



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP)



Avaliação da toxicidade de misturas: Irgarol e contaminantes ambientais comumente observados em áreas costeiras

Guacira de Figueiredo Eufrasio Pauly

São Vicente

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP)



"Júlio de Mesquita Filho"

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**Avaliação da toxicidade de misturas: Irgarol e contaminantes
ambientais comumente observados em áreas costeiras**

Guacira de Figueiredo Eufrazio Pauly

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Câmpus do
Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade Aquática.

São Vicente

2018

574.5222 Pauly, Guacira de Figueiredo Eufrazio

P286

Avaliação da toxicidade de misturas: Irgarol e contaminantes ambientais comumente observados em áreas costeiras. Guacira de Figueiredo Eufrazio Pauly - São Vicente, 2018.

56 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Ecotoxicologia. 2. Toxicidade - Testes. 3. Água – Contaminação. 4. Poluentes. 5. Misturas (Química). I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP
Campus do Litoral Paulista

Sumário

Agradecimentos	1
Resumo:	3
Abstract:	4
1. Introdução	5
Capítulo 1 – Toxicidade dos compostos isolados.....	11
2. Objetivo	11
3. Materiais e métodos.....	11
3.1 Organismos-teste	11
3.2 Preparação dos reagentes e concentrações de exposição	12
3.3 Teste de toxicidade com náuplios de <i>Artemia</i> sp.	13
3.4 Teste de toxicidade com <i>Nitocra</i> sp.	14
3.5 Teste de toxicidade com embriões de <i>Echinometra lucunter</i>	14
3.6 Análises de CL50, CENO e CEO dos ensaios com as substâncias isoladas	15
3.7 Preparação dos reagentes para ensaios de sensibilidade	15
4. Resultados.....	16
4.1 Teste de sensibilidade com substância de referência.....	16
4.3 Ensaios de toxicidade	17
5. Discussão	24
6. Conclusão	26
Capítulo 2 – Toxicidade de misturas binárias de Irgarol-amônia e Irgarol-LAS	28
1. Objetivo	28
2. Materiais e métodos.....	28
3. Resultados e discussão	32
3.1 Parâmetros físico-químicos dos ensaios com misturas binárias.....	32
3.2 Toxicidade dos compostos isolados simultâneos às misturas as misturas binárias de Irgarol com amônia e Irgarol com LAS	33
3.3 Toxicidade das misturas binárias de Irgarol com amônia e Irgarol com LAS	33
Conclusão	37
Referências bibliográficas	38
Anexo 1	44
Anexo 2	45

Agradecimentos

Obrigada Deus por colocar em meu caminho pessoas tão queridas, desde o início. Foram muitas dificuldades, muitos momentos de desânimo e obstáculos, aparentemente invencíveis, mas muitos momentos de força, perseverança e clareza, sempre em companhias iluminadas.

Agradeço aos meus pais, pelo imenso amor e esforço em dar suporte às filhas para o que for preciso. Ao meu esposo e à minha filha, pelo amor infinito, vocês são a base de todo o meu incentivo. Às minhas irmãs, cunhada, compadres e aos meus sogros, que completam uma família maravilhosa!

Agradeço aos amigos da faculdade e seus laboratórios (lista imensa) por sempre compartilhar momentos que transformam a faculdade num ambiente agradável e descontraído! Aos funcionários (todos!!) e aos professores, por compartilhar ciência, sempre ao nosso lado! Obrigada!

Ao universo NEPEA! À Carol, Sinhá, Damata, Malária, Gabriela, Rabicó, Lu, Geléia, Ney, Ita, Lucas, Fefo, Paloma, TODOS! Obrigada pela disposição inigualável, mesmo quando de forma indireta, me dando muita força!

Em especial, agradeço meu orientador prof. Denis Abessa, que nunca deixou de acreditar em mim, por sempre abrir portas para os alunos, pelo respeito recíproco e por ser tão compreensivo e paciente. Obrigada pelos ensinamentos e por me aceitar em seu laboratório.

À equipe sempre solícita do laboratório da UNISANTA, à Lorena e Binho! À Meggie e ao Édipo do laboratório de ecotoxicologia da UFS, por ajudar nos momentos que precisei!

À CAPES, pelo financiamento do trabalho.

Aos amigos de fora da faculdade, à Mari pela amizade verdadeira e pela “carona” ao LAS! Ao Padre Zé Carlos, que parecia adivinhar as palavras que eu precisava ouvir.

À música. À internet. Ao planeta Terra e sua beleza!

“Conhecer, descobrir, revelar”
Flávio Venturini / Ronaldo Bastos

Resumo: Alguns contaminantes encontrados no ambiente costeiro incluem os princípios ativos de tintas anti-incrustantes, entre os quais se destaca o Irgarol. O Irgarol pode interagir com outros contaminantes comuns em áreas litorâneas antropizadas, tais como a amônia e os surfactantes, sendo que os efeitos dessas combinações são desconhecidos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade de misturas binárias do biocida Irgarol com amônia e surfactante Alquil. Benzeno Sulfonado Linear - LAS, além das toxicidades dessas substâncias isoladas. Essa avaliação foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, náuplios de *Artemia* sp., copépodo *Nitocra* sp. e embriões de ouriço do mar *Echinometra lucunter*, foram expostos às concentrações isoladas de Irgarol, amônia e LAS, para definição dos níveis tóxicos dessas substâncias às espécies testadas. Na segunda etapa, náuplios de *Artemia* sp. foram expostos a uma mistura binária de contaminantes (i.é. Irgarol + amônia; ou Irgarol + LAS) a fim de se avaliar se as toxicidades das misturas seguem o padrão aditivo, sinérgico ou antagônico. Os dados obtidos da primeira etapa dos testes realizados com náuplios de *Artemia* sp. expostos à amônia, LAS e Irgarol apresentaram CL_{50-48h} 122,85 mg/L, 21,21 mg/L, e 1,81 mg/L, respectivamente, e CEO de 100 mg/L, 81 mg/L e 10 mg/L, respectivamente. Para os testes realizados com os copépodos *Nitocra* sp., as respectivas CI_{50-7d} foram estimadas em 27,89 mg/L, 4,61 mg/L, e 0,13 mg/L, enquanto as CEO foram 100 mg/L, 8,1 mg/L, e 10 mg/L. A CE_{50-42h} obtida nos testes com embriões de *Echinometra lucunter* expostos à amônia foi de 0,32 mg/L, enquanto a CEO foi de 0,1 mg/L. Todas as concentrações de exposição ao LAS foram tóxicas para os embriões de *Echinometra lucunter*, e não foi observada toxicidade do Irgarol. Ambas as misturas binárias de Irgarol e amônia e Irgarol e LAS apresentaram melhor ajuste para o modelo IA (ação independente), com efeitos antagônicos e sinérgicos, respectivamente. As ferramentas utilizadas foram úteis para prever o padrão de respostas das misturas químicas sobre as espécies.

Palavras-chave: *Nitocra* sp., *Artemia* sp., *Echinometra lucunter*, sinergismo, antagonismo.

Abstract: Contaminants found in the coastal environment include antifouling biocides, such as the Irgarol, ammonia and surfactants, among others. Since they can occur together in the environment, they can interact with each other and the resulting toxicities of their combinations are unknown. The aim this work was to evaluate the toxicity of binary mixtures of Irgarol with ammonia and the surfactant Linear Alkyl-Benzene Sulfonate - LAS, as well as the toxicity these single substances. This investigation was made in two steps. In the first step, nauplii of *Artemia* sp., the marine organisms *Nitocra* sp. (Copepoda), and embryos of the sea urchin *Echinometra lucunter*, were exposed to concentrations of Irgarol, ammonia and LAS, in order to define the toxic levels of each chemical to marine species. In the second step, nauplii of *Artemia* sp. were exposed to binary mixtures of the contaminants (Irgarol + ammonia; or Irgarol + LAS) in order to evaluate if the toxicities of the mixtures follow additive, synergistic or antagonistic patterns. To nauplii *Artemia* sp. exposed to ammonia, LAS and Irgarol, the LC_{50-48h} values were 122.85 mg/L, 21.21 mg/L, and 1.81 mg/L, respectively, and the LOECs were 100 mg/L, 81 mg/L and 10 mg/L, respectively. The respective IC_{50-7d} obtained in the tests with the copepod *Nitocra* sp., were 27.89 mg/L, 4.61 mg/L and 0.13 mg/L, while the LOECs were 100 mg/L, 8.1 mg/L and 10 mg/L. For the *E. lucunter* embryos, the EC_{50-42h} of ammonia was 0.32 mg/L, while the LOEC was 0.1 mg/L. All the tested concentrations of LAS were toxic to the embryos of *E. lucunter*, where Irgarol did not caused toxicity to these organisms. Both binary mixtures of Irgarol and ammonia and Irgarol and LAS showed better fit to the model IA (Independent Action), with antagonistic and synergistic effects, respectively. The used tools were useful to predict the toxicities of chemical mixtures to marine tropical species.

Key-words: *Nitocra* sp., *Artemia* sp., *Echinometra lucunter*, synergism, antagonism.

1. Introdução

Desde a Revolução Industrial, no século XVIII, a urbanização, o avanço industrial e o desenvolvimento tecnológico e econômico propiciaram um grande crescimento populacional mundial e, conseqüentemente, o aumento do consumo de produtos industrializados (Bao & Fang, 2007; Sauvé & Desrosiers, 2014). As mudanças na estrutura da sociedade, atreladas ao crescimento urbano, industrial e populacional, trazem também problemas como esgotamento dos recursos naturais e geração de resíduos (Young et al., 1997), incluindo-se o descarte de substâncias no ambiente.

Atualmente, existem mais de 134 milhões de substâncias químicas no mundo, segundo a base de dados Chemical Abstract Services (CAS), onde mais de 50 novas substâncias, ou incorporações às substâncias existentes, são adicionadas a cada semana.

De uma forma geral, boa parte dos resíduos antropogênicos acaba sendo lançada nos ecossistemas aquáticos, como rios e oceanos (Seriani et al., 2006). Regiões costeiras de países do mundo todo sofrem inúmeros impactos ambientais associados às atividades antrópicas, tais como portos, indústrias, cidades e o turismo (Abessa et al., 2012). No Brasil, segundo dados de estimativa populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), a população brasileira é formada por mais de 208 milhões de pessoas, com 26,58% da população concentrada em municípios da zona costeira, onde as taxas percentuais de urbanização encontram-se acima de 60%, de modo que essas regiões concentram grande produção de esgotos domésticos e resíduos industriais.

Uma das principais fontes de contaminação dos oceanos e estuários, causada pela concentração dessas atividades antrópicas próximas à costa, são os esgotos domésticos e a drenagem urbana (Ambrozevicius & Abessa, 2008; Gubitoso et al., 2008). Ainda nesse contexto, o conteúdo dessas descargas é geralmente tóxico, uma vez que ocorre uma mistura de substâncias como produtos de limpeza doméstica e cuidados pessoais, fármacos, hidrocarbonetos, metais, matéria orgânica, entre outros (Lara-Martín et al., 2014; Abessa, 2002). Juntamente com os centros urbanos, as áreas portuárias são conhecidas por serem áreas multi-impactadas e hotspots de ocorrência de xenobióticos orgânicos e inorgânicos, tais como bisfenóis policlorados (PCBs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), resinas ácidas, biocidas, etc. (Ankley et al, 1990; Begliomini et al., 2017).

Os poluentes comumente liberados pela ação antropogênica nos ambientes costeiros geralmente são lançados na forma de misturas, podendo causar impactos ambientais em ecossistemas marinhos devido à ação conjugada dos compostos (Altenburger et al., 2004).

Abessa et al. (2005) observaram a presença simultânea de diversos contaminantes em sedimentos influenciados por efluentes urbanos, em regiões marinhas e estuarinas da Baía de Santos, na Baixada Santista - litoral central do estado de São Paulo, como amônia e surfactantes. Essa região também abriga o maior porto da América Latina, o porto de Santos, podendo ainda ocorrer nesse ambiente, compostos específicos como biocidas orgânicos anti-incrustantes (Abessa, 2002). A descarga de amônia, surfactantes e produtos resultantes da atividade portuária podem apresentar toxicidade para organismos marinhos (Abessa et al., 1998).

A amônia existe em equilíbrio químico entre a forma ionizada aquosa (NH_4^+) e não ionizada gasosa (NH_3) (Bower & Bidwell, 1978; Ip et al., 2001) e, apesar de ser uma substância que ocorre naturalmente nos sedimentos marinhos e estuarinos, uma vez que é um produto de processos de decomposição da matéria orgânica por microrganismos e excreção de invertebrados residentes, é uma substância que, entre outros efeitos, pode danificar brânquias e alterar o sistema ionoregulatório de crustáceos (Romano & Zeng, 2007), afetar a fecundidade de copépodos estuarinos (Araujo et al. 2013; Camargo et al., 2014) e o desenvolvimento larval de ouriço do mar (Abessa et al., 2012), e alterar o comportamento natatório de peixes, devido à interferência no metabolismo da respiração (Barbieri, 2007).

Outros estudos observaram que o ambiente costeiro sofre impactos negativos ao receber resíduos de atividades antrópicas através de efluentes industriais e domésticos e drenagem urbana, que contribuem com a entrada de amônia no ambiente, de modo a contribuir para o aumento da toxicidade (Camargo et al., 2014; Araujo et al., 2013; Anderson et al., 2007).

Já os surfactantes e tensoativos saneantes têm sido encontrados em ambientes aquáticos na região costeira de vários países do mundo, onde resíduos industriais e domésticos são lançados sem tratamento adequado (Lara-Martín et al., 2014; Stasinakis et al., 2008). Sua ação principal é facilitar a dissolução de gorduras, graxas e óleos em água, a partir do grupo hidrofóbico (apolar) da cauda da molécula, enquanto a extremidade hidrofílica permanece em contato com a água, formando micelas, as quais são mais facilmente arrastadas pela água (Barbieri et al., 2002; Mastroti, 1997). São utilizados em produtos de limpeza doméstica e industrial, como base para formulação de detergentes, produtos de limpeza, cosméticos, além de estarem presentes na produção de pesticidas, herbicidas, tintas, plásticos, indústria têxtil etc, representando um dos compostos mais difundidos no mundo (Mastroti et al., 1998).

Dentre os tensoativos aniônicos sintéticos, o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) é o mais comercializado no mundo, por ser biodegradável e efetivo como agente tensoativo (Mastroti, 1997). Sua composição é uma mistura de homólogos, cuja cadeia linear pode apresentar entre 10 e 13 carbonos, e um anel benzeno, o qual, de acordo com sua posição na cadeia, consiste em um isômero, e um grupo sulfonato (Diz et al., 2009). Atualmente sua produção representa 20% da produção mundial de detergentes, podendo ser detectado em concentrações entre 0,1 a 1000 µg/L em diversas regiões costeiras do planeta (Diz et al., 2009; Tan et al., 2010).

Alguns autores observaram que o LAS pode causar toxicidade em organismos marinhos, devido às alterações na permeabilidade da membrana plasmática e, assim como a amônia, alterações no comportamento natatório de peixes, do metabolismo e do consumo de oxigênio e comprometimento do desenvolvimento de larvas de equinodermas (Abessa et al., 2012; Barbieri, 2007; Barbieri et al., 2002).

Outros produtos que podem causar toxicidade aguda e crônica em organismos marinhos são compostos sintéticos biocidas, como por exemplo aqueles adicionados às tintas anti-incrustantes aplicadas em estruturas submersas ou que estão constantemente sob a influência da água do mar, como plataformas, dutos, revestimentos de navios, entre outros (Gatidou et al., 2004). A aplicação de produtos anti-incrustantes tem como objetivo prevenir a formação de biofilme, que favorece a colonização de algas e invertebrados, causando aumento do atrito dos cascos com a água, e do consumo de combustível, diminuindo a eficiência da navegação (Chambers et al., 2006; Gatidou et al., 2004). Geralmente, os princípios ativos dessas tintas incluem metais, como cobre e zinco, ou compostos orgânicos, capazes de intensificar o efeito preventivo contra a incrustação (Dafforn et al., 2011; Gatidou et al., 2004; Yebra et al., 2004).

A utilização das tintas anti-incrustantes é um método antigo na defesa contra as consequências geradas pela bioincrustação. As tintas anti-incrustantes de primeira geração surgiram na metade do século XX, e inicialmente usavam óxidos de cobre e zinco como substâncias ativas (Fernandez & Pinheiro, 2007; Godoi et al., 2003). Porém, essas tintas apresentaram pouca eficiência e, após a Segunda Guerra Mundial, a indústria naval obteve alguns avanços tecnológicos e implementou a comercialização de tintas de segunda geração, à base de produtos organoestânicos, as quais utilizavam como princípio ativo o tributilestanho (TBT) e/ou o trifenolestanho (TPhT) (Fent, 2003; Fernandez & Pinheiro, 2007). As tintas de segunda geração se mostraram extremamente eficientes e passaram a ser empregadas mundialmente (Almeida et al., 2007). Porém, o uso indiscriminado e a comprovação científica

da toxicidade desses compostos no ambiente aquático resultaram, ainda na década de 1980, no banimento da utilização de tintas à base de TBT e outros organoestânicos, pela Organização Marítima Internacional (International Maritime Organization – IMO) (Almeida et al., 2007; Konstantinou & Albanis, 2004).

Como consequência, diversos compostos químicos passaram a ser utilizados como princípios ativos de uma terceira geração de tintas anti-incrustantes (Konstantinou & Albanis, 2004; Evans, 2000). Muitos desses compostos são chamados de biocidas intensificadores (“booster”), quimicamente distintos, agindo de forma isolada ou combinada, utilizados para potencializar a ação anti-incrustante das tintas (Gallucci et al., 2015; Konstantinou & Albanis, 2004). Alguns estudos observaram a presença ambiental desses biocidas em regiões próximas às marinas, portos e áreas onde há fluxo de embarcação em diversos lugares do mundo como Grécia, Inglaterra, Estados Unidos, Japão e Brasil (Albanis et al., 2002; Evans et al., 2000; Gatidou et al., 2007; Diniz et al., 2014).

Um desses compostos biocidas comumente encontrado no ambiente marinho é o Irgarol (2-metiltio-4-terc-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina). O Irgarol é um herbicida moderadamente solúvel em água (7 mg/L), com coeficiente de partição (K_{ow}) de 3,95 e considerado persistente devido à taxa de degradação lenta, de 100 dias em água do mar e entre 100 a 200 dias em sedimento (Castro et al., 2011; Gatidou et al., 2007). Pode ser encontrado em concentrações relativamente baixas, com uma média global de 13 ng/L em água e 16 ng/g em sedimentos (Zhou, 2008). No Brasil pode ocorrer entre 0,01 e 4,8 µg/L em áreas onde há intenso tráfego marítimo (Diniz et al., 2014).

A ocorrência do Irgarol em ambientes marinhos e estuarinos pode provocar efeitos letais e subletais em vários grupos de organismos, inclusive afetar estrutura de comunidades (Evans et al., 2000; Thomas et al., 2000; Voulvoulis, et al., 2002; Gallucci et al., 2015). Além disso, pouco se conhece sobre os efeitos do Irgarol sobre a fauna marinha, tampouco as interações que o Irgarol pode causar quando combinado com outros contaminantes. Este fato é relevante, já que, em decorrência das diversas atividades antrópicas na zona costeira, inúmeros contaminantes costumam estar presentes nesses ambientes costeiros, de modo que nessas áreas os organismos podem estar expostos a uma variedade de compostos com diferentes potenciais tóxicos (Altenburger et al., 2004).

Conhecer a toxicidade de misturas de contaminantes pode fornecer informações para criar políticas de proteção ao ecossistema aquático, pois as legislações existentes tratam os contaminantes de forma isolada. A Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) que dispõe

sobre a classificação dos corpos d'água e estabelece as condições e padrão para o lançamento de efluentes, recomenda que as concentrações de surfactantes como LAS, em águas salgadas de classe tipo 1 seja de até 0,2 mg/L e para nitrogênio amoniacal total de até 0,4 mg/L. A Resolução CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011), que também estabelece padrões sobre disposição de efluentes, determina valores de até 20 mg/L de nitrogênio amoniacal. Nessas resoluções não há menção sobre limites de lançamento para o Irgarol. De todo modo, os padrões legais existentes referem-se apenas a substâncias isoladas, e não consideram a co-ocorrência e efeitos associados a ela.

Além das análises químicas, testes ecotoxicológicos que utilizam organismos nativos são ferramentas importantes para a identificação e quantificação dos potenciais efeitos tóxicos causados por substâncias químicas introduzidas nos ambientes marinhos. Dentre os organismos importantes para esses estudos, náuplios de *Artemia* sp., o copépodo bentônico *Nitocra* sp. e embriões de ouriço *Echinometra lucunter* são utilizados para avaliar efeitos agudos e crônicos causados pelas diversas substâncias químicas (Veiga & Vital, 2002; Lotufo & Abessa 2002; ABNT 15350/2006).

Modelos matemáticos podem descrever as interações dos contaminantes a partir do modo de ação (MoA) e da avaliação da toxicidade dos compostos isolados (Pérez et al., 2011). Os modelos de referência comumente utilizados são o modelo de Adição de Concentração (CA), baseado no conceito de que os químicos possuem o mesmo MoA (Loewe & Muischnek, 1926) e o modelo de Ação Independente (IA), que pressupõe que o MoA dos químicos são diferentes (BLISS, 1939). Ambos os modelos assumem efeito de aditividade, em que cada componente da mistura não interfere no modo de ação do outro (Hewlett & Plackett, 1959).

Os modelos podem ainda apresentar desvios da aditividade como sinergismo (efeito mais tóxico do que as toxicidades dos compostos isolados) ou antagonismo (efeito tóxico abaixo da toxicidade dos compostos isolados). A interação pode ainda apresentar desvios de nível dependente (*dose level dependency* – DL) quando o efeito em baixas concentrações é diferente dos efeitos com relação às altas concentrações na mistura; e os desvios de razão das doses (*dose ratio dependency* – DR) que descreve o efeito que depende da proporção dos compostos na mistura, onde um dos contaminantes é o principal responsável pelo desvio (Jonker et al., 2005; Pérez et al., 2011).

Poucos estudos consideram que os efeitos sobre o ecossistema marinho podem ocorrer pela exposição da mistura de contaminantes no ambiente e a maioria dos trabalhos científicos analisam os milhares de compostos disponíveis de forma isolada (Phyu et al., 2011). Há

necessidade de investigar os efeitos das misturas dos compostos no ambiente aquático para que possamos elucidar os impactos ambientais de forma mais realista.

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a toxicidade de compostos comuns em regiões costeiras antropizadas, amônia, LAS e Irgarol, sobre invertebrados marinhos, considerando tanto a exposição aos compostos isolados como combinados em misturas binárias (Irgarol + amônia; Irgarol + LAS). Para tal, foram avaliadas as toxicidades sobre náuplios de *Artemia* sp., reprodução do copépodo estuarino *Nitocra* sp. e desenvolvimento embrionário do ouriço *Echinometra lucunter*.

Capítulo 1 – Toxicidade dos compostos isolados

2. Objetivo

- Os objetivos específicos foram:

(i) Determinar a concentração de efeito observado (CEO) e efeito não observado (CENO) dos compostos isolados para náuplios de *Artemia* sp., cópodos *Nitocra* sp. e embriões de ouriço *E. lucunter*.

(ii) Comparar a toxicidade isolada das substâncias sobre cada espécie testada.

3. Materiais e métodos

3.1 Organismos-teste

Para a avaliação da toxicidade isolada dos compostos, foram realizados ensaios ecotoxicológicos com o branchiopoda *Artemia* sp., um microcrustáceo cosmopolita, de águas salgadas, bastante resistente às mudanças nos parâmetros físico-químicos da água, como salinidades entre 3,5 a mais de 70, além de tolerar níveis baixos de oxigênio entre 1 a 2 mg/L (Veiga & Vital, 2002). A facilidade de obtenção de seus cistos permite a utilização do organismo para testes de toxicidade com diversas substâncias químicas, podendo comparar com dados de diferentes organismos (Veiga & Vital, 2002).

A utilização do copépodo *Nitocra* sp. também permite a avaliação da toxicidade sobre um copépodo estuarino bentônico, bastante utilizado para avaliar efeitos crônicos causados por substâncias químicas, devido ao seu hábito de vida, sensibilidade às substâncias, ciclo de vida curto (aproximadamente 20 dias), facilidade de manuseio e cultivo em laboratório e baixo custo (Lotufo & Abessa, 2002).

Echinometra lucunter é uma espécie muito abundante em águas tropicais, de tamanho pequeno e alta taxa de recrutamento e reprodução. Há flexibilidade no transporte do local de coleta dos organismos adultos, para o laboratório e de fácil aclimação e facilidade de manuseio para obtenção dos gametas. Também é um modelo biológico robusto e sensível para avaliar os efeitos biológicos de contaminantes do ambiente marinho (ABNT 15350/2006; McClanahan & Muthiga, 2001).

3.2 Preparação dos reagentes e concentrações de exposição

Náuplios de *Artemia* sp., copépodos da espécie *Nitocra* sp. e embriões de ouriço *Echinometra lucunter* foram expostos isoladamente em diferentes concentrações nominais de Irgarol, amônia e LAS, a fim de se obter as respectivas concentrações efetivas a 50% dos organismos expostos (CE₅₀). Para náuplios de *Artemia* sp. foi estimada a concentração letal em 50% dos organismos testados em 48h de exposição (CL_{50-48h}). Para os copépodos *Nitocra* sp. foi estimada a concentração de inibição na taxa de reprodução dos organismos, durante 7 dias de exposição (CI_{50-7d}), e para os embriões de *Echinometra lucunter* foi estimada a concentração de efeito no desenvolvimento de 50% dos organismos expostos, durante 42h (CE_{50-42h}).

As faixas de concentração nominal de amônia e Irgarol foram determinadas com base na literatura, de acordo com concentração de efeito sobre náuplios de *Artemia* sp., copépodos estuarinos / marinhos e sobre o copépodo *Nitocra*, e sobre embriões de ouriço. Foram realizados ensaios preliminares com ampla variação de concentrações para as concentrações nominais de LAS, visando definir as faixas incluídas entre a ausência total de efeito e 100% de efeito. Após a definição desses intervalos, foram estabelecidas as os intervalos finais das concentrações de cada substância, buscando valores próximos aos níveis encontrado no ambiente. As concentrações diferiram entre si por um fator de 10 (i.e. log₁₀) (Zagatto & Bertoletti, 2006). Todas as soluções e concentrações nominais foram preparadas em água do mar filtrada, com salinidade adequada para a espécie testada.

Para os ensaios ecotoxicológicos realizados com amônia, foi utilizado cloreto de amônia, adquirido do laboratório Dinâmica (CAS 12125-02-9). Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de 20.000 mg/L em água deionizada para os ensaios com *Artemia* sp., seguida da preparação das concentrações nominais de 1; 10; 100; 1000; 10000 mg/L, conforme Chen et al. (1989). Para os ensaios com *Nitocra* e *E. lucunter*, foi preparada uma solução estoque de 1000 mg/L em água do mar filtrada, e das concentrações nominais de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg/L, de acordo com Sousa et al. (2012) que observaram CL_{50-96h} de 1,7 mg/L de amônia não ionizada e Alessandra et al. (2003) que observaram CE_{50-72h} de 4,2 mg/L de amônia para embriões do ouriço *Paracentrotus lividus*.

O Linear Alquilbenzno Sulfonato (LAS) 90% é um líquido viscoso de coloração castanha, com 90% de matéria ativa aniônica e mais ácido sulfúrico livre, água e matéria orgânica não sulfonada. Possui composição química declarada de ácido alquil sulfônico 90% mais ácido sulfúrico de até 7,50%, com cadeia linear de 10 a 13 carbonos. O produto usado

nesta pesquisa foi adquirido do laboratório TEBRÁS – Tensoativos do Brasil (CAS 85536-14-7). As concentrações nominais de exposição foram preparadas a partir do composto padrão, para todas as espécies, sendo usadas as concentrações nominais de 0,081; 0,81; 8,1; 81 e 810 mg/L, para todas as espécies, conforme ensaios preliminares.

O Irgarol usado era da marca Sigma-Aldrich (CAS 28159-98-0) e para a preparação da solução estoque de 4g/L o composto foi diluído em acetona (Sigma-Aldrich – CAS 67-64-1; >99.9%) e conservado a 4°C em frasco âmbar. Após o preparo o composto, foram preparadas concentrações nominais de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg/L, as quais serviram para os ensaios realizados com *Artemia* sp. e copépodos *Nitocra* sp., tendo como base o estudo de Panagoula et al. (2002), no qual foi determinada uma CL_{50-24h} de 1,62 mg/L de Irgarol para *Artemia salina*, e de Bao et al. (2014), que observaram CL_{50-96h} de 1,8 mg/L de Irgarol para o copépodo *Tigriopsis japonicus*. Para os ensaios com embriões do ouriço *Echinometra lucunter* as concentrações nominais foram de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/L de Irgarol, de acordo com Perina et al. (2011), onde se observou comprometimento do desenvolvimento de 1,4 mg/L de Irgarol. Para todos os ensaios com Irgarol foram preparados dois controles, sendo um controle branco, somente com água do mar, e o controle do solvente, contendo 250 µL de acetona, equivalente ao volume de acetona da maior concentração de Irgarol, de 10 mg/L, para *Artemia* sp e *Nitocra* sp. e 25 µL para *E. lucunter*.

Durante os ensaios laboratoriais, foram medidos parâmetros físico-químicos, como pH, salinidade, oxigênio dissolvido e amônia não-ionizada. Além disso, paralelamente aos testes, foi realizado teste com substância de referência para verificar a sensibilidade dos organismos usados nos ensaios.

3.3 Teste de toxicidade com náuplios de *Artemia* sp.

Previamente ao início dos testes, os cistos de *Artemia* sp. foram hidratados em água, desinfetados com hipoclorito de sódio e em seguida mantidos em água do mar reconstituída para eclosão, sob forte aeração durante esse período, a 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16h:8h claro:escuro, por 48 horas, até atingirem a primeira fase de náuplio II. Após a eclosão, 10 náuplios foram transferidos para 4 réplicas de cada tratamento, as quais consistiram em tubos de ensaio com capacidade de 10 ml das soluções de cada substância teste. Decorrido o período de 48 horas, os organismos vivos foram levados ao estereomicroscópio, contados e os valores registrados (Veiga & Vital, 2002).

3.4 Teste de toxicidade com *Nitocra* sp.

Foram realizados teste de toxicidade crônica, para avaliação de taxa de fecundidade do copépodo harpacticóide *Nitocra* sp. exposto às diferentes concentrações dos contaminantes, em salinidade 17, conforme protocolo de Lotufo & Abessa (2002). O organismo teste é um invertebrado bentônico estuarino, de ciclo de vida curto, além de ser facilmente cultivado em laboratório e apresentar alta sensibilidade aos contaminantes.

Nos ensaios, foram expostas 5 fêmeas ovadas, durante 7 dias, com fotoperíodo de 16h:8h claro:escuro, em câmara de germinação com temperatura a 25°C (± 2). As réplicas foram montadas em frascos de vidro de 20 ml, sendo quatro para cada tratamento, contendo as soluções teste de cada substância. Após 7 dias de exposição, ao final do experimento, o teste foi encerrado, e o material de cada réplica foi fixado com formol 10% e corado com rosa de bengala 1%. Posteriormente o material foi peneirado em malha de 45 μ m e os organismos retidos foram identificados (fêmea (F), copepodito (C) e náuplios (N)) e contados, em estereomicroscópio, para calcular a taxa de reprodução $[(N+C)/F]$.

3.5 Teste de toxicidade com embriões de *Echinometra lucunter*

Os testes de toxicidade crônica de curta duração usando embriões de ouriço do mar *Echinometra lucunter* foram realizados seguindo o protocolo descrito pela Norma Técnica 15350 (ABNT, 2006) e consistiram em avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário, após a exposição por 42 horas às substâncias teste.

Ouriços adultos foram coletados e levados para laboratório, onde foram induzidos a liberar os gametas através da injeção de 1,0 a 3,0 ml de KCl (0,5M) em sua região peri-oral. Depois de agitar suavemente o organismo, para que o KCl se espalhasse em sua cavidade celômica, os gametas foram liberados e identificados, permitindo a diferenciação entre machos e as fêmeas pela cor dos gametas (espermatozoides são esbranquiçados e óvulos são amarelo-alaranjado). As fêmeas foram apoiadas sobre a superfície de béqueres de 400 ml contendo água do mar filtrada, com a superfície aboral voltada para baixo. Com um conta-gotas, foi retirada uma amostra dos óvulos de cada fêmea, para observação em microscópio. Os óvulos apresentaram-se arredondados, lisos e de tamanho homogêneo. Após a decantação dos óvulos, houve o descarte do sobrenadante e filtração através de malha de 150 μ m, reunindo-os em um béquer de 1L. A decantação e a homogeneização foram realizadas por três vezes, o que permitiu a fecundação.

O esperma, identificado pela sua cor branca, foi colocado em um pequeno recipiente, o qual foi mantido refrigerado em uma caixa com gelo. A ativação dos espermatozoides foi feita pela diluição de 0,5 ml de esperma em 24,5 ml de água do mar. Para a fecundação, foram acrescentados entre 1 a 2 ml da solução espermática ao béquer contendo os óvulos. Em seguida foi feita a verificação do sucesso da fecundação, pela análise dos ovos fecundados em microscópio. Os ovos apresentaram as respectivas membranas de fecundação à sua volta (mínimo de 80%). Após essa verificação, foram montados tubos de ensaio contendo as soluções teste, onde cerca de 500 ovos foram introduzidos em quatro réplicas de cada tratamento. Após aproximadamente 42 horas, o teste foi fixado, pela adição de 0,5 ml de formol 10% em cada réplica. Posteriormente, foram contadas as 100 primeiras larvas encontradas em cada réplica, em microscópio com aumento de 100X, para verificar o desenvolvimento embrionário e possíveis anomalias morfológicas.

3.6 Análises de CL₅₀, CENO e CEO dos ensaios com as substâncias isoladas.

As concentrações letais e de efeito a 50% dos organismos (CL₅₀ e CE₅₀, respectivamente), nos ensaios com náuplios de *Artemia* sp. expostos por 48h e embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* expostos por 42h à cada composto foram calculadas pelo método Trimmed-Spearman-Kärber (Hamilton et al, 1977). Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *Nitocra* sp foram analisados por Interpolação Linear ICPIN (Norbert-King, 1993), para determinar a concentração de inibição de 50% do desenvolvimento após 7 dias (CI_{50-7d}).

As concentrações mais altas em que não houve efeito (Concentração de efeito não-observado - CENO) e as concentrações mais baixas em que houve efeito (Concentração de efeito observado - CEO) foram calculadas no programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, Inc.), a partir dos resultados de análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de Teste de Dunnett, para verificar diferença significativa entre os tratamentos e o controle.

3.7 Preparação dos reagentes para ensaios de sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado com substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS), nas concentrações de 9, 12, 16, 21, 27 e 35 mg/L com 4 réplicas e um controle água, para náuplios de *Artemia* sp., onde foram introduzidos 10 náuplios, para exposição de 48h ao composto. Para avaliação da sensibilidade do copépodo *Nitocra* sp., foi

realizado teste agudo, com exposição de 5 fêmeas ovadas às concentrações de 0,1; 1; 5; 10; 20 e 50 mg/L de dicromato de potássio, durante 96h; o teste de sensibilidade fornece informações sobre o estado fisiológico do lote de organismos-teste. Assim, a utilização do dicromato de potássio para testes agudos com o copépodo *Nitocra* sp., permite uma rápida avaliação do efeito letal de um composto estável, em baixas concentrações (Sousa et al., 2012). Para o teste de sensibilidade realizado com embriões de ouriço *Echinometra lucunter*, a exposição foi em soluções de sulfato de zinco, nas concentrações de 0,22; 0,30; 0,40; 0,60 e 0,80 mg/L do composto, onde foram expostos cerca de 500 embriões da espécie.

4. Resultados

4.1 Teste de sensibilidade com substância de referência

O teste de sensibilidade com substância de referência para náuplios de *Artemia* sp. obteve valor de CL_{50-24h} de 25,14 mg/L de DSS e CL_{50-48h} de 15,98 mg/L de DSS, valores dentro da faixa aceitável, conforme Veiga & Vital (2002), corroborando com (Manfra et al., 2016) que observaram CL_{50-48h} de 15,60 mg/L de DSS. Para os copépodos estuarinos *Nitocra* sp., os valores apresentaram-se dentro da faixa da carta controle do laboratório, com CL_{50-96h} de 14,33 mg/L (13,33 - 15 mg/L) de dicromato de potássio, conforme Sousa et al. (2012) que observaram CL_{50-96h} 21,70 mg/L (17,81 - 26,45 mg/L) de K₂Cr₂O₇ para a espécie. Para os embriões de *Echinometra lucunter* também se apresentaram dentro da faixa aceitável de 0,51 mg/L de sulfato de zinco, de acordo com Norma 15350 (ABNT, 2006) (Tabela 5 - Anexo 1).

4.2 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos apresentaram valores aceitáveis, de acordo com os protocolos experimentais existentes para ambas as espécies (Anexo 2). Com relação aos ensaios realizados com amônia, para náuplios de *Artemia* sp., a salinidade apresentou-se entre 32 e 36, o pH entre 5,27 e 8,19, teores de OD entre 6,5 e 8,5 mg/L e os níveis de amônia total e não ionizada de até 55,50 mg/L e 32,79 µg/L, respectivamente (tabela 6). Nos ensaios realizados com o surfactante LAS, a salinidade apresentou-se entre 34 e 37, o pH entre 5,91 e 7,31, e os teores de OD entre 5,8 e 6,50 mg/L. As concentrações de amônia total estiveram entre níveis abaixo dos limites de detecção e 0,24 mg/L enquanto os níveis de amônia não ionizada estiveram entre não detectáveis e 0,128 µg/L (tabela 7). Por fim, as salinidades das soluções nos ensaios com Irgarol apresentaram-se entre 35 e 37, os valores de pH ficaram entre 6,81 e

8,11, os teores de OD variaram entre 4,1 e 6,7 mg/L e as concentrações de amônia ficaram abaixo dos níveis de detecção (<LD) (tabela 8).

Nos ensaios realizados com *Nitocra* sp., a salinidade do teste com amônia foi de 17, os valores de pH ficaram entre 6,58 e 7,18, os teores de OD variaram entre 5,0 e 6,80 mg/L, as concentrações de amônia total estiveram entre abaixo dos níveis de detecção e 108,62 mg/L, e as concentrações de amônia não ionizada variaram entre não detectáveis e 96,4 µg/L (tabela 9). Nos ensaios com LAS, a salinidade foi de 17 e 18, o pH variou entre 6,29 e 6,99, os níveis de OD variaram entre 4,9 e 6,2 e os níveis de amônia total e não ionizada estiveram abaixo dos limites de detecção (tabela 10). Nos ensaios com Irgarol, as salinidades variaram de 18 a 20, o pH variou entre 6,17 e 8,16, os teores de OD variaram entre 4,9 e 6,8 mg/L. As concentrações de amônia total variaram de não detectáveis a 1,4 mg/L e as de amônia não ionizada estiveram entre <LD e 0,43 µg/L (tabela 11).

Nos ensaios com *Echinometra lucunter* e amônia, as salinidades foram 36 e 38, valores de pH estiveram entre 6,94 e 7,14, os teores de OD variaram entre 5,7 e 6 as concentrações de amônia total variaram entre <LD e 100 mg/L e as concentrações de amônia não ionizada estiveram entre abaixo dos limites de detecção e 79 µg/L (tabela 12). Nos ensaios realizados com LAS, a salinidade foi de 37, os valores de pH variaram entre 6,35 e 7,49, os teores de OD variaram entre 5 e 6,3 mg/L e as concentrações de amônia total e amônia não ionizada estiveram abaixo dos níveis de detecção (tabela 13). Nos ensaios com Irgarol, a salinidade se apresentou entre 33 e 38, o pH variou entre 7,3 e 7,51, os níveis de OD variaram de 5,3 a 6,4 mg/L e as concentrações de amônia total e amônia não ionizada foram menores que os limites de detecção (tabela 14).

4.3 Ensaios de toxicidade

O ensaio de toxicidade aguda de náuplios de *Artemia* sp. expostos à amônia isolada apresentou concentrações de efeito não-observado (CENO) e de efeito observado (CEO) de 10 mg/L e 100 mg/L, respectivamente. A CL_{50-48h} observada foi de 122,85 mg/L (54,41 - 154,20 mg/L).

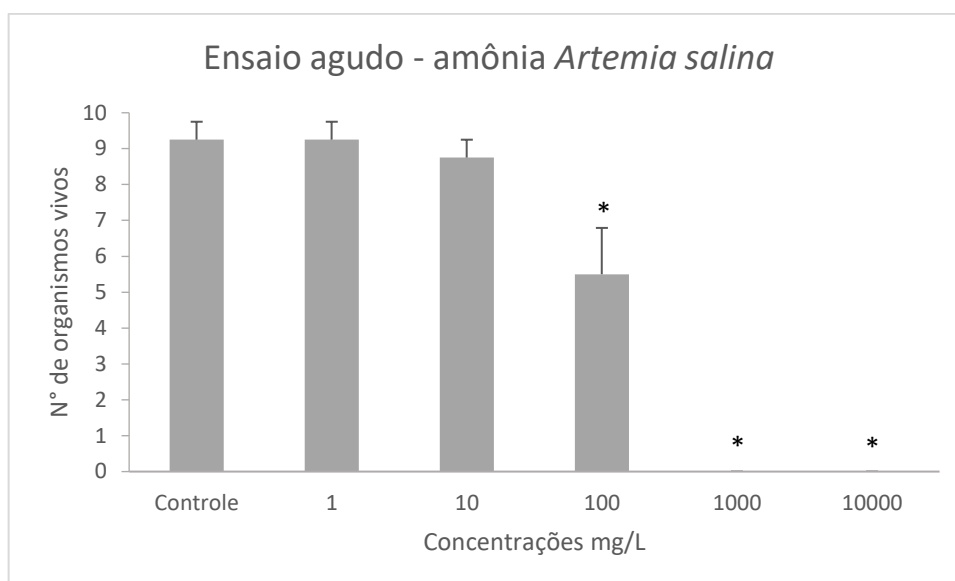


Figura 1 - Número de organismos vivos (*Artemia* sp.) em teste agudo (48h) com exposição à amônia. CENO: 10 mg/L; CEO: 100 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Em relação à amônia, os testes crônicos com os copépodos *Nitocra* sp. apresentaram CI_{50-7d} 27,89 mg/L (1,94 - 53,60 mg/L) com CENO de 10 mg/L e CEO de 100 mg/L.

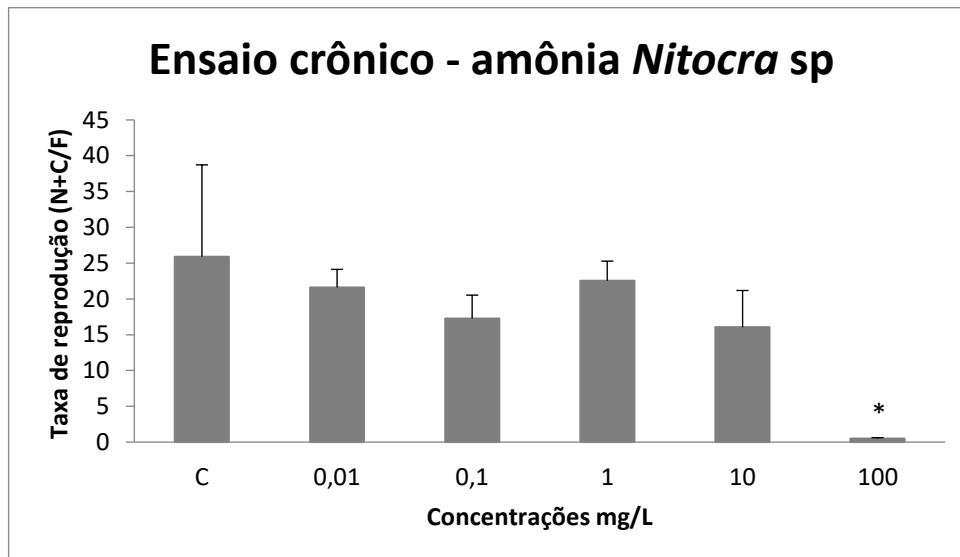


Figura 2 -Taxa de reprodução dos copépodos *Nitocra* sp. em teste de toxicidade com amônia. CENO: 10 mg/L; CEO: 100 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Para o teste realizados com embriões de *E. lucunter* a CE_{50-42h} foi estimada em 0,32 mg/L (0,27 - 0,37 mg/L) de amônia, com CENO de 0,01 mg/L e CEO de 0,1 mg/L.

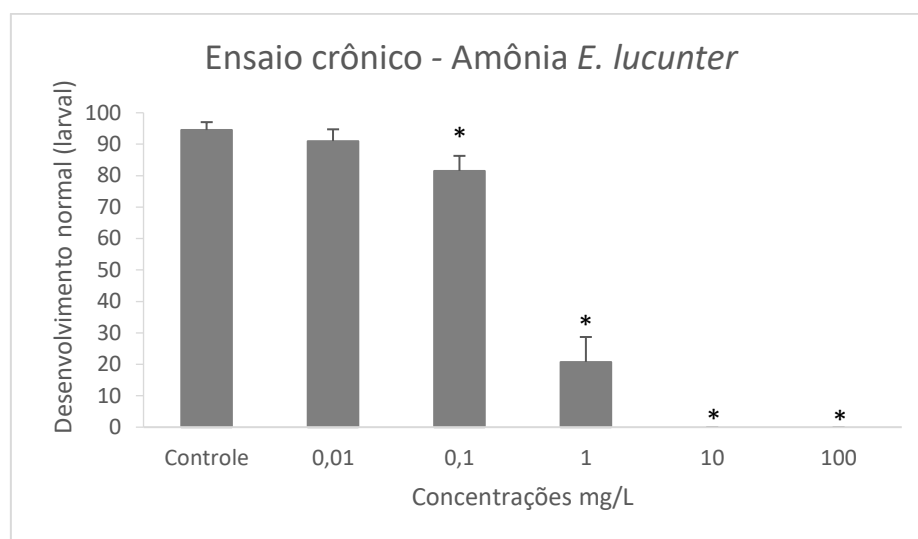


Figura 3 - Número de embriões de *E. lucunter* com desenvolvimento normal em teste de toxicidade com diferentes concentrações de amônia. CENO: 0,01 mg/L; CEO: 0,1 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Com relação aos ensaios isolados com LAS, o branchiopoda *Artemia* sp. apresentou-se mais sensível do que à amônia, com CL_{50-48h} de 21,21 mg/L (16,74 - 26,89 mg/L).

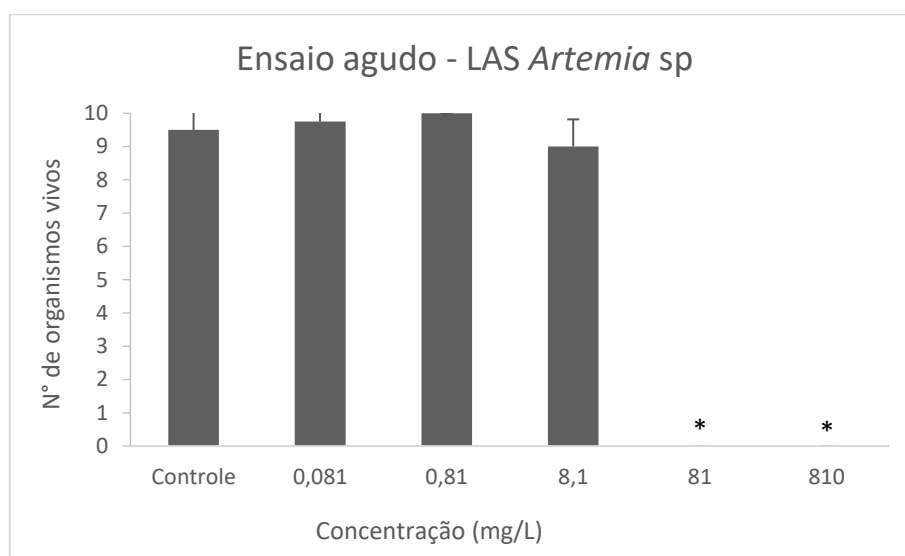


Figura 4 – Numero de organismos vivos (*Artemia* sp.) em teste agudo (48h) com exposição ao LAS. CENO: 8,1 mg/L; CEO: 81 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Os dados do teste crônico realizado com os copépodos *Nitocra* sp. e exposição às diferentes concentrações de LAS resultaram em uma CI_{50-7d} de 4,6 mg/L (2,71 - 5,77 mg/L), com CENO de 0,81 e CEO de 8,1 mg/L de LAS.

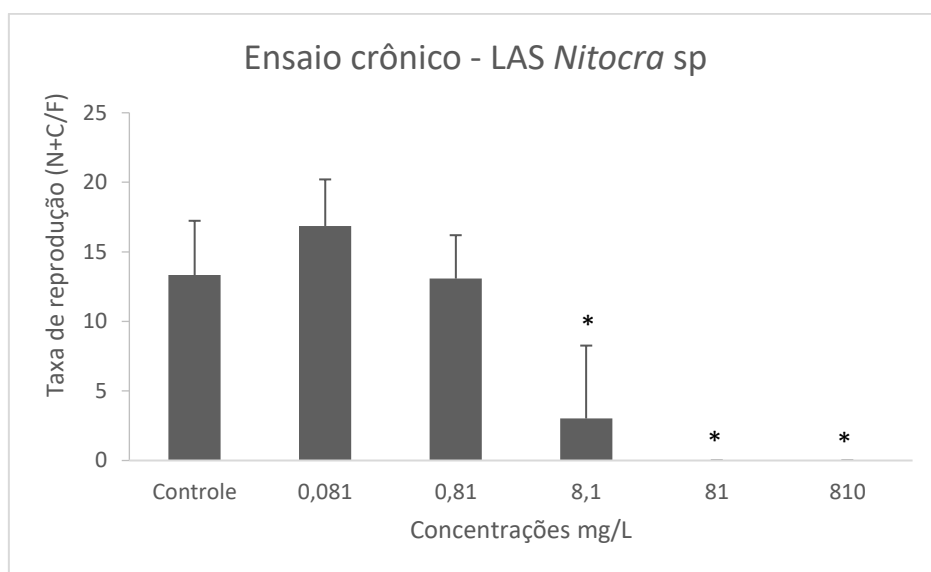


Figura 5 - Taxa de reprodução dos copépodos *Nitocra* sp. em teste de toxicidade com diferentes concentrações de LAS. CENO: 0,81 mg/L; CEO: 8,1 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Para os dados de exposição de *E. lucunter* em LAS foi observada diferença com relação ao controle em todas as concentrações de exposição do composto, o que demonstrou que acima de 0,081 mg/L o LAS apresentou-se tóxico para os organismos.

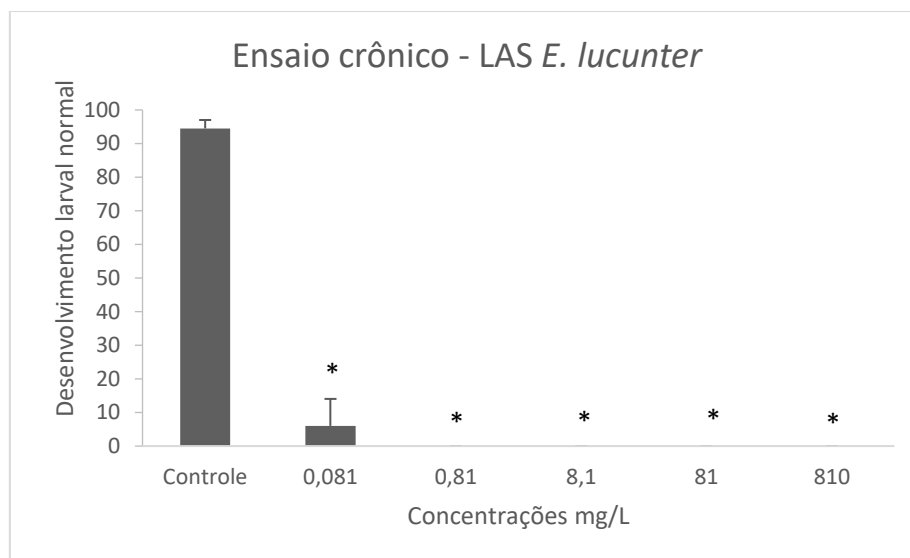


Figura 6 - Número de embriões de *E. lucunter* com desenvolvimento normal em teste de toxicidade com diferentes concentrações de LAS. CEO: 0,081 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Já a CL_{50-48h} para náuplios de *Artemia* sp. expostos ao Irgarol foi de 1,81 mg/L (1,10 - 2,99 mg/L).

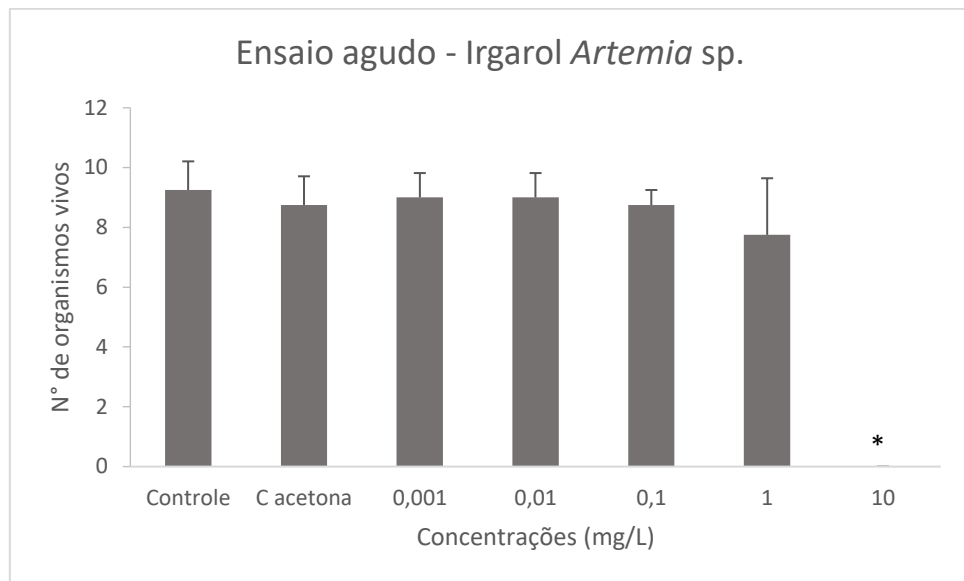


Figura 7 - Número de organismos vivos (*Artemia* sp.) em teste agudo (48h) com exposição ao Irgarol. CENO: 1 mg/L; CEO: 10 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

Por fim, com relação ao Irgarol, os resultados dos testes crônicos com o copépodo *Nitocra* sp. mostraram CI_{50-7d} de 0,13 mg/L (0,009 – 5,97 mg/L), com CENO de 1 mg/L e CEO de 10 mg/L.

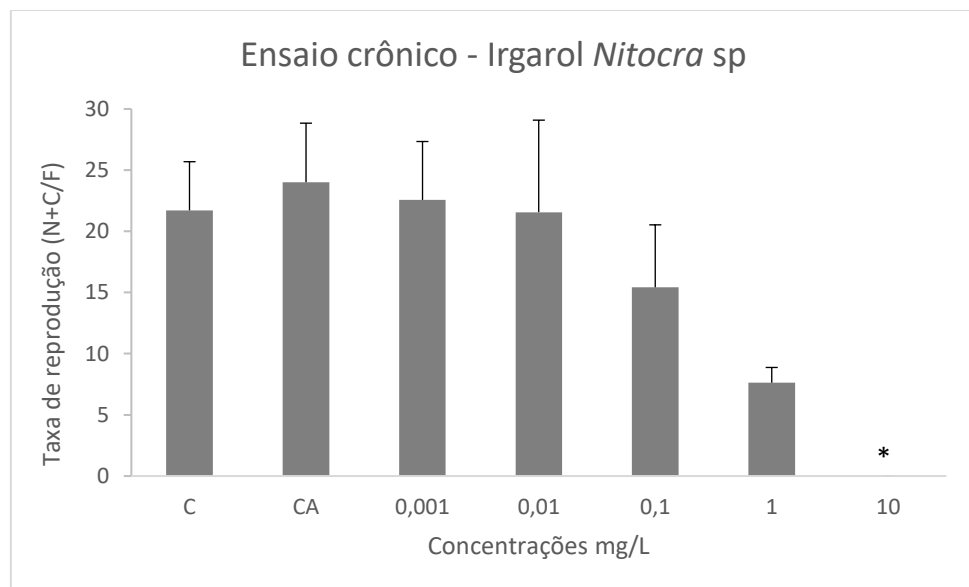


Figura 8 - Taxa de reprodução dos copépodos *Nitocra* sp. em teste de toxicidade com diferentes concentrações de Irgarol. CENO: 1 mg/L; CEO: 10 mg/L. * Diferença com relação ao controle.

No teste crônico com os embriões de *E. lucunter* expostos ao Irgarol, não foi observada diferença com relação ao controle, para as concentrações de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/L.

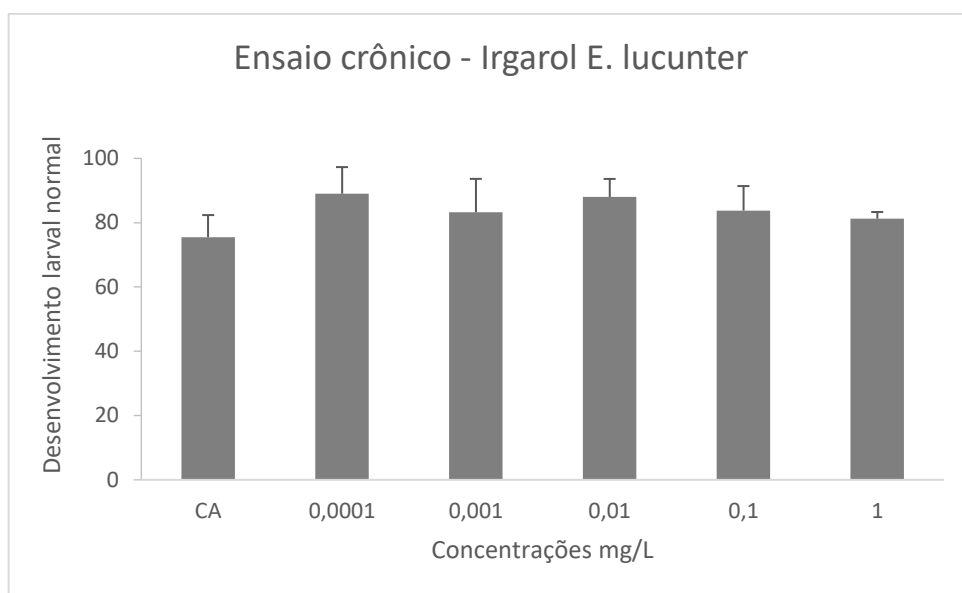


Figura 9 - Número de embriões de *E. lucunter* com desenvolvimento normal em teste de toxicidade com diferentes concentrações de Irgarol.

Tabela 1 – Toxicidade dos compostos (amônia total, LAS, Irgarol) às espécies avaliada como concentração letal (CL₅₀), concentração de efeito (CE₅₀) e concentração de inibição (CI₅₀) a 50% dos organismos testados, de cada espécie, além dos valores das concentrações de efeito não observado (CENO) e de efeito observado (CEO), dos ensaios com amônia total (mg/l), LAS (mg/L) e Irgarol (mg/L).

		CENO						CEO		
		Irgarol (mg/L)	LAS (mg/L)	Amônia (mg/L)	Amônia (mg/L)	LAS (mg/L)	Irgarol (mg/L)	Amônia (mg/L)	LAS (mg/L)	Irgarol (mg/L)
CL50	<i>Artemia sp.</i>	1,81	21,21	122,85	10	8,1	1	100	81	10
CI50	<i>Nitocra sp.</i>	0,13	4,6	27,89	10	0,81	1	100	8,1	10
		LAS (mg/L)	Amônia (mg/L)	Irgarol (mg/L)						
CE50	<i>E. lucunter</i>	<0,081	0,32	>1	0,001	<0,081	1	0,01	0,081	> 1

5. Discussão

Os dados dos testes de toxicidade realizados com amônia, LAS e Irgarol, mostraram que cada espécie apresenta sensibilidade diferente aos compostos. O estudo mostrou que, entre os três compostos testados, a toxicidade do Irgarol para *Artemia* sp e para o copépodo *Nitocra* sp. foi maior do que a da amônia e do LAS. Os embriões de ouriço *E. lucunter* apresentaram maior sensibilidade ao surfactante LAS do que à amônia e ao Irgarol.

O Irgarol é um composto largamente utilizado como herbicida na agricultura e representou uma alternativa ao TBT, que havia sido banido em 2008 (Panagoula et al., 2002). Apesar de sua importância na indústria naval como “booster” anti-incrustante, o Irgarol pode ser extremamente tóxico aos organismos fotossintetizantes, podendo comprometer a produção primária no ambiente marinho (Bao, et al., 2011). Bao et al (2011) observaram CE_{50-96h} de 0,57 $\mu\text{g/L}$ de Irgarol para microalga *Skeletonema costatum* e CE_{50-96h} de 0,38 $\mu\text{g/L}$ para *Thalassiosira pseudonana*.

Os dados deste trabalho mostram níveis tóxicos que se aproximam aos obtidos por Panagoula et al. (2002), que observaram CL_{50-24h} de 1,62 mg/L de Irgarol, para náuplios de *Artemia salina*, assim como a CENO e a CEO de 1 mg/L e 10 mg/L, respectivamente. Estudo recente de Jung et al. (2017) relatou CL_{50-48h} de 9,73 mg/L de Irgarol para náuplios de *Artemia* sp., próxima à CEO, de 10 mg/L do composto, obtida pelo presente trabalho. A concentração letal a 50% dos organismos testados é uma concentração estimada (Hamilton et al., 1977), e o intervalo entre os valores de 0% de efeito e de 50% de efeito do Irgarol foi observado entre as concentrações de 1 mg/L e 10mg/L por Jung et al. (2017), Panagoula et al. (2002) e pelo presente trabalho.

Comparando os resultados de sensibilidade obtidas de náuplios de *Artemia* sp. e *Nitocra* sp. ao Irgarol obtidos, verifica-se que os valores se aproximam àqueles observados em outros estudos. Bao et al. (2014) observaram CL_{50-96h} de 1 mg/L de Irgarol para juvenis do copépodo *Elasmopus rapax* e CL_{50-96h} de 2,4 mg/L para adultos do copépodo *Tigriopus japonicus*. Para o microcrustáceo de água doce, *Daphnia magna*, o valor da CL_{50-48h} observado por Fernández-Alba et al. (2002) foi de 7,3 mg/L com CEO de 2,4 mg/L. A mesma faixa de sensibilidade também foi relatada para embriões do ouriço *Lytechinus variegatus* por Perina et al. (2011), que observaram concentração de inibição (CI_{50-24h}) de 1,4 mg/L de Irgarol no desenvolvimento embrionário da espécie.

A CI_{50-7d} de 0,13 mg/L de Irgarol, para o copépodo *Nitocra* sp., pode ser considerada alta com relação à concentração ambiental média de 13 ng/L mundial (em água), porém está

numa faixa de grandeza próxima das concentrações medidas em sedimentos (Voulvolis et al., 2000; Voulvolis, et al., 2002; Zhou, 2008; Gallucci et al., 2015).

Náuplios de *Artemia* sp. parecem ser mais tolerantes ao composto LAS, quando comparada com outras espécies. Liwarska-bizukojc et al (2005) obtiveram CL_{50-24h} de 40,4 mg/L de LAS para *Artemia salina*. Barbieri (2007) observou CL_{50-48h} de 5,32 mg/L de LAS para crustáceo *Farfantepenaeus paulensis*. Liwarska-Bizukojc et al. (2005), observaram CL_{50-24h} 16,65 mg/L de LAS para adultos do molusco *Physa acuta*, e Christoffersen et al. (2003) obtiveram CL_{50-48h} de 1,11 mg/L de LAS para o copépodo *A. tonsa*, com diminuição severa da produção de ovos da espécie em 0,2 mg/L de LAS. O presente trabalho obteve CI_{50-7d} de 4,6 mg/L de LAS para *Nitocra* sp., corroborando que em baixas concentrações o composto pode causar efeitos tóxico sobre a reprodução e a fertilidade de organismos marinhos. Segundo Mastroti (1997), é possível observar comprometimento severo do desenvolvimento embrionário de *Lytechinus variegatus* a partir de concentrações de 0,13 mg/L de LAS, valor próximo ao observado no presente trabalho para embriões de *E. lucunter* (<0.08 mg/L). A tolerância de *Artemia* sp. aos surfactantes aniônicos, quando comparada à outras espécies de crustáceos, também foi relatada por Sibila et al. (2008), que obtiveram CL_{50-48h} de 38,30 mg/L para náuplios de *Artemia franciscana* expostas em alquil-etoxissulfato (AES), surfactante aniônico similar ao LAS.

Ambientes impactados pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais, sem tratamento ou com tratamento inadequado, podem causar toxicidade aguda e crônica aos organismos marinhos, devido à presença de altas concentrações de amônia e de produtos de limpeza, como o alquilbenzeno sulfonato linear (Ankley et al., 1990; Rosety et al., 2001). O LAS é um dos compostos químicos amplamente utilizados no mundo (Ivanković & Hrenović, 2010). Cerca de 4 milhões de toneladas de produtos detergentes e amaciantes são utilizadas por ano, só na Europa Ocidental (Liwarska-Bizukojc et al., 2005), enquanto sua produção mundial ultrapassa 7 milhões de toneladas (Ivanković & Hrenović, 2010). Suas diversas aplicações e produção em larga escala, implicam em grandes quantidades de produtos detergentes liberados para o meio aquático marinho (Liwarska-Bizukojc et al., 2005). Dessa forma, essa grande quantidade de detergente e seus produtos de degradação podem atingir águas superficiais e sedimentos, podendo comprometer o ecossistema marinho (Ivanković & Hrenović, 2010).

Por sua vez, grande parte da amônia que entra no ambiente aquático tem origem nas fontes difusas e pontuais, através do escoamento urbano e agrícola, contaminadas com resíduos e fertilizantes, e também através de estações de tratamento de esgoto (Abessa, 2002). No Brasil, o emissário submarino de Santos pode apresentar concentrações de amônia total variáveis

durante o ano, podendo ocorrer entre 10,6 mg/L a 54,9 mg/L (Subtil, 2012; Rachid, 2002).

Elevados níveis de amônia podem representar riscos para organismos aquáticos. Por outro lado, Chen et al. (1989) observaram que náuplios de *Artemia* sp. podem tolerar até 839 mg/L de amônia total. Svensson et al. (2005) observaram distúrbios no comportamento natatório em 20% dos náuplios de *Artemia salina*, em concentrações altas, de 800 mg/L de amônia total, expostos por 24 horas, e que acima dessa concentração havia comprometimento da mobilidade dos organismos expostos.

Porém, no presente estudo, os copépodos *Nitocra* sp., apresentam maior sensibilidade à substância, quando comparados com os náuplios de *Artemia* sp. Em estudos realizados com sedimentos coletados em regiões próximas à contaminação por esgotos e impactadas por ocupação antrópica, foi observado que a amônia pode ser responsável pela toxicidade crônica sobre *Nitocra* sp. e pela toxicidade aguda a outros invertebrados, quando esses organismos foram expostos aos sedimentos contaminados e que apresentaram altas concentrações de amônia (Camargo et al., 2014; Moore et al., 1997). Outras espécies de crustáceos, marinhas ou estuarinas, também podem apresentar maior sensibilidade à amônia. Moore et al. (1997) observaram toxicidade aguda em organismos juvenis do anfípoda *Leptocheirus plumulosus*, com CL_{50-96h} de 44,4 mg/L de amônia total, expostos à água intersticial extraída de sedimentos contaminados com altas concentrações de amônia. Ankley et al. (1990) também observaram toxicidade aguda e crônica em organismos expostos à água intersticial extraída de sedimentos de regiões que recebem cargas constantes de efluentes domésticos e industriais, nos quais foi observada a ocorrência de amônia em altas concentrações.

6. Conclusão

No presente trabalho, observou-se que diferentes organismos apresentaram diferentes sensibilidades aos compostos; uma implicação direta deste fato é a necessidade de uso de dados com grande número de espécies para determinar níveis máximos aceitáveis das substâncias no ambiente e riscos ambientais associados, já que dados obtidos para uma espécie não são suficientes para garantir a proteção da vida aquática.

A CE_{50-42h} de 0,32 mg/L de amônia observada para os embriões *Echinometra lucunter* foi 1,25 vezes menor do que a concentração de 0,4 mg/L de N amoniacal permitida pela legislação, em águas marinhas de Classe 1, e quase 30 vezes mais baixa do que a concentração de 10 mg/L de amônia não-ionizada já relatada pela literatura. Para os copépodos *Nitocra* sp. a CI_{50-7d} foi cerca de duas vezes menor do que as concentrações de amônia não-ionizada relatadas

pela literatura, mas abaixo das concentrações permitidas pela legislação. As concentrações tóxicas de LAS para os embriões de *E. lucunter* foram cerca de 12 vezes menores do que as concentrações de 1 mg/L observadas por alguns autores, e quase duas vezes menores do que a concentração de 0,2 mg/L permitida pela legislação em águas salgadas de classe tipo1. Sendo assim, os dados obtidos indicam que as concentrações legais não são suficientes para proteção da vida aquática e que os níveis ambientais podem representar riscos de intoxicação para a biota marinha, de modo que regiões costeiras impactadas por lançamento de esgoto domésticos podem apresentar risco para essas espécies devido aos níveis de LAS e amônia.

Náuplios de *Artemia* sp. e os copépodos *Nitocra* sp. apresentaram maior sensibilidade ao biocida Irgarol em concentrações acima das concentrações já observadas em águas costeiras brasileiras (4,8 µg/L), porém abaixo das concentrações de 2,98 mg/Kg de Irgarol observadas em sedimentos onde há intensa atividade de manutenção dos cascos de embarcações no Reino Unido, relatada por alguns estudos.

Capítulo 2 – Toxicidade de misturas binárias de Irgarol-amônia e Irgarol-LAS

1. Objetivo

- O objetivo específico deste capítulo foi:

(i) Avaliar a toxicidade de misturas binárias de Irgarol com amônia e Irgarol com LAS em náuplios de *Artemia* sp.

2. Materiais e métodos

No capítulo 1 desta dissertação, foram mostrados e discutidos os testes executados com amônia, LAS e Irgarol de forma isolada, para náuplios de *Artemia* sp., para o copépodo *Nitocra* sp. e para embriões de *E. lucunter*. A avaliação da toxicidade de misturas pode ser realizada usando uma abordagem baseada na previsão e avaliação da toxicidade isolada dos compostos envolvidos na mistura. Assim, no capítulo 2, além dos resultados dos testes com mistura binária para náuplios de *Artemia* sp., encontram-se os resultados dos ensaios isolados com amônia, LAS e Irgarol, realizados simultaneamente aos ensaios com as misturas.

2.1 Preparação dos reagentes para ensaios isolados, simultâneos à mistura

Os procedimentos experimentais foram os mesmos descritos no capítulo 1. Para a execução desses ensaios isolados, foram preparadas as mesmas concentrações nominais determinadas pelos ensaios isolados anteriores, do capítulo 1, porém, realizados com 3 réplicas para cada tratamento. Esses ensaios permitem cálculos comparativos entre CL_{50} de testes isolados com CL_{50} da mistura (Pérez et al., 2013). Os ensaios com compostos isolados executados simultaneamente às misturas também acompanhavam controles com água do mar e o controle solvente, no caso dos ensaios com Irgarol.

2.2 Preparação dos reagentes para ensaios com misturas

Para a realização dos ensaios com misturas, os volumes de cada concentração de amônia e LAS foram adicionados em seus respectivos balões volumétricos de 100 ml, contendo água de diluição. Depois, cada um dos balões contendo amônia ou LAS, recebeu a concentração de Irgarol, assim, o balão pôde ser avolumado com água do mar para se obter a combinação de

concentrações desejadas. As combinações das misturas binárias foram de acordo com a tabela 2:

Tabela 2 – Concentrações de misturas binárias das soluções aquosas de Irgarol (mg/L) e amônia (mg/L) e Irgarol e LAS (mg/L). As concentrações de Irgarol foram misturadas com todas as outras concentrações de amônia e LAS:

	Irgarol (mg/L)	Amônia (mg/L)
M1	0,001	1
M2	0,001	10
M3	0,001	100
M4	0,001	1000
M5	0,001	10000
M6	0,01	1
M7	0,01	10
M8	0,01	100
M9	0,01	1000
M10	0,01	10000
M11	0,1	1
M12	0,1	10
M13	0,1	100
M14	0,1	1000
M15	0,1	10000
M16	1	1
M17	1	10
M18	1	100
M19	1	1000
M20	1	10000
M21	10	1
M22	10	10
M23	10	100
M24	10	1000
	10	10000

	Irgarol (mg/L)	LAS (mg/L)
M1	0,001	0,081
M2	0,001	0,81
M3	0,001	8,1
M4	0,001	81
M5	0,001	810
M6	0,01	0,081
M7	0,01	0,81
M8	0,01	8,1
M9	0,01	81
M10	0,01	810
M11	0,1	0,081
M12	0,1	0,81
M13	0,1	8,1
M14	0,1	81
M15	0,1	810
M16	1	0,081
M17	1	0,81
M18	1	8,1
M19	1	81
M20	1	810
M21	10	0,081
M22	10	0,81
M23	10	8,1
M24	10	81
M25	10	810

2.3 Análise de dados dos ensaios de mistura

As CL_{50-48h} para os náuplios de *Artemia* sp. expostos por 48h à cada composto isolado que acompanharam os ensaios de mistura, e as CL_{50-48h} de cada combinação binária foram calculadas através de regressão logística de três parâmetros pelo programa Sigma-Stat 12.5.0 (Systat, 2006).

As análises dos dados de letalidade de *Artemia* sp. em misturas binárias foram realizadas pelo modelo Mixtox, descrito por Jonker et al (2005). Depois do preenchimento do Mixtox com as concentrações da mistura binária de Irgarol e amônia e da mistura binária de Irgarol e LAS, os dados foram primeiramente analisados no modelo de referência CA, depois, nesse mesmo modelo, foi verificado se havia algum desvio com relação à sinergismo e antagonismo (S/A), desvio razão dependente (DR) ou desvio de nível dependente (DL). DR são desvios que dependem da composição da mistura, e podem ser observados quando um dos compostos é dominante, assim, o efeito sinérgico ou antagônico pode ser observado devido principalmente ao químico 1 ou ao químico 2. DL são os desvios dos modelos de referência onde os efeitos em baixas concentrações são diferentes dos desvios em altas concentrações, i. é., o efeito pode ser antagônico em baixas concentrações e sinérgico nas altas concentrações.

Depois, foram realizados os mesmos passos para análises no modelo de referência IA, onde também foi verificado se havia algum desvio com relação à S/A, DR e DL. Os dados foram considerados ajustados nos modelos de referência onde $p < 0,05$. A interpretação dos desvios foi realizada com base nos parâmetros a e b (Jonker et al, 2005), descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Interpretação dos parâmetros a e b adicionados nos modelos de referência Adição de Concentração (CA) e Ação Independente (IA) para definir o padrão dos desvios (Jonker et al, 2005 - adaptado).

Desvio	Parâmetro	Valores		
		CA	IA	
Sinergismo/Antagonismo (S/A)				
Antagonismo	a	>0	>0	
Sinergismo		<0	<0	
Dose Razão dependente (DR)				
Antagonismo, exceto para misturas onde $b < 0$ para sinergismo	a	>0	>0	
Sinergismo, exceto para misturas onde $b > 0$ para antagonismo		<0	<0	
Antagonismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo composto i	b	>0	>0	
Sinergismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo composto i		<0	<0	
Dose Nível dependente (DL)				
Antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas doses	a	>0	>0	
Sinergismo em baixas doses e antagonismos em altas doses		<0	<0	
Desvios em concentrações menores do que a CL50	b_{dl}	>1	>2	
Desvios em concentrações similares à CL50	b_{dl}	$=1$	$=2$	
Desvios em concentrações mais elevadas que a CL50	b_{dl}	$0 < b_{dl} < 1$	$0 < b_{dl} < 2$	
Não há desvio, mas a magnitude de S/A é dose nível dependente CA ou efeito do nível IA	b_{dl}	<0	<1	

Depois de analisar o modelo ajustado para a mistura e seus possíveis desvios, foram feitos os perfis de gráficos isoblograma, que permitem verificar se a mistura apresenta um efeito aditivo, sinérgico ou antagônico (Cedergreen et al., 2007). Os perfis de dose-respostas de ambas as misturas descrevem curvas com projeção no nível da resposta da CL_{50} , no plano x e y, fornecendo informações sobre a interação entre os compostos na mistura (Cedergreen et al., 2007; Jonker et al., 2005).

Também foi calculada razão de sinergismo (SR) para verificar se ocorreu efeito maior ($SR > 1$) ou menor ($SR < 1$) do que o esperado, quando comparado com o efeito dos químicos isolados (Hewlett & Plackett, 1959). O resultado de interação SR entre os compostos é o quociente entre a CL_{50} do Irgarol isolado e os valores das CL_{50} para cada um dos tratamentos Irgarol e amônia ou Irgarol e LAS.

Se a CL_{50} da mistura (de cada tratamento) estiver dentro dos valores da CL_{50} do Irgarol isolado ($SR = 1$) indica que não há efeito da amônia ou LAS sobre a toxicidade do Irgarol (efeito aditivo), enquanto valores $SR > 1$ e $SR < 1$ indicam efeitos maiores e mais fracos do que o esperado, respectivamente (Pérez et al., 2013).

3. Resultados e discussão

3.1 Parâmetros físico-químicos dos ensaios com misturas binárias

Os parâmetros físico-químicos dos ensaios agudos com *Artemia* sp. e misturas binárias apresentaram os seguintes valores: nos ensaios de Irgarol com amônia, as salinidades variaram entre 35 e 44, o pH da água esteve entre 6,49 e 7,98, os teores de OD variaram entre 3,3 mg/L e 7,1 mg/L, as concentrações de amônia total variaram entre não detectáveis e 5,7 g/L e as concentrações de amônia não ionizada estiveram entre <LD e 2,3 mg/L (tabela 15 e 16).

Nos ensaios de Irgarol e LAS as salinidades estiveram entre 33 e 63, os valores de pH variaram entre 1,81 e 7,74, os teores de OD estiveram entre 7,9 e 6 mg/L e as concentrações de amônia total e amônia não ionizada estiveram abaixo dos níveis de detecção (tabela 17).

Nos ensaios com amônia, os parâmetros físico-químicos para apresentaram maiores flutuações com relação à salinidade, de 35 a 44. Essa variação pode ter ocorrido pela dissociação dos íons inorgânicos NH_4^+ e Cl^- (Huang et al, 2017), onde o íon cloreto pode ter influenciado nesse aumento em concentrações mais altas de amônia. Conforme Svensson et al. (2005), *Artemia salina* possui alta tolerância aos íons cloreto e, segundo Veiga & Vital (2002), a faixa de salinidade apresentou variação dos limites toleráveis para *Artemia* sp.

Com relação aos valores de pH, as flutuações foram mais extremas nas misturas binárias de Irgarol e LAS: valores mais baixos de pH foram observados na combinação entre Irgarol (10 mg/L) com LAS (810 mg/L), ou seja, nas concentrações mais altas de ambas substâncias. O LAS possui uma composição onde parte do seu conteúdo é uma fração de ácido sulfônico, o que pode ter influenciado nos níveis de pH.

De acordo com os ensaios isolados dos compostos, a CEO de 81 mg/L de LAS apresentou pH de 7,14 (parâmetros iniciais) e 6,87 (parâmetros finais), dentro de uma faixa encontrada na literatura (Libralato et al, 2016), sugerindo que a letalidade de 100% dos náuplios nessa exposição isolada foi observada pelos efeitos do composto e não pelo pH.

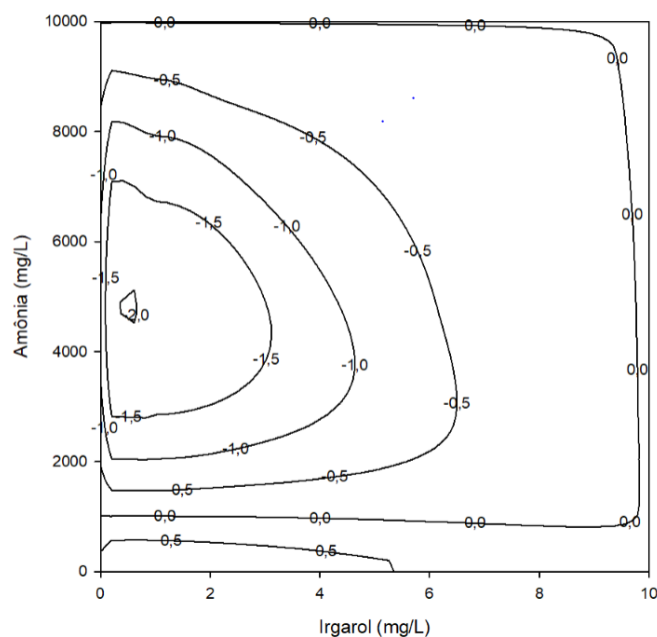
O mesmo ocorre com o Irgarol, cuja CEO de 10 mg/L apresentou pH 7,86 (parâmetros isolados) e 7,74 (parâmetro isolado simultâneo à mistura), onde o efeito letal foi de 100% para essa concentração, mesmo com pH aceitável para a espécie, concluindo que os valores de pH ácido foram observados em concentrações onde a letalidade já era esperada.

3.2 Toxicidade dos compostos isolados simultâneos às misturas as misturas binárias de Irgarol com amônia e Irgarol com LAS

Os valores das CL_{50-48h} apresentados pela exposição de náuplios de *Artemia* sp. aos compostos, em ensaios isolados realizados simultaneamente à mistura, foram consideradas concordantes com os valores dos testes isolados do capítulo 1, e apresentaram os seguintes valores: CL_{50-48h} de 1,6 mg/L de Irgarol e 136 mg/L amônia para a mistura binária de Irgarol e amônia; e para a mistura binária de Irgarol e LAS, CL_{50-48h} 4,25 mg/L de Irgarol e 11,21 mg/L de LAS.

3.3 Toxicidade das misturas binárias de Irgarol com amônia e Irgarol com LAS

Ambas as misturas binárias foram analisadas nos modelos CA e IA através do MIXTOX, a fim de analisar qual o melhor modelo se ajusta às interações. Os dois modelos, CA e IA foram ajustados para as duas misturas. Os dados da mistura binária de Irgarol com amônia foram ajustados para o modelo IA, após a inserção dos parâmetros *a* e *b*, apresentou o melhor ajuste para antagonismo, isto é, a soma dos efeitos da mistura é menor do que o efeito dos compostos isolados.



O resultado previsto pelo modelo IA já era esperado, já que o MoA e a natureza dos compostos são diferentes. O Irgarol é um biocida industrial, que tem como alvo o sítio de ligação da proteína D1 dos tilacóides dos cloroplastos, inativando o receptor de elétrons do fotossistema II da fotossíntese nos produtores (Bao et al., 2011). Porém, pode causar efeitos em organismos não fotossintetizantes, como relatado pela literatura (Arai et al., 2009).

Já a amônia pode atuar nos organismos aquáticos com danos no metabolismo de uma forma mais ampla, como, entre outros efeitos, desregulação do sistema osmótico e inibição do metabolismo pela competição de íons e danos estruturais nas brânquias (Landau & Sanchez, 1991). A razão de sinergismo entre Irgarol e amônia apresentou valores de $SR < 1$, indicando um efeito tóxico menor do que o esperado (antagônico), corroborando com resultados do Mixtox, ajustado para IA (tabela 4).

Para a mistura binária entre Irgarol e LAS o ajuste observado para o modelo IA, ao inserir os parâmetros a e b , foi de sinergismo ($p < 0,05$), isto é, a soma dos efeitos dos compostos é maior do que o efeito dos compostos isolados.

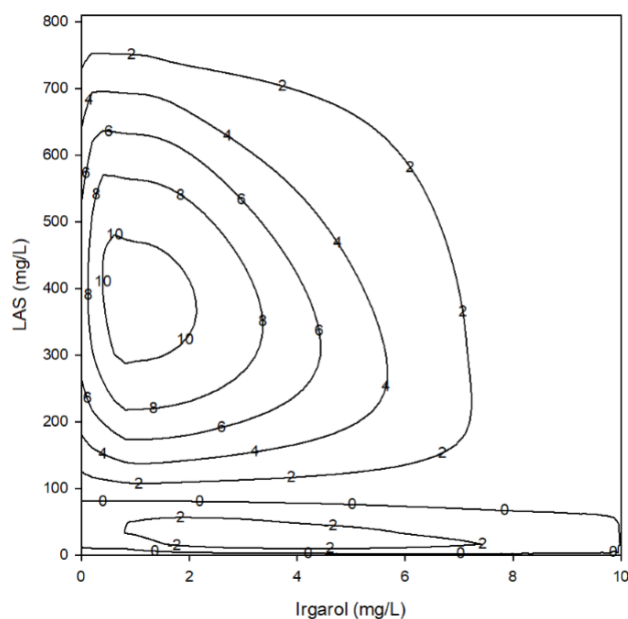


Figura 11 – Representação do efeito sinérgico da mistura binária de Irgarol e LAS em náuplios de *Artemia* sp..

O modelo IA ajustado para a mistura binária de Irgarol e LAS pode ser também explicado pelos diferentes MoA dos produtos (Jonker et al., 2005). O LAS é bastante conhecido pela capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática, o que pode facilitar a entrada e a interação de outros químicos no organismo exposto (Farré et al., 2008; Liwarska-Bizukojc et al., 2005; Bakirel et al., 2005). Essa interação pode explicar o sinergismo observado, mesmo na presença de químicos com MoA diferente.

Os valores de SR, na mistura de Irgarol e LAS, não foram claros. Os tratamentos onde há a concentração mais baixa e mais alta de Irgarola apresentaram valores pouco acima de 1, e os tratamentos onde as concentrações de Irgarol são intermediárias apresentaram valores pouco abaixo de 1 (tabela 4), corroborando com o efeito aditivo de CA (sem desvios), mas não corroborando com desvio de sinergismo observado em IA. O modelo de razão de sinergismo calcula a magnitude do efeito, fornecendo mais uma informação sobre o tipo e a força da interação (Obiakor & Ezeonyejiaku, 2015), porém os resultados para a mistura de Irgarol e LAS foram melhor explicados pelos dados do MIxtox.

Tabela 4 - $SR = CL_{50-48h}(\text{Irgarol isolado}) / CL_{50-48h}(\text{Irgarol em mistura})$. $SR = 1$ significa que não há efeito da amônia ou do LAS sobre o efeito tóxico do Irgarol. $SR > 1$ ou < 1 o efeito é maior ou menor do que o esperado, respectivamente.

		Irgarol (mg/L)				
		0	0,001	0,01	0,1	1
Amônia						
CL50	1,6	596,07	445,61	138,66	463,46	
SR		0,02	0,003	0,011	0,003	
LAS						
CL50	4,25	3,46	8,06	6,82	3,55	
SR		1,22	0,5	0,62	1,19	

$$SR = CL_{50}(\text{Irgarol isolado}) / CL_{50}(\text{Irgarol e amônia ou Irgarol e LAS})$$

Alguns estudos evidenciaram que a presença de amônia, Irgarol ou LAS podem interferir na resposta biológica dos diferentes organismos, quando misturados com contaminantes secundários. Chen et al. (1989) observaram efeito antagônico na mistura binária de amônia e nitrito, em ensaios com náuplios de *Artemia salina* expostos por 24h, e sinergismo após 48h de exposição para a mesma espécie. Farré et al. (2008) observaram efeitos inibitórios sobre bioluminescência de *Vibrio fischeri* com efeitos sinérgicos da mistura binária de triclosan e LAS.

Outros autores mostraram que misturas binárias de Irgarol com outros químicos de naturezas e concentrações diferentes, podem apresentar diversos padrões de respostas, dependendo da espécie estudada. Gatidou & Thomaidis (2007), observaram efeito aditivo da mistura de Irgarol e cobre sobre algas verdes das espécies *Dunaliella tertiolecta* e *Navicula forcipata*. Koutsaftis & Aoyama (2007), observaram efeito sinérgico da mistura binária de Irgarol e Diuron, e Irgarol e cádmio (Cd), e efeito aditivo para misturas de Irgarol e zinco (Zn) e Irgarol e cobre (Cu), em ensaios com microalga *Chaetoceros gracilis*.

Já o efeito antagônico envolvendo o biocida Irgarol, como foi observado no presente estudo, foi relatado por Chesworth et al. (2004), em estudo de mistura binária com o herbicida Diuron, de mesmo modo de ação que o Irgarol, onde observaram efeito menos grave sobre o crescimento da alga *Zostera marina*. Fernández-Alba et al. (2002), também observaram diminuição da toxicidade aguda sobre *Daphnia magna*, em mistura binária de Irgarol e o anti-

incrustante clorotalonil, em exposição de 48h à mistura.

Pérez et al. (2013) evidenciaram que atrazinas, substâncias químicas herbicidas semelhantes ao Irgarol, podem ter seus efeitos tóxicos subestimado quando testados de forma isolada, evidenciando que esses compostos podem causar efeitos sinérgico na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) de peixes da espécie *Danio rerio*, quando combinados com pesticidas, em contraste com os ensaios isolados de atrazina, que aparentemente não causaram efeitos.

As CL_{50-48h} de Irgarol e de LAS isolados para *Artemia* sp., observada no estudo, apresentaram-se acima dos níveis ambientais reportados pela literatura (Diz et al., 2009; Tan et al., 2010; Voulvoulis et al., 2000; Voulvoulis et al., 2002), porém, a mistura binária dos dois compostos pode prever que os efeitos podem ser maiores do que os esperados a partir da toxicidade dos compostos isolados.

O padrão de resposta de sinergismo provoca maiores preocupações devido ao risco aumentado de toxicidade aos organismos expostos, e certamente envolve procedimentos de redução de limites aceitáveis aos químicos envolvidos, como Irgarol e LAS. Porém ambas as respostas foram observadas no trabalho, sinergismo e antagonismo. O antagonismo observado na mistura binária de Irgarol e amônia prevê, portanto, que nas concentrações do estudo o efeito pode se apresentar menor do que o esperado, porém não menos preocupante, já que a amônia pode ser encontrada em regiões costeiras onde atividades antrópicas são mais intensas, podendo ainda interagir com outros químicos presentes no ambiente, como o LAS.

Amônia e LAS ocorrem de forma simultânea em águas residuais, nas quais são lançados através do processo do lançamento de esgoto (Hofer et al., 1995). Hofer et al. (1995) observaram que a mistura de 0,1 mg/L de LAS e 0,7 mg/L amônia não-ionizada pode interferir no crescimento de truta arco-íris, demonstrando que ambos podem atrofiar epitélio branquial e que a presença do LAS diminui a tolerância aos outros estressores.

Os modelos utilizados foram ferramentas importantes para fornecer mais informações sobre a sensibilidade de náuplios de *Artemia* sp. às misturas binárias, mostrando que o padrão de resposta da espécie pode mudar de acordo com o químico combinado com o Irgarol. Além disso outros estudos devem ser complementares à avaliação de efeito do composto sobre a fauna marinha como um todo, ainda pouco elucidados.

Conclusão

Para náuplios de *Artemia* sp. as misturas binárias de Irgarol e amônia e Irgarol e LAS

foram melhor ajustadas no modelo Ação Independente, que prevê que os químicos apresentam modo de ação diferentes. Nos resultados foi observado que a mistura binária de Irgarol e amônia o efeito foi menor do que o esperado quando comparado com os químicos isolados, diferente da mistura de Irgarol e LAS, que resultou num efeito sinérgico.

Referências bibliográficas

- Abessa, D. M. S., Rachid, B. R. F., Moser, G. A. O., Oliveira, A. J. F. C. (2012). Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: Uma revisão. *Mundo Da Saude*.
<http://doi.org/10.15343/0104-7809.2012364643661>
- Abessa, D. M. S. (2002). *Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil*. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, SP.
- Abessa, D. M. S., Carr, R. S., Rachid, B. R. F., Sousa, E. C. P. M., Hortelani, M. a, & Sarkis, J. E. (2005). Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 50(8), 875–85. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.034>
- Abessa, D. M. S., Sousa, E. C. P. M., & Rachid, B. R. F., Mastroti, R. R. (1998). Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a tool in marine sediments contamination assessment. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41(2), 225–30. <http://doi.org/10.1590/S1516-89131998000200009>
- ABNT, N. 15350 (2006). *Ecotoxicologia aquática –Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata: Echinoidea)*.
- Albanis, T. a., Lambropoulou, D. a., Sakkas, V. a., & Konstantinou, I. K. (2002). Antifouling paint booster biocide contamination in greek marine sediments. *Chemosphere*, 48(5), 475–485. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00134-0](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00134-0)
- Alessandra, A. N., Marco, P., Chiara, L., & Annamaria, V. G. (2003). Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 85(4–6), 183–191. <http://doi.org/10.1080/02772240410001665418>
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59(1), 2–20. <http://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.017>
- Altenburger, R., Walter, H., & Grote, M. (2004). What Contributes to the Combined Effect of a Complex Mixture ? What Contributes to the Combined Effect of a Complex Mixture ? *Environmental Science & Technology*, 38(September), 6353–6362. <http://doi.org/10.1021/es049528k>
- Ambrozevicius, A. P., & Abessa, D. M. S. (2008). Acute toxicity of waters from the urban drainage channels of Santos (São Paulo, Brazil). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(2), 108–115.
- Anderson, B., Hunt, J., Phillips, B., Thompson, B., Lowe, S., Taberski, K., & Scott Carr, R. (2007). Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environmental Research*, 105(1), 145–55. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2006.07.005>
- Ankley, G. T., Katko, A., & Arthur, J. W. (1990). Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(3), 313–22. <http://doi.org/10.1002/etc.5620090307>
- Arai, T., Harino, H., Ohji, M., & Langston, W. (2009). *Ecotoxicology of antifouling biocides*. Springer, 437p.
- Araujo, G. S., Moreira, L. B., Morais, R. D., Davanso, M. B., Garcia, T. F., Cruz, a. C. F., & Abessa, D. M. S. (2013). Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixová-Japuí State Park, SP, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 75(1–2), 62–68.

- <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.005>
- Bakirel, T., Keleş, O., Karataş, S., Özcan, M., Türkmen, G., & Candan, A. (2005). Effect of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 71(2), 175–181. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.001>
- Bao, C., & Fang, C. lin. (2007). Water resources constraint force on urbanization in water deficient regions: A case study of the Hexi Corridor, arid area of NW China. *Ecological Economics*, 62(3–4), 508–517. <http://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2006.07.013>
- Bao, V. W. W., Leung, K. M. Y., Qiu, J. W., & Lam, M. H. W. (2011). Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin*, 62(5), 1147–1151. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.041>
- Bao, V. W. W., Lui, G. C. S., & Leung, K. M. Y. (2014). Acute and chronic toxicities of zinc pyrrithione alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 157(3), 81–93. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.09.013>
- Barbieri, E. (2007). Use of metabolism and swimming activity to evaluate the sublethal toxicity of surfactant (LAS-C12) on *Mugil platanus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 101–112.
- Barbieri, E., De Oliveira, I. R., & Serralheiro, P. C. S. (2002). The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (mullet) according to the temperature and salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 277(2), 109–127. [http://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00236-8](http://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00236-8)
- Begliomini, F. N., Maciel, D. C., de Almeida, S. M., Abessa, D. M., Maranhão, L. A., Pereira, C. D. S., ... Castro, Í. B. (2017). Shell alterations in limpets as putative biomarkers for multi-impacted coastal areas. *Environmental Pollution*, 226, 494–503. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.045>
- BLISS, C. I. (1939). the Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Annals of Applied Biology*, 26(3), 585–615. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x>
- Bower, C. E., & Bidwell, J. P. (1978). Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and, salinity. *J. Fish. Res. Board Can*, 35, 1012–1016. <http://doi.org/10.1139/f78-165>
- BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) RESOLUÇÃO CONAMA N° 430, DE 16 DE MAIO DE 2011.
- BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005.
- Camargo, J. B. D. a., Cruz, A. C. F., Campos, B. G., Araújo, G. S., Fonseca, T. G., & Abessa, D. M. S. (2014). Use, development and improvements in the protocol of whole-sediment toxicity identification evaluation using benthic copepods. *Marine Pollution Bulletin*. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.015>
- Castro, Í. B., Westphal, E., & Fillmann, G. (2011). Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, 34(6), 1021–1031. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600020>
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Sørensen, H., & Streibig, J. C. (2007). Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 149–156. <http://doi.org/10.1897/06-196R.1>
- Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C., & Wood, R. J. K. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201(6), 3642–3652. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.08.129>
- Chen, J. C., Chen, K. J., & Liao, J. M. (1989). Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 77(4), 329–336. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90217-2](http://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90217-2)
- Chesworth, J. C., Donkin, M. E., & Brown, M. T. (2004). The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic Toxicology*, 66(3), 293–305.

- <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.002>
- Christoffersen, K., Hansen, B. W., Johansson, L. S., & Krog, E. (2003). Influence of LAS on marine calanoid copepod population dynamics and potential reproduction. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 405–416. [http://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00200-X](http://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00200-X)
- Comber, S. D. W., Gardner, M. J., Boxal, A. B. A (2002). Survey of four marine antifoulant constituents (copper, zinc, diuron and Irgarol 1051) in two UK estuaries. *Journal of Environmental Monitoring*, 4(3), 417–425.
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>
- Diniz, L. G. R., Jesus, M. S., Dominguez, L. A. E., Fillmann, G., Vieira, E. M., & Franco, T. C. R. S. (2014). First appraisal of water contamination by antifouling booster biocide of 3rd generation at itaquí harbor (São Luiz - Maranhão - Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(2), 380–388. <http://doi.org/10.5935/0103-5053.20130289>
- Diz, F. R., Araújo, C. V. M., Moreno-Garrido, I., Hampel, M., & Blasco, J. (2009). Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*: Lethal and reproductive endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1881–1886. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.004>
- Evans, S. M., Birchenough, A. C., & Brancato, M. S. (2000). The Tbt Ban: Out of the Prying Pan Into the Fire? *Marine Pollution Bulletin*, 40(3), 204–211.
- Farré, M., Asperger, D., Kantiani, L., González, S., Petrovic, M., & Barceló, D. (2008). Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8), 1999–2007. <http://doi.org/10.1007/s00216-007-1779-9>
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140–141, 353–365. [http://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00032-8](http://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00032-8)
- Fernández-Alba, a R., Piedra, L., Mezcuá, M., & Hernando, M. D. (2002). Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *TheScientificWorldJournal*, 2, 1115–1120. <http://doi.org/10.1100/tsw.2002.221>
- Fernandez, M. A., & Pinheiro, F. M. (2007). New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *International Journal of Environment and Health*, 1(3), 427. <http://doi.org/10.1504/IJENVH.2007.017875>
- Gatidou, G., Kotrikla, A., Thomaidis, N. S., & Lekkas, T. D. (2004). Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography-diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, 505(1), 153–159. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00412-4](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00412-4)
- Gatidou, G., & Thomaidis, N. S. (2007). Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquatic Toxicology*, 85(3), 184–191. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.09.002>
- Gatidou, G., Thomaidis, N. S., & Zhou, J. L. (2007). Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. *Environment International*, 33(1), 70–77. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2006.07.002>
- Godoi, A. F. L., Favoreto, R., & Santiago-Silva, M. (2003). Contaminação ambiental por compostos organoestênicos. *Química Nova*, 26(5), 708–716. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500015>
- Gubitoso, S., Duleba, W., Teodoro, A. C., Prada, S. M., & Rocha, M. M. (2008). Estudo geoambiental da região circunjacente ao emissário submarino de esgoto do Araçá, São Sebastião (SP), 38(3), 467–475.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed spearman- karber method for estimating

- median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11(1), :714-719.
- Hewlett, P., & Plackett, R. (1959). A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics*, 15(4), 591–610. <http://doi.org/10.2307/2528496>
- Hofer, R., Jeney, Z., & Bucher, F. (1995). Chronic effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry at water criteria limits. *Water Research*, 29(12), 2725–2729. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00143-9](http://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00143-9)
- Huang, Y., Yang, F., Ai, L., Feng, M., Wang, C., Wang, Z., & Liu, J. (2017). On the kinetics of organic pollutant degradation with Co²⁺/peroxymonosulfate process: When ammonium meets chloride. *Chemosphere*, 179, 331–336. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.110>
- Ip, Y. K., Chew, S. F., & Randall, D. J. (2001). Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiology*, 20(C), 109–148. [http://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)20005-3](http://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20005-3)
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 61(1), 95–110. <http://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>
- Jonker, M. J., Svendsen, C., Bedaux, J. J. M., Bongers, M., & Kammenga, J. E. (2005). Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 24(10), 2701–2713. <http://doi.org/10.1897/04-431r.1>
- Jung, S. M., Bae, J. S., Kang, S. G., Son, J. S., Jeon, J. H., Lee, H. J., ... Shin, H. W. (2017). Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 811–818. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.047>
- Konstantinou, I. K., & Albanis, T. a. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: A review. *Environment International*, 30(2), 235–248. [http://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](http://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4)
- Koutsaftis, a., & Aoyama, I. (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*, 387(1–3), 166–174. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.023>
- Landau, Matthew; Sanchez, V. (1991). Effect of pH and Decapsulation on the Toxicity of Ammonia to the Brine Shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22(3), 178–182.
- Lara-Martín, P. a, González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., & Brownawell, B. J. (2014). Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *Marine Pollution Bulletin*, 85(2), 710–9. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.022>
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35–49. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>
- Liwerska-bizukojc, E., Miksch, K., Malachowska-jutysz, A., & Kalka, J. (2005). Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere*, 58, 1249–1253. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.031>
- Loewe, S., & Muischnek, H. (1926). Über Kombinationswirkungen [On Combination Effects]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 114(5), 313–326. <http://doi.org/10.1007/BF01952257>
- Lotufo, G & Abessa, D (2002). Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. Nascimento, IA; Sousa, ECPM; Nipper, M. Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 151–162.
- Manfra, L., Canepa, S., Piazza, V., & Faimali, M. (2016). Lethal and sublethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and an ecotoxicological concern organic compound. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123(c), 60–64. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.017>

- Mastroti, R.R. (1997). Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. Master Theshis, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 112 p.
- Mastroti, R. R., Sousa, E. C. P. M. De, Abessa, D. M. D. S., & Sass, V. (1998). Avaliação preliminar da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. *Brazilian Journal of Oceanography*, 46(2), 187–193. <http://doi.org/10.1590/S1679-87591998000200007>
- McClanahan, T. R., & Muthiga, N. A. (2001). *The ecology of Echinometra. Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 32). Elsevier Science B.V. [http://doi.org/10.1016/S0167-9309\(01\)80015-6](http://doi.org/10.1016/S0167-9309(01)80015-6)
- Moore, D. W., Bridges, T. S., Gray, B. R., & Duke, B. M. (1997). Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(5), 1020–1027. [http://doi.org/10.1897/1551-5028\(1997\)016<1020:ROATDS>2.3.CO;2](http://doi.org/10.1897/1551-5028(1997)016<1020:ROATDS>2.3.CO;2)
- Norbert-King, T.J. (1993). A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach (Version 2.0). USEPA, Duluth Minnesota., Tech. Rept. 03-93, National Effluent Toxicity Assessment Center, 25 p.
- Panagoula, B., Panayioti, M., & Iliopoulou-Georgudaki, J. (2002). Acute toxicity of TBT and IRGAROL in *Artemia salina*. 3, 21(3), 231–233. <http://doi.org/10.1080/10915810290096360>
- Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2013). Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4671–4680. <http://doi.org/10.1007/s11356-012-1443-6>
- Pérez, J., Domingues, I., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2011). Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): A bottom-up approach using binary mixtures. *Ecotoxicology*, 20(6), 1167–1175. <http://doi.org/10.1007/s10646-011-0661-x>
- Pérez, J., Monteiro, M. S., Quintaneiro, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2013). Characterization of cholinesterases in *Chironomus riparius* and the effects of three herbicides on chlorpyrifos toxicity. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 296–302. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.014>
- Perina, F. C., De Souza Abessa, D. M., Pinho, G. L. L., & Fillmann, G. (2011). Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology*, 20(8), 1870–1880. <http://doi.org/10.1007/s10646-011-0725-y>
- Phyu, Y. L., Palmer, C. G., Warne, M. S. J., Hose, G. C., Chapman, J. C., & Lim, R. P. (2011). A comparison of mixture toxicity assessment: Examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia dubia*. *Chemosphere*, 85(10), 1568–1573. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.061>
- Romano, N., & Zeng, C. (2007). Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymph osmolality, ammonia-N, pH and ionic composition of early juvenile mud crabs, *Scylla serrata* (Forskål). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(2), 278–285. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.04.018>
- Rosety, M., Ordóñez, F. J., Rosety-Rodríguez, M., Rosety, J. M., Rosety, I., Carrasco, C., & Ribelles, A. (2001). Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. *Histology and Histopathology*, 16(3), 839–843.
- Rachid, B. R. F. (2002). *Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista, SP*. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, SP.
- Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 15. <http://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Seriani, R.; Silveira, F.L.; Romano, P.; Pinna, F.V.; Abessa, D. (2006). Toxicidade de água e sedimentos e

- comunidade bentônica do estuário do rio Itanhaém , SP , Brasil : bases para a educação ambiental Water toxicity and sediments and benthic community from the estuary of the Itanhaém river , (SP Brazil): basis for environ. *O Mundo Da Saúde*, 30(4), 628–633.
- Sibila, M. A., Garrido, M. C., Perales, J. A., & Quiroga, J. M. (2008). Ecotoxicity and biodegradability of an alkyl ethoxysulphate surfactant in coastal waters. *Science of the Total Environment*, 394(2–3), 265–274. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.01.043>
- Sousa, E. C. P. M., Zaroni, L. P., Bergmann Filho, T. U., Marconato, L. a., Kirschsbaum, A. a., & Gasparro, M. . (2012). Acute sensitivity to Nitokra sp benthic copepod to potassium dichromate and ammonia chloride. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7(1), 75–81. <http://doi.org/10.5132/jbse.2012.01.011>
- Stasinakis, A. S., Mamais, D., Thomaidis, N. S., Danika, E., Gatidou, G., & Lekkas, T. D. (2008). Inhibitory effect of triclosan and nonylphenol on respiration rates and ammonia removal in activated sludge systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(2), 199–206. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.011>
- Subtil, E. L. (2012). Tratamento de águas residuárias utilizando emissários submarinos: avaliação do nível de tratamento para uma disposição oceânica ambientalmente segura, 218 p.
- Svensson, B. M., Mathiasson, L., Mårtensson, L., & Bergström, S. (2005). *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. *Environmental Monitoring and Assessment*, 102(1–3), 309–321. <http://doi.org/10.1007/s10661-005-6029-z>
- Tan, X., Yim, S. Y., Uppu, P., & Kleinow, K. M. (2010). Enhanced bioaccumulation of dietary contaminants in catfish with exposure to the waterborne surfactant linear alkylbenzene sulfonate. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 300–308. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.008>
- Thomas, K. V., Blake, S. J., Waldock, M. J. (2000). Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 40(9), 739–745. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00134-0](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00134-0)
- Veiga, LF & Vital, N (2002). Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. Pp 111-122. In: Nascimento, I. A., Sousa, E. C. P. M., Nipper, M. (Ed.). Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. v. 1. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, 262 p.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2000). Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11), 938–946. [http://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00034-5](http://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00034-5)
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2002). Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints. *Chemosphere*, 47(7), 789–795. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00336-8](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00336-8)
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), 75–104. <http://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>
- Young, P., Byrne, G., & Cotterell, M. (1997). Manufacturing and the environment. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 13(7), 488–493. <http://doi.org/10.1007/BF01624609>
- Zagatto, P.A. & Bertoletti, E. (2006). Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações. 2º Edição. Editora Rima, 472p.
- Zhou, J L. (2008). Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England. *Science of the Total Environment*, 406(1-2), 239-246.

Anexo 1

Tabela 5 – Valores das concentrações de efeito à exposição às substâncias de referência, para teste de sensibilidade dos lotes dos organismos

Sensibilidade à substância de referência		
Organismo	CL/CE (mg/L)	Substância
<i>Artemia</i> sp.	25,16 (24h) 15,9 (48h)	DSS
<i>Nitocra</i> sp.	13,33 (96h)	K ₂ Cr ₂ O ₇
<i>E.lucunter</i>	0,51 (42h)	ZnSO ₄

Anexo 2
Artemia sp.

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos ensaio isolado com amônia - *Artemia* sp..

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	<LD	<LD	25	8,19	35	6,5	Inicial
1	3,20	32,79	25	8,16	35	7,1	
10	0,23	1,21	25	7,86	35	7	
100	0,59	3,20	25	7,88	35	7	
1000	4,47	6,83	25	7,33	35	7	
10000	55,50	0,82	25	5,27	32	7,4	
Controle	<LD	<LD	25	7,7	35	8,5	Final
1	1,84	10,88	25	7,92	35	7,80	
10	0,23	0,38	25	7,37	35	7,80	
100	0,50	1,51	25	7,63	36	8,00	
1000	0,37	15,93	25	7,77	33	8,00	
10000	1,02	3,60	25	5,69	35	8,50	

Tabela 7 – Parâmetros físico-químicos ensaio isolado com LAS - *Artemia* sp..

LAS (mg/L)	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	0,24108	0,128	25	6,87	36	6	Inicial
0,081	<LD	<LD	25	7,25	34	6	
0,81	<LD	<LD	25	7,26	34	5,8	
8,1	<LD	<LD	25	7,2	36	6	
81	<LD	<LD	25	7,14	36	6	
810	<LD	<LD	25	5,91	36	6	
Controle	<LD	<LD	25	7,31	37	6,30	Final
0,081	<LD	<LD	25	7	36	6,40	
0,81	<LD	<LD	25	7,11	36	6,00	
8,1	<LD	<LD	25	6,9	36	6,00	
81	<LD	<LD	25	6,87	36	6,40	
810	<LD	<LD	25	6,84	36	6,50	

Tabela 8 – Parâmetros físico-químicos ensaio isolado com Irgarol - *Artemia* sp..

Concentrações Irgarol (mg/L)	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	<LD	<LD	25	8,11	35	4,1	Inicial
Controle Acetona	nd	nd	25	8,08	37	4,1	
0,001	<LD	nd	25	nd	37	nd	
0,01	<LD	<LD	25	8,05	36	5	
0,1	<LD	<LD	25	8,06	36	4,6	
1	<LD	<LD	25	8,1	36	4,5	
10	<LD	<LD	25	8,09	37	4,4	
Controle	nd	nd	25	7,62	35	5,90	Final
Controle Acetona	nd	nd	25	7,7	37	6,20	
0,001	nd	nd	25	6,81	37	6,20	
0,01	nd	nd	25	7,83	35	6,10	
0,1	nd	nd	25	7,78	35	5,40	
1	nd	nd	25	7,82	35	6,70	
10	nd	nd	25	7,86	37	6,60	

nd = não disponível

Nitocra sp.

Tabela 9 - Parâmetros físico-químicos ensaio isolado com amônia – *Nitocra* sp.

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	2,29	2,65	25	7,16	17	6,2	Inicial
0,01	-0,62	-0,32	25	6,81	17	5,7	
0,1	0,78	0,53	25	6,93	17	5,8	
1	5,75	1,76	25	6,58	17	5,7	
10	30,30	34,35	25	7,15	17	5,4	
100	107,11	96,49	25	7,05	17	5	
Controle	6,20	5,85	25	7,07	17	6,00	Final
0,01	2,15	0,99	25	6,76	17	6,80	
0,1	1,30	1,04	25	7	17	6,80	
1	4,27	5,18	25	7,18	17	6,80	
10	28,36	21,75	25	6,98	17	6,70	
100	108,62	75,97	25	6,94	17	5,90	

Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos ensaio crônico isolado com LAS – *Nitocra* sp.

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	<LD	<LD	25	6,54	18	4,9	Inicial
0,081	<LD	<LD	25	6,29	18	4,9	
0,81	<LD	<LD	25	6,74	17	5,1	
8,1	<LD	<LD	25	6,76	17	5	
81	<LD	<LD	25	6,79	17	5,2	
810	<LD	<LD	25	6,99	17	5	
Controle	<LD	<LD	25	6,75	17	5,8	Final
0,081	<LD	<LD	25	6,65	17	5,80	
0,81	<LD	<LD	25	6,57	17	6,10	
8,1	<LD	<LD	25	6,58	17	6,20	
81	<LD	<LD	25	6,43	17	5,90	
810	<LD	<LD	25	6,5	17	6,00	

Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos ensaio crônico isolado com Irgarol – *Nitocra* sp.

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	<LD	<LD	25	7,67	19	4,9	Inicial
Controle Acetona	<LD	<LD	25	7,97	19	4,9	
0,001	<LD	<LD	25	8,16	19	5,1	
0,01	<LD	<LD	25	7,56	19	5	
0,1	<LD	<LD	25	7,61	19	5,2	
1	<LD	<LD	25	7,33	19	5	
10	<LD	<LD	25	7,6	18	5,2	
Controle	1,318	0,431	25	6,61	19	4,90	Final
Controle Acetona	1,110	0,132	25	6,17	19	5,10	
0,001	<LD	<LD	25	6,52	19	4,90	
0,01	0,792	0,319	25	6,7	19	5,10	
0,1	1,498	0,437	25	6,56	19	4,90	
1	<LD	<LD	25	6,65	20	4,90	
10	<LD	<LD	25	6,55	18	6,80	

Echinometra lucunter

Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos ensaio crônico amônia – *E. lucunter*

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD
Controle	<LD	<LD	25	7,13	38	5,8
0,01	2,47	1,94	25	7,04	36	5,7
0,1	1,00	0,63	25	6,94	36	6
1	3,20	2,40	25	7,02	36	5,8
10	8,06	7,96	25	7,14	36	5,9
100	100,00	79,00	25	7,04	36	5,8

Tabela 13 - Parâmetros físico-químicos ensaio crônico LAS – *E. lucunter*

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD
Controle	<LD	<LD	25	7,49	37	5,6
0,081	<LD	<LD	25	7,25	37	6,3
0,81	<LD	<LD	25	6,35	37	5,4
8,1	<LD	<LD	25	7,25	37	5
81	<LD	<LD	25	7,48	37	5,7
810	<LD	<LD	25	7,49	37	5,4

Tabela 14 - Parâmetros físico-químicos ensaio crônico Irgarol – *E. lucunter*

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD
Controle	<LD	<LD	25	7,3	36	5,6
C acetona	<LD	<LD	25	7,4	33	5,3
0,1	<LD	<LD	25	7,5	38	5,8
1	<LD	<LD	25	7,46	38	6,4
10	<LD	<LD	25	7,46	38	5,3
100	<LD	<LD	25	7,51	38	5,5
1000	<LD	<LD	25	7,36	38	5,6

Tabela 15 – Parâmetros físico-químicos iniciais dos ensaios agudos com misturas binárias de Irgarol com amônia, com náuplios de *Artemia* sp..

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD	
Controle	<LD	<LD	25	7,82	35	4,7	inicial
Controle Acet 250µL	<LD	<LD	25	7,93	36	4,5	
Irgarol 0,001 mg/L	9,08100	49,070	25	7,88	35	4,7	
Irgarol 0,01 mg/L	5,30100	33,622	25	7,95	35	4,2	
Irgarol 0,1 mg/L	0,68850	4,571	25	7,97	36	4,9	
Irgarol 1 mg/L	0,62100	4,219	25	7,98	36	5,4	
Irgarol 10 mg/L	0,41850	2,422	25	7,91	37	6,7	
Amônia 1 mg/L	19,22850	116,503	25	6,63	44	7,10	
Amônia 10 mg/L	57,09600	353,946	25	7,23	38	5,70	
Amônia 100 mg/L	54,01350	232,094	25	7,78	35	6,30	
Amônia 1000 mg/L	339,43500	412,345	25	7,94	36	6,70	
Amônia 10000mg/L	4602,60000	1405,732	25	7,93	35	5,60	
M1	5189,85000	1905,581	25	6,71	44	6,30	
M2	395,23500	427,974	25	7,18	38	4,80	
M3	13,37850	41,695	25	7,64	36	4,20	
M4	54,98100	297,092	25	7,88	36	4,50	
M5	17,54100	90,540	25	7,86	36	4,30	
M6	5259,60000	1761,324	25	6,67	42	4,70	
M7	371,38500	461,654	25	7,24	37	4,50	
M8	31,91850	90,748	25	7,6	36	4,80	
M9	51,02100	245,857	25	7,83	35	5,00	
M10	19,16100	98,901	25	7,86	35	5,00	
M11	5738,85000	2310,373	25	6,75	43	4,90	
M12	169,56000	167,466	25	7,14	37	3,50	
M13	16,01100	49,899	25	7,64	36	3,60	
M14	24,53850	115,566	25	7,82	35	3,40	
M15	16,23600	93,970	25	7,91	35	4,30	
M16	4769,10000	1833,587	25	6,73	42	3,30	
M17	161,68500	159,688	25	7,14	37	6,60	
M18	24,51600	71,321	25	7,61	35	5,70	
M19	65,93850	283,335	25	7,78	35	5,70	
M20	9,86850	55,824	25	7,9	35	6,60	
M21	3866,85000	1127,880	25	6,61	35	6,50	
M22	339,66000	313,095	25	7,11	38	6,00	
M23	29,82600	90,845	25	7,63	36	6,30	
M24	10,54350	15,753	25	7,32	36	6,40	
M25	14,99850	82,922	25	7,89	36	6,30	

Tabela 16 – Parâmetros físico-químicos finais dos ensaios agudos com misturas binárias de Irgarol com amônia, em náuplios de *Artemia* sp..

Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura	pH	Salinidade	OD
Controle	0,02087	0,036	25	7,67	35	3,9
Controle Acet 250 µl	<LD	<LD	25	7,97	35	4,6
Irgarol 0,001 mg/L	0,40957	1,087	25	7,57	35	3,7
Irgarol 0,01 mg/L	<LD	<LD	25	7,52	35	3,9
Irgarol 0,1 mg/L	<LD	<LD	25	7,58	36	4
Irgarol 1 mg/L	<LD	<LD	25	7,35	35	4
Irgarol 10 mg/L	1,21565	2,506	25	7,46	37	4,2
Amonia 1 mg/L	4,78696	1,872	25	7,49	35	4,30
Amônia 10 mg/L	<LD	<LD	25	7,35	35	4,80
Amônia 100 mg/L	3,01304	<LD	25	7,53	35	4,70
Amônia 1000 mg/L	0,84783	4,118	25	7,08	38	4,20
Amônia 10000 mg/L	247,69565	84,879	25	6,68	37	4,00
M1	205,69565	57,298	25	6,59	42	3,90
M2	0,56087	0,366	25	6,96	37	3,90
M3	<LD	<LD	25	7,21	36	4,10
M4	2,99217	4,681	25	7,34	36	4,20
M5	0,76304	1,309	25	7,38	35	4,10
M6	172,69565	63,409	25	6,71	42	4,00
M7	0,80870	0,960	25	7,22	37	3,80
M8	<LD	<LD	25	7,29	36	3,90
M9	2,60609	4,574	25	7,39	35	3,90
M10	1,21565	3,301	25	7,58	35	3,90
M11	111,00000	33,902	25	6,63	42	4,10
M12	0,33913	0,227	25	6,97	37	4,20
M13	<LD	<LD	25	7,18	36	3,80
M14	2,89043	5,435	25	7,42	35	3,90
M15	0,75652	1,671	25	7,49	35	3,70
M16	142,56522	52,346	25	6,71	42	4,00
M17	2,19130	1,366	25	6,94	36	3,80
M18	<LD	<LD	25	6,69	36	3,80
M19	2,71826	0,707	25	6,56	35	3,70
M20	0,88435	1,552	25	7,39	35	3,90
M21	66,00000	15,292	25	6,51	42	4,20
M22	0,13043	0,029	25	6,49	37	4,20
M23	0,21522	0,102	25	6,82	36	4,00
M24	2,43652	1,744	25	7	35	3,80
M25	2,89565	4,326	25	7,32	35	3,80

Final

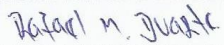
Tabela 17 – Parâmetros físico-químicos iniciais dos ensaios agudos com *Artemia* sp. de misturas binárias de Irgarol com LAS *Artemia* sp..

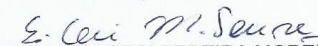
Amostra	Amônia Total (mg/L)	Amônia Não Ionizada (Ug/L)	Temperatura °C	pH	Salinidade	OD
C	<LD	<LD	25	7,21	34	7,2
CA	<LD	<LD	25	7,74	35	6,5
Irgarol 0,001 m/g/l	<LD	<LD	25	7,45	34	6,7
Irgarol 0,01 mg/L	<LD	<LD	25	7,7	34	6,5
Irgarol 0,1 mg/L	<LD	<LD	25	7,73	34	6,7
Irgarol 1 mg/L	<LD	<LD	25	7,71	34	6,9
Irgarol 10 mg/L	<LD	<LD	25	7,74	35	7,3
LAS 0,081 mg/L	<LD	<LD	25	7,68	33	7,4
LAS 0,81 mg/L	<LD	<LD	25	7,7	33	7,3
LAS 8,1 mg/L	<LD	<LD	25	7,71	33	6,2
LAS 81 mg/L	<LD	<LD	25	7,3	33	7,2
LAS 810	<LD	<LD	25	2,23	33	6,3
M1	<LD	<LD	25	2,02	35	6,60
M2	<LD	<LD	25	6,75	35	6,70
M3	<LD	<LD	25	7,28	35	6,70
M4	<LD	<LD	25	6,76	35	6,50
M5	<LD	<LD	25	7,4	35	7,10
M6	<LD	<LD	25	2,35	35	7,50
M7	<LD	<LD	25	6,87	34	6,30
M8	<LD	<LD	25	7,08	35	6,50
M9	<LD	<LD	25	7,45	35	6,80
M10	<LD	<LD	25	7,54	35	6,40
M11	<LD	<LD	25	2,3	35	7,90
M12	<LD	<LD	25	7,02	35	6,7
M13	<LD	<LD	25	7,58	34	6,8
M14	<LD	<LD	25	7,7	34	6
M15	<LD	<LD	25	7,72	34	6,2
M16	<LD	<LD	25	2,51	35	7,2
M17	<LD	<LD	25	6,64	35	7,1
M18	<LD	<LD	25	7,15	35	6,3
M19	<LD	<LD	25	7,46	35	6,3
M20	<LD	<LD	25	7,65	35	6,7
M21	<LD	<LD	25	1,81	63	6,3
M22	<LD	<LD	25	6,89	35	6,5
M23	<LD	<LD	25	7,2	35	6,5
M24	<LD	<LD	25	7,49	35	6,9
M25	<LD	<LD	25	7,64	35	7,1

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GUACIRA DE FIGUEIREDO EUFRÁSIO PAULY, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE AQUÁTICA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Salão Nobre do Instituto de Biociências - UNESP/CLP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA - Orientador(a) do(a) Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP, Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE do(a) Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP, Profa. Dra. EDUINETTY CECI PEREIRA MOREIRA DE SOUSA do(a) Instituto Oceanográfico / USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GUACIRA DE FIGUEIREDO EUFRÁSIO PAULY, intitulada **Avaliação da toxicidade de misturas: Irgarol e contaminantes ambientais comumente observados em áreas costeiras**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA


Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE


Profa. Dra. EDUINETTY CECI PEREIRA MOREIRA DE SOUSA