. 2014.

CREED, J. C. et al. The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions**, v. 19, p. 283–305, jan. 2017.

DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: a case of accidental introduction. **Bulletin of Marine Science**, v. 74, n. 1, p. 175–183, 1 jan. 2004.

DE PAULA, A. F.; DE OLIVEIRA PIRES, D.; CREED, J. C. Reproductive strategies of two invasive sun corals (*Tubastraea spp.*) in the southwestern Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 94, n. 3, p. 481–492, 2014.

DOS SANTOS, J. V. N. et al. Can encapsulation of the biocide DCOIT affect the anti-fouling efficacy and toxicity on tropical bivalves? **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 23, p. 1–12, 1 dez. 2020.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO F. M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal of Environment and Health**, v. 1, n. 3, p. 427–448, 2007.

FIGUEIREDO, J. et al. Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions to marine species. **Environmental Science: Nano**, v. 6, n. 5, p. 1418–1429, 2019.

FIGUEIREDO, J.; LOUREIRO, S.; MARTINS, R. Hazard of novel anti-fouling nanomaterials and biocides DCOIT and silver to marine organisms. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 6, p. 1670–1680, 1 jun. 2020.

FONSECA, V. B. et al. Effects of DCOIT (4,5-dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one) to the haemocytes of mussels *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 232, 1 jun. 2020.

FUKUSHIMA, L. M. **Coral-Sol um invasor resistente: Avaliação da toxicidade aguda de contaminantes associados às atividades petrolíferas e petroquímica sobre a espécie *Tubastraea coccínea***. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em Biologia Marinha) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Litoral Paulista, 2022.

GABE, H. B.; GUERREIRO, A. DA S.; SANDRINI, J. Z. Molecular and biochemical effects of the antifouling DCOIT in the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 239, 1 jan. 2021.

GLYNN, P. W. et al. Reproductive ecology of the azooxanthellate coral *Tubastraea coccínea* in the Equatorial Eastern Pacific: Part V. Dendrophylliidae. **Marine Biology**, v. 153, n. 4, p. 529–544, 2008.

GREAT BRITAIN. Parliament. **International Convention on the control of harmful anti-fouling system on ships**, 2001: London, 5 October 2001. London: The Stationery Office, 2012. (Treaty Series, v. 13).

JESUS, É. P. S. DE et al. Acute and chronic effects of innovative antifouling nanostructured biocides on a tropical marine microcrustacean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 164, 1 mar. 2021.

LUZ, B. L. P. et al. Life-history traits of *Tubastraea coccinea*: Reproduction, development, and larval competence. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 13, p. 6223–6238, 1 jul. 2020a.

OMAE, I. General aspects of natural products antifoulants in the environment. In: Konstantinou, I.K. (eds) **Antifouling Paint Biocides**. Springer, Berlin, v. 50, p. 227–262. 22 dec. 2005.

PAN CORAIS. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Ambientes Coralíneos. 2016. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/plano-de-acao-nacional-lista/3620-plano-de%02acao-nacional-paraconservacao-dos-recifes-de-corais>. Acesso em: 5 mai. 2022.

PRECHT, W. F. et al. The Invasive coral *Tubastraea coccinea* (Lesson, 1829): Implications for natural habitats in the Gulf of Mexico and the Florida Keys. **Gulf of Mexico Science**, v.32, n. 1–2, p. 55–59, 2014.

SANTOS, L. A. H. DOS; RIBEIRO, F. V.; CREED, J. C. Antagonism between invasive pest corals *Tubastraea spp.* and the native reef-builder *Mussismilia hispida* in the southwest Atlantic. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 449, p. 69–76, nov. 2013.

SHADE, W. D. et al. Ecological risk assessment of a novel marine antifoulant. **American Society for Testing and Materials**, v. 2, p. 381–408. 1993.

**APÊNDICE A - Parâmetros físico-químicos medidos no início e final do experimento,
em réplicas escolhidas aleatoriamente.**

Tratamento	Concentração (µg/L)	Réplica (n°)	pH		T (°C)		OD (%)	
			inicial	final	inicial	final	inicial	final
Controle	-	1	7,79	7,90	23,5	23,2	79,7	88,7
	-	2	7,79	7,97	23,5	23,2	80,1	87,8
	-	3	7,74	7,89	23,5	23,2	79,3	87,0
DCOIT	3,33	1	7,66	7,96	23,7	22,7	83,3	89,2
	10	1	7,56	7,82	23,7	23,1	77,9	93,4
	33	3	7,57	7,69	23,8	22,8	83,8	94,3
	100	3	7,65	7,99	24,0	23,2	80,1	97,6
SiNC	500	1	7,92	7,97	24,4	23,8	91,7	97,5
	1000	1	7,94	8,01	23,5	23,2	83,8	94,4
	2000	2	7,97	8,03	24,1	23,3	89,6	94,4
	4000	1	7,82	7,98	24,2	23,3	83,9	91,9
SiNC-DCOIT	74,1	1	7,61	7,90	23,9	23,8	75,5	86,1
	222,2	2	7,83	7,85	23,4	23,6	81,1	88,0
	666,7	1	7,76	7,89	24,1	23,7	83,5	83,8
	2000	1	7,88	7,98	23,6	23,8	84,5	92,6
SiNC-DCOIT-Ag	74,1	1	7,86	7,99	23,3	23,5	87,7	88,4
	222,2	3	7,88	7,99	23,3	23,3	82,0	87,4
	666,7	2	7,81	8,02	23,4	23,5	81,9	89,1
	2000	3	7,88	7,99	23,4	23,4	85,5	88,7

APÊNDICE B - Dados brutos para todas as réplicas do experimento.

Tratamento	Concentração	Réplica	Total de pólipos	Perda tecidual /pólipos (quant.)	Algas nas bordas Presente/ Ausente
	(µg/L)	(n°)	(n°)		
Controle	-	1	19	3	Ausente
	-	2	17	6	Presente
	-	3	14	0	Presente
DCOIT	3,33	1	14	1	Ausente
		2	17	7	Presente
		3	15	3	Presente
	10	1	13	6	Presente
		2	15	3	Presente
		3	16	6	Ausente
	33	1	13	2	Ausente
		2	12	3	Presente
		3	12	5	Presente
	100	1	13	3	Presente
		2	20	3	Ausente
		3	11	5	Presente
SiNC	500	1	8	0	Ausente
		2	17	0	Ausente
		3	12	0	Ausente
	1000	1	9	0	Ausente
		2	12	0	Ausente
		3	13	0	Ausente
	2000	1	10	0	Ausente
		2	7	0	Ausente
		3	11	0	Ausente
	4000	1	11	0	Ausente
		2	14	0	Ausente
		3	12	0	Ausente
SiNC-DCOIT	74,1	1	13	2	Presente
		2	18	3	Presente
		3	15	3	Ausente
	222,2	1	15	7	Presente
		2	15	8	Presente
		3	11	6	Presente
	666,7	1	10	2	Ausente
		2	12	0	Ausente
		3	11	0	Ausente
	2000	1	9	0	Ausente
		2	8	0	Ausente
		3	10	1	Ausente
SiNC-DCOIT-Ag	74,1	1	16	4	Presente
		2	19	8	Presente
		3	21	6	Presente
	222,2	1	15	6	Presente
		2	13	8	Presente
		3	14	1	Ausente

666,7	1	19	7	Presente
	2	12	3	Presente
	3	20	5	Ausente
2000	1	17	5	Ausente
	2	20	20	Presente
	3	20	18	Presente
