



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E EFEITO EM
Crassostrea rhizophorae EXPOSTAS AOS BIOCIDAS
CLOROTALONIL E DCOIT**

RÔMULO SAMPAIO PINHEIRO

São Luís/MA
2020

RÔMULO SAMPAIO PINHEIRO

**BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E EFEITO EM
Crassostrea rhizophorae EXPOSTAS AOS BIOCIDAS
CLOROTALONIL E DCOIT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marianna Basso Jorge
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos

São Luís/MA

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

PINHEIRO, ROMULO SAMPAIO.

BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E EFEITO EM *Crassostrea rhizophorae* EXPOSTAS AOS BIOCIDAS CLOROTALONIL E DCOIT / ROMULO SAMPAIO PINHEIRO / ROMULO SAMPAIO PINHEIRO. - 2020. 76 f.

Coorientador(a): RICARDO LUVISOTTO SANTOS.

Orientador(a): MARIANNA BASSO BASSO.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Conservação/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2020.

1. Acetilcolinesterase. 2. Biocidas antiincrustantes. 3. Glutathione-S-transferase. 4. Lipoperoxidação. 5. Ostra. I. BASSO, MARIANNA BASSO. II. SANTOS, RICARDO LUVISOTTO. III. Título.

RÔMULO SAMPAIO PINHEIRO

**BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E EFEITO EM
Crassostrea rhizophorae EXPOSTAS AOS BIOCIDAS
CLOROTALONIL E DCOIT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marianna Basso Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (Examinadora Interna)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof^a. Dr^a. Camila De Martinez Gaspar Martins (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

AGRADECIMENTOS

Quero iniciar estendendo os meus sinceros agradecimentos à Professora Dra Mariana Basso Jorge, pelo exemplo de professora/pesquisadora, pela orientação, pela oportunidade e acolhimento durante todas as etapas desta pesquisa;

Aos meus colegas de turma, amigos mais próximos e familiares que foram importantes nesse processo de construção teórica;

Ao Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox) da UFMA e aos colaboradores que contribuíram na execução desta pesquisa;

Ao Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia (CONECO) do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG);

Ao Laboratório de Fisiologia da UFMA (LEFisio) e

Ao Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Agradeço, também, o apoio dos órgãos financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; Financiadora de Inovação e Pesquisa – FINEP; Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA pela concessão da bolsa.

RESUMO

Os efeitos dos biocidas clorotalonil e DCOIT foram avaliados em juvenis de *Crassostrea rhizophorae* através da exposição aguda (96 horas) a concentrações sub-letais (0,1 µg/L e 10 µg/L). A toxicidade foi investigada por meio da verificação de alterações bioquímicas como capacidade de biotransformação dos compostos (atividade da glutathione-S-transferase-GST), danos oxidativos (lipoperoxidação-LPO) e distúrbios colinérgicos (atividade da acetilcolinesterase-AChE) em tecidos de brânquias, músculo adutor e glândula digestiva das ostras expostas. Os resultados obtidos permitem inferir que os compostos estudados são tóxicos e possuem efeitos nocivos para o organismo em questão, dados confirmados por meio das alterações na capacidade de biotransformação, pelo aumento da peroxidação lipídica e inibição do sistema colinérgico. Conclui-se, portanto, que os compostos testados promovem efeitos prejudiciais à espécie estudada, que podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental. Além disso, os resultados confirmam o potencial uso da espécie *Crassostrea rhizophorae* como organismo monitor para análise destes biomarcadores frente a possíveis contaminações por clorotalonil e DCOIT. Cabe salientar que os efeitos destes biocidas devem ser investigados ainda, a fim de aprofundar o conhecimento a respeito dos mecanismos de como estes biocidas agem, causando danos aos organismos.

Palavras-chave: biocidas anti-incrustantes; glutathione-S-transferase; lipoperoxidação; acetilcolinesterase; biomarcadores bioquímicos; ostra.

ABSTRACT

The effects of chlorothalonil and DCOIT biocides were evaluated in juveniles of *Crassostrea rhizophorae* through acute exposure (96 horas) to sublethal concentrations (0.1 µg/L and 10 µg/L). Toxicity was investigated by checking biochemical changes such as biotransformation capacity (glutathione S-transferase-GST activity), oxidative damage (lipoperoxidation-LPO) and cholinergic disorders (acetylcholinesterase-AChE activity) in gills, adductor muscle, and digestive gland tissue. The results showed that both compounds are toxic to oysters, leading to alterations in biotransformation capacity, an increase in lipid peroxidation and inhibition of the cholinergic system. Therefore, it is concluded that both compounds promote harmful effects to the studied species, which can be used as biomarkers of environmental contamination. In addition, the results confirm the potential use of *Crassostrea rhizophorae* as a monitoring organism for the analysis of these biomarkers in the environment. Moreover, it should be emphasized, the need for further studies in order to elucidate the biocides mode of actions.

Keywords: antifouling biocides; glutathione S-transferase; lipoperoxidation; acetylcholinesterase; biochemical biomarkers; oyster.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE – enzima acetilcolinesterase

ANOVA – análise de variância

BHT – hidroxitolueno butilado

CAT – catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno DMSO - dimetilsulfóxido

DTNB – ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico g – grama

g/kg – grama por quilograma

GPX – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione em sua forma reduzida

GST – enzima glutathione S-transferase

KCl – cloreto de potássio

KOW - coeficiente de partição n-octanol-água

L - litro

LPO – lipoperoxidação

M – molar

MDA - malondialdeído

mg – miligrama

mg/kg – miligrama por quilograma

mg/mL – miligrama por mililitro

mL - mililitro

mM – milimolar

MMA – Ministério do Meio Ambiente

NADPH – β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

nM – nanomolar

nmol – nanomol

SDS – dodecil sulfato de sódio

PCBs – bifenilas policloradas

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

PMSF – fenil metil sulfonil fluoreto

p:v – proporção peso por volume

SDS – dodecil sulfato de sódio

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico

USEPA – agência de proteção ambiental dos Estados Unidos

μL – microlitro

μmol – micromol

μg/g – micrograma por grama

μM – micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figuras Capítulo I: Apresentação geral

Figura 1. Esquema simplificado do sistema de biotransformação de xenobióticos e efeitos negativos do desbalanço oxidativo.

Figura 2. Esquema representativo da peroxidação lipídica, enfocando as principais substâncias formadas e processos de avaliação.

Figura 3. Esquema de ação da enzima acetilcolinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figuras Capítulo II: Artigo científico

Figura 2. Glutathione-S-transferase – GST ($\mu\text{mol CDNB/min/mg}$ proteína) em músculo adutor, brânquias e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostos ao clorotalonil. Grupos experimentais: (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (C1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil; e (C2) 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 2. Glutathione-S-transferase – GST ($\mu\text{mol CDNB/min/mg}$ proteína) em músculo adutor de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* exposto ao DCOIT. Grupos experimentais: (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (D1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT; e (D2) 10 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 3. Lipoperoxidação – LPO (nmol MDA/mg proteína) em músculo adutor, brânquias e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostos ao clorotalonil. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (C1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil e (C2) 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 4. Lipoperoxidação – LPO (nmol MDA/mg proteína) em músculo adutor, brânquias e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostos ao DCOIT. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (D1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT e 10 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados

como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 5. Atividade da Acetilcolinesterase – AChE (μmol tiocolina/min/mg proteína) em músculo adutor de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* exposto ao clorotalonil. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (C1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil e (C2) 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 6. Atividade da Acetilcolinesterase – AChE (μmol tiocolina/min/mg proteína) em músculo adutor de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* exposto ao DCOIT. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (D1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT e (D2) 10 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Apresentação geral	13
1.1 INTRODUÇÃO	13
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.2.1 Contaminação aquática	15
1.2.2 Organismo teste	17
1.2.3 Clorotalonil	18
1.2.4 DCOIT	19
1.2.5 Biomarcadores	20
1.2.5.1 Biomarcadores bioquímicos (GST, LPO e AChE) em ostras	25
1.3. OBJETIVOS	27
1.3.1. Objetivo geral	27
1.3.2. Objetivos específicos	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II: Artigo Científico	39
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	44
Coleta e aclimação	44
Desenho experimental e ensaios ecotoxicológicos	44
Obtenção dos tecidos e preparo das amostras	45
Quantificação dos biomarcadores	46
Glutationa S-transferase (GST)	46
Lipoperoxidação (LPO)	46
Acetilcolinesterase (AChE)	47
Proteínas totais	47
Análises estatísticas	48
RESULTADOS	49
Glutationa-S-Transferase (GST)	49
Lipoperoxidação (LPO)	49
Acetilcolinesterase (AChE)	50
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÕES	56

AGRADECIMENTOS	57
REFERÊNCIAS.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76

CAPÍTULO I - Apresentação geral

1.1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de diferentes fontes de contaminantes, que contribuem para que estes ambientes sejam altamente impactados. Em regiões estuarinas as principais fontes de impacto ambiental são o esgoto proveniente de áreas urbanas e industriais, a drenagem da bacia hidrográfica adjacente, atividades industriais, portuárias e agriculturas, além o fluxo de embarcações (KENNISH, 1991).

Neste contexto, surge uma nova fonte potencial de contaminação, os biocidas, que são utilizados tanto na agricultura quanto na composição de tintas anti-incrustantes para combater a incrustação de organismos aquáticos. A bioincrustação, é compreendida pela instalação e crescimento sucessivo de microrganismos, algas e animais marinhos em superfícies externas de objetos naturais ou artificiais submersos ou semi-submersos em ambientes aquáticos, o que atualmente é considerado um grave problema à indústria naval (DAFFORN *et al.*, 2011).

Desta forma, os biocidas têm se tornado uma categoria de contaminantes cada vez mais presentes no ambiente, podendo ser tóxicos e causar diversos danos a biota aquática (CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011). Alguns desses biocidas, tais como o clorotalonil e DCOIT, tem tido suas concentrações aumentadas no ambiente (VOULVOULIS; SCRIMSHAW; LESTER, 2000; LEE *et al.*, 2011; HARINO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015) o que leva a uma maior preocupação em relação a seus efeitos a biota aquática.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo central investigar os efeitos sub-letais do clorotalonil e DCOIT em ostras juvenis. As ostras são organismos com elevada capacidade de filtração, e com características importantes de espécie sentinela, úteis no monitoramento da poluição e em estudos de impacto. Isto porque possuem ampla distribuição, hábito sésil e elevada capacidade de concentração de produtos químicos presentes na água (SUNILA, 1987). Além disso, esses organismos representam importante fonte de alimento nas áreas costeiras de todo o Brasil (SILVA *et al.*, 2006).

Atualmente, os estudos de monitoramento ambiental têm se valido do uso de ferramentas, tais como biomarcadores, que expressam danos biológicos sub-letais ao organismo monitor. Essas ferramentas, além de subsidiar outros estudos (AMORIM, 2003), podem indicar que o organismo monitor foi exposto a um composto específico (biomarcadores de exposição), ou sofreu danos frente a alguma exposição (biomarcadores de efeito), ou ainda a suscetibilidade dos mesmos (biomarcadores de suscetibilidade) (RÜDIGER, 1999; WHO; IPCS, 1993).

Dentre os biomarcadores de exposição encontram-se as enzimas de conjugação, com destaque para a glutathione S-transferase (GST), que atua na detoxificação do organismo. Entre os indicadores biológicos de efeito têm-se, como exemplo, a peroxidação lipídica (LPO) e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). A LPO é um dos principais contribuintes para a perda da função de células em situações de estresse oxidativo. Já a AChE, sua inibição pode resultar em uma transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos, levando o organismo a morte.

Sendo assim, este trabalho tem como hipótese que os biocidas clorotalonil e DCOIT causam efeitos tóxicos sobre a ostra *Crassostrea rhizophorae*, que podem ser detectados através de análise de GST, LPO e AChE, que por sua vez podem ser empregadas como biomarcadores de exposição e efeito. Como resultado final, esta dissertação gerou um artigo científico intitulado “Biomarcadores de exposição e efeito em juvenis de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) expostos aos biocidas clorotalonil e DCOIT” que será apresentado no capítulo 2 da dissertação e submetido à revista “Marine Pollution Bulletin”, qualis A1 na área de Biodiversidade.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Contaminação aquática

Os ecossistemas aquáticos são os principais corpos receptores das descargas antropogênicas, que constituída de inúmeros elementos químicos, podem gerar efeitos deletérios tanto para os seres humanos, quanto para toda biota aquática (MCGLASHAN; HUGHIES, 2001).

Derísio (1992) caracteriza cinco tipos de fontes de poluição de águas superficiais: (1) poluição natural não associada à atividade humana - causada por chuvas e escoamento superficial, salinização e decomposição de vegetais e animais; (2) poluição industrial - causada pelos resíduos líquidos, sólidos e gasosos dos processos industriais; (3) poluição urbana - oriunda dos esgotos domésticos; (4) poluição agropastoril - causada pelo uso de defensivos agrícolas, fertilizantes, excremento de animais e erosão; (5) poluição acidental - ocorre com o derramamento de substâncias poluentes que podem chegar aos corpos d'água.

A liberação indiscriminada de agentes poluidores é o fator que leva os ecossistemas aquáticos a serem considerados os mais suscetíveis à poluição (ARAÚJO *et al.*, 2001). Desta forma, nos últimos anos, o nível de elementos químicos aumentou nesses ecossistemas de forma alarmante. Tal fato tem contribuindo para uma redução drástica da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

Em áreas costeiras, a problemática ambiental é ainda mais grave, pois além do intenso crescimento populacional e aumento das atividades industriais, essas regiões são ainda o destino final de toda contaminação gerada em áreas adjacentes, o que resulta em danos inestimáveis a biota aquática. Um importante ecossistema destas regiões são os estuários, reconhecidos por sua relevância socioeconômica e ecológica, principalmente por gerar condições favoráveis de alimentação, reprodução e proteção para muitas espécies marinhas (SOUZA *et al.*, 2018). Devido sua importância ecológica e econômica, nos últimos anos, os estuários têm sido alvo crescente de estudos, especialmente aqueles que empregam múltiplas ferramentas de avaliação de impacto. Neste contexto, inúmeras espécies de diferentes grupos animais, têm sido usadas como monitoras de contaminação por diferentes fontes e constituintes. Como exemplo, podemos citar: (1) a macrofauna bentônica (FARRAPEIRA *et al.*, 2009), zooplâncton (MARTINS; LOPES; MELO, 2006) e anelídeos poliquetas (FERES; SANTOS; MARTINS, 2008) indicando poluição orgânica por esgoto; (2) decápodos (CARVALHO-NETA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019) e peixes (CASTRO *et al.*, 2019) associados a contaminação por

atividades portuárias; e (3) ostras (CORREA, 2019) e mexilhões (SÁENZ *et al.*, 2010) apontando contaminação por metais.

1.2.2 Organismo teste

A ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) pertence à classe Bivalvia do filo Mollusca, caracterizando-se pela presença de uma concha composta de duas valvas que envolvem todo o corpo do animal (RUPPERT; BARNES, 1996). É uma espécie eurialina que está distribuída desde o sul do Brasil até o Caribe, podendo ser encontrada em substratos consolidados, como rochas e raízes de árvores que ocorrem em áreas de mangue (SILVA *et al.*, 2001).

É um animal filtrador, capaz de ingerir partículas em suspensão na coluna d'água, como materiais orgânicos, inorgânicos e, principalmente, fitoplâncton. São dióicos e ovíparos, sem dimorfismo sexual e capazes de filtrar em torno de 90 a 100 litros de água por dia, podendo assim, acumular em seus tecidos uma grande variedade de compostos químicos presentes no mar (SILVA, 2004).

Esta espécie representa uma importante fonte alimentar nas áreas costeiras do Brasil (SILVA; SMITH; RAINBOW, 2006). Destaca-se também por ser uma fonte de renda para comunidades pesqueiras brasileiras, especialmente no Maranhão e são consumidas frequentemente cruas, representando assim, um risco para a saúde humana quando contaminadas (RIBEIRO *et al.*, 2016). Diversas pesquisas têm utilizado moluscos bivalves para monitoramento de contaminação aquática e como modelo biológico para

estudos toxicológicos ambientais no Brasil (ZANETTE; MONSERRAT; BIANCHINI, 2006).

1.2.3 Clorotalonil

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofталонitrila) é um composto orgânico amplamente utilizado na agricultura como fungicida, podendo também ser empregado como pesticida e acaricida. (CIMA; BRAGADIN; BALLARIN, 2008). Apresenta valor de Kow de 2,64, baixa solubilidade em água (0,6 mg/L), e meia-vida de aproximadamente 1,9 dias em águas salgadas (SAKKAS *et al.*, 2002). Em sedimentos, a meia vida deste composto é maior do que em água, apresentando persistência de até 3 meses (VOULVOULIS, 2006). E o seu principal metabólito, o 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisofталонitrilo, pode ser aparentemente mais persistente e apresenta maior mobilidade em ambientes aquáticos (US EPA, 1999).

Atualmente banido em várias partes do mundo, já foi empregado em menor proporção como protetor de superfícies expostas à água, servindo como aditivo na formulação de tintas anti-incrustantes. O emprego deste composto como biocida na agricultura contribuiu significativamente para o seu aumento no ambiente aquático (GALLO; TOSTI, 2015). A elevada toxicidade do clorotalonil a organismos aquáticos (SÁNCHEZ-GARAYZAR *et al.*, 2016) está diretamente relacionada à presença de múltiplos centros eletrofílicos reativos na molécula (CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011).

Konstantinou; Albanis (2004) apontam que ostras são os organismos marinhos mais sensíveis ao clorotalonil. A espécie *Crassostrea virginica*, por exemplo, apresentou valores de EC₅₀ de 7,3µg L⁻¹ após 96h de exposição.

Além deste estudo, Baier-Anderson; Anderson (2000) relatam inibição de oxidase em ostras expostas ao composto, revelando possíveis efeitos nas funções hemocíticas para este táxon. Em mexilhões da espécie *Perna perna*, o clorotalonil tem ação sobre o sistema imune, o que afeta sua sobrevivência (GUERREIRO *et al.*, 2017).

Em peixes, também são evidenciados efeitos do composto, como genotoxicidade, mutagenicidade (CASTRO, 2018), danos neurotóxicos e alterações nos processos de biotransformação (TORRES, 2019). Para a ascídia *Botryllus schlosseri*, foram observados efeitos como a alteração morfológica dos fagócitos (CIMA; BRAGADIN; BALLARIN, 2008). Danos bioquímicos no metabolismo oxidativo e neurotoxicidade também são alguns dos efeitos da exposição ao clorotalonil em poliquetas (*Laeonereis acuta*) (BARRETO *et al.*, 2018).

1.2.4 DCOIT

O DCOIT (4,5-diclo-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona) é um isotiazol, apresenta baixa solubilidade em água e rápida taxa de degradação, com meia-vida de cerca de 24 h em água e 1 h em sedimentos, características atribuídas ao processo de biodegradação (JACOBSON; WILLINGHAM, 2000). Liga-se fortemente ao sedimento (Kow de 2,8) reduzindo a sua biodisponibilidade em água (KONSTANTINOU; ALBANIS, 2004). Concentrações ambientais deste composto foram relatadas em níveis até 3,3 µg L⁻¹ (CHEN; LAM, 2017).

Possui atividade antimicrobiana alta em relação a bactérias, fungos e algas (YEBA *et al.*, 2004), e é considerado um composto extremamente tóxico para diversos organismos aquáticos e com efeitos danosos relatados em

diferentes grupos, tais como perturbação e/ou atraso do desenvolvimento embrionário e larval em bivalves (*Mytilus edulis*), equinodermos (*Paracentrotus lividus*) e ascídias (*Ciona intestinalis*) (BELLAS, 2006).

Em peixes (*Oryzias melastigma*) os efeitos são, por exemplo, inibição da atividade da acetilcolinesterase, distúrbios endócrinos como diminuição de níveis de testosterona, ou ainda, redução na produção de ovos (CHEN *et al.*, 2014). Outros estudos (WENDT *et al.*, 2016; MOCHIDA *et al.*, 2015) revelam, ainda, letalidade para alguns crustáceos, como a espécie *Acartia tonsa* e poliquetas (*Perinereis nuntia*).

1.2.5 Biomarcadores

Os biomarcadores são análises empregadas para identificar exposição a elementos químicos e seu potencial impacto sobre os organismos vivos (FREIRE *et al.*, 2008). Podem ser definidos como qualquer mudança de resposta biológica a uma substância ou elemento no ambiente que seja detectável em alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais nos organismos (PEAKALL, 1994).

Para Rüdiger (1999), os biomarcadores podem ser classificados em: (1) Biomarcadores de exposição - usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo para uma substância, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna; (2) Biomarcadores de efeito - usados para identificar as alterações ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química, logo está ligada à relação dose-resposta; e (3) Biomarcadores de susceptibilidade - mostram o grau de resposta da exposição provocada aos

indivíduos indicando, por exemplo, o desenvolvimento de resistência ao agente tóxico.

Entre os biomarcadores bioquímicos de exposição mais utilizados e recomendados estão as enzimas de defesa antioxidante e biotransformação (e.g. Glutathione S-transferase – GST), que atua na conjugação de produtos lipofílicos com o tripeptídeo endógeno glutathione reduzida (GSH), formando produtos mais solúveis e, portanto, mais fáceis de serem excretados (FITZPATRICK *et al.*, 1997). Estas reações são mediadas por enzimas, resultando em metabólitos mais polares e fáceis de serem excretados, do que os compostos parentais. O processo de biotransformação facilita, portanto, a remoção de compostos xenobióticos, que poderiam bioacumular até níveis tóxicos ao organismo (BLASCO *et al.*, 2016).

Na fase II do processo de biotransformação, há a conjugação do composto parental ou seu metabólito a um ligante endógeno polar (BLASCO *et al.*, 2016). Tais reações de conjugação são principalmente catalisadas por enzimas como glutathione-S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT) e glucoronosiltransferases, através das quais compostos lipofílicos tornam-se hidrofílicos (LÜCHMANN *et al.*, 2015; WALKER, 1996); e, finalmente, fase III, formada por proteínas de membrana, como as do sistema de resistência a múltiplas drogas (multidrug resistance-related protein – MRP), que transportam os metabólitos para fora da célula (Figura 1) (DÖRING; PETZINGER, 2014; REGOLI; GIULIANI, 2014).

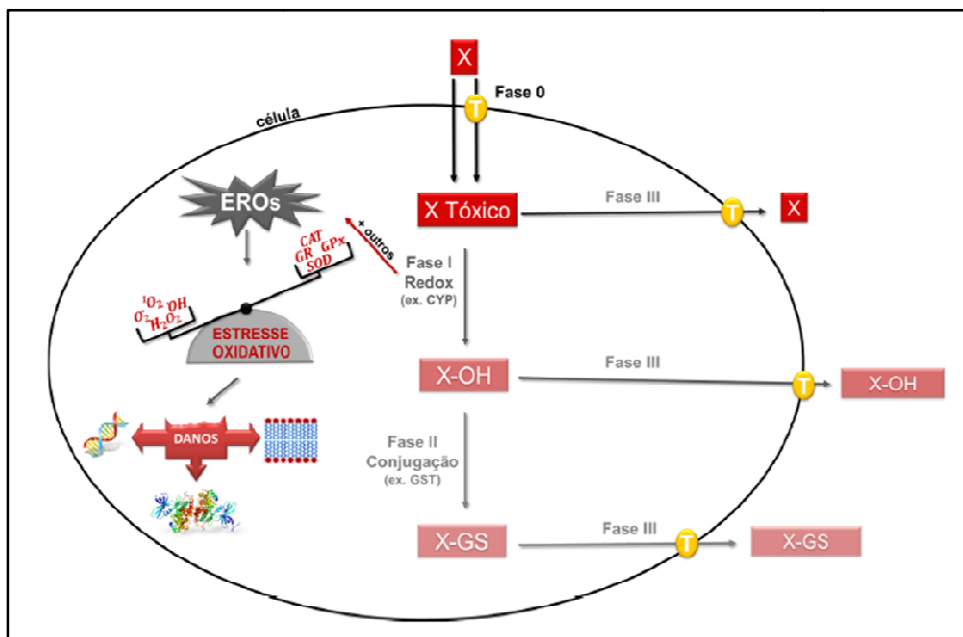


Figura 1 Esquema simplificado do sistema de biotransformação de xenobióticos e efeitos negativos do desbalanço oxidativo. Fonte: FERREIRA, 2018.

Em relação aos biomarcadores bioquímicos de efeito, a determinação de lipoperoxidação (LPO), é amplamente empregada, já que é um dos os principais contribuintes para a perda de função celular em situações de estresse oxidativo. Portanto, a LPO tem sido empregada para demonstrar estresse oxidativo em invertebrados (MONSERRAT *et al.*, 2003).

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente $L\cdot$, $LO\cdot$ e $LOO\cdot$, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996) (Figura 2).

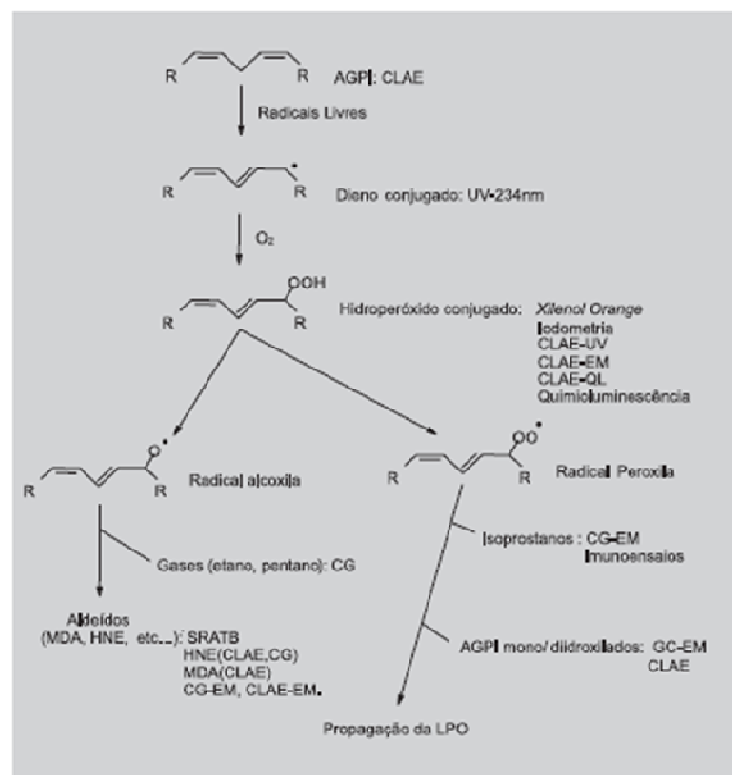


Figura 2 Esquema representativo da peroxidação lipídica, enfocando as principais substâncias formadas e processos de avaliação. Fonte: Lima; Abdalla, 2001.

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lípidos é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular (C₃H₄O₂, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3- dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco (pKa = 4,46). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO,1990; BENZIE, 1996). A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma

produtos, que podem ser determinados por absorção no visível ou por fluorescência.

Além deste, a atividade de acetilcolinesterase (AChE) também é um eficiente biomarcador de efeito, indicando uma contaminação, isso porque é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. Sendo, portanto importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas (WESTFALL; WESTFALL, 2006) (Figura 3).

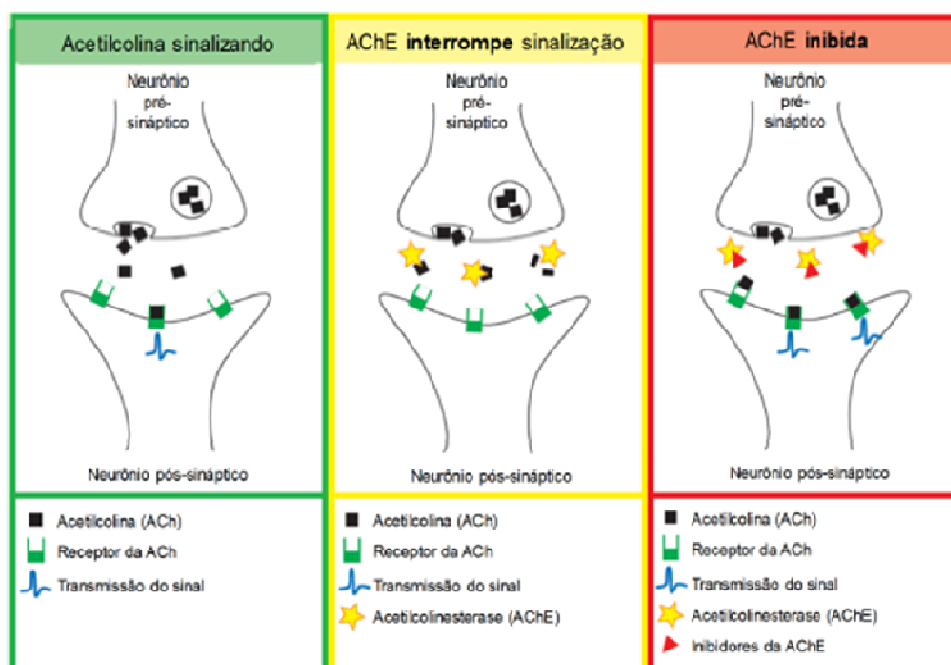


Figura 3 Esquema de ação da enzima acetilcolinesterase. Fonte: Adaptado por FERREIRA, 2018.

A atividade da AChE vem sendo utilizada há décadas como biomarcador da contaminação por pesticidas organofosforados e carbamatos, conhecidos inibidores da enzima (LIONETTO *et al.*, 2013). Quando a enzima é inibida, ocorre o acúmulo de ACh promovendo estímulos contínuos dos receptores de

ACh, resultando em toxicidade colinérgica e estado de tetanização (BONACCI; CORSI; FOCARDI, 2009). Adicionalmente, alguns estudos mostraram efeitos inibitórios de metais, HPAs, detergentes e outras misturas complexas na atividade desta enzima em diferentes organismos aquáticos (JEBALI *et al.*, 2006; RICHETTI *et al.*, 2011).

1.2.5.1 Biomarcadores bioquímicos (GST, LPO e AChE) em ostras

Como mencionado anteriormente, as ostras são amplamente empregadas para o monitoramento ambiental. A espécie *Crassostrea rhizophorae*, por exemplo, foi utilizada para avaliar a saúde de áreas estuarinas nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, revelando inibição da AChE nos organismos ao longo de toda costa brasileira (VALDEZ DOMINGOS *et al.*, 2007).

Com a mesma espécie, Souza *et al.* (2018), sugerem que parâmetros físico-químicos e cinéticos da AChE, a exemplo da inibição de sua atividade, podem ser empregados como biomarcadores de contaminação por vários pesticidas como carbamatos e benzoilureias. A atividade enzimática da glutationa-s-transferase (GST) também é relatada como um biomarcador bioquímico para esta espécie. É o que aponta o trabalho conduzido por Zanette *et al.* (2008), onde alterações nesta enzima, revelaram contaminação por descarga de poluentes orgânicos em diferentes gradientes, no Estado de Santa Catarina, Brasil.

Noletto (2018) também aponta alterações na atividade da GST em ostras do gênero *Crassostrea* como indicativo de níveis variados de impacto ambiental por poluentes na Baía de São José, litoral maranhense, associando

tais efeitos aos contaminantes despejados nesta região, onde Ribeiro (*et al.*, 2016) também atribui a este biomarcador (GST) os melhores resultados na identificação de áreas com maiores níveis de contaminação em ostras em diferentes portos na Ilha de São Luís, Maranhão.

Shenal-Tirodkar *et al.* (2017), submeteram a espécie *Crassostrea madrasensis* a condições laboratoriais, e demonstraram os efeitos da exposição a metais como o chumbo (Pb) por meio de alterações na glutathione S-transferase (GST) e pela peroxidação lipídica (LPO). Adicionados a estes biomarcadores, Quinioua *et al.* (2007) utilizou atividade da acetilcolinesterase (AChE) para demonstrar os danos da atividade portuária (Porto de Arcachon) à larvas de *Crassostrea gigas* no litoral francês.

Outros importantes trabalhos empregando diversos biomarcadores foram realizados, nos quais foi possível determinar os efeitos de diferentes tipos de poluentes por respostas de biomarcadores bioquímicos como GST e LPO em *Crassostrea rhizophorae* em três regiões estuarinas de três estados (Pernambuco, Espírito Santo e Paraná) ao longo da costa brasileira (ZANETTE; MONSERRAT; BIANCHINI, 2006) e níveis basais destes biomarcadores para esta espécie foram determinados, a fim serem empregados como ferramentas de monitoramento na Baía Paranaguá-PR (SARDI *et al.*, 2016).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo geral

Determinar efeitos bioquímicos dos biocidas clorotalonil e DCOIT em ostra *Crassostrea rhizophorae* que possam ser empregados como biomarcadores de contaminação ambiental.

1.3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição aos biocidas clorotalonil e DCOIT no processo de biotransformação pelas alterações na atividade da glutathione S-transferase (GST) em *Crassostrea rhizophorae*;
- Identificar danos oxidativos pela lipoperoxidação (LPO) em *Crassostrea rhizophorae* expostas aos biocidas clorotalonil e DCOIT;
- Investigar o comportamento colinérgico através das alterações da ação da acetilcolinesterase (AChE) em *Crassostrea rhizophorae* expostas aos biocidas clorotalonil e DCOIT;
- Avaliar o emprego da ostra *Crassostrea rhizophorae* como organismos monitores e possíveis biomarcadores para o monitoramento de ambientes expostos ao clorotalonil e DCOIT;

REFERÊNCIAS

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

ARAÚJO, E. J.; MORAIS, J. O. R.; SOUZA, P. R.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. de. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivípara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum**, v.23, p. 391-399, 2001.

BAIER-ANDERSON, C.; ANDERSON, R. S. The Effects of Chlorothalonil on Oyster Hemocyte Activation: Phagocytosis, Reduced Pyridine Nucleotides, and Reactive Oxygen Species Production. **Environmental Research**, v. 83, n. 1, p. 72–78, maio. 2000.

BARRETO, J. S.; TAROUCO, F. M.; GODOI, F. G. A.; GEIHS, M. A.; ABREU, F. E. L.; FILLMANN, G.; SANDRINI, J. Z.; ROSA, C. E. Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta*. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 1–8, mar, 2018.

BELLAS, J. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 367, n. 2-3, p. 573-585, Ago. 2006.

BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, May. 1996.

BLASCO, J.; CHAPMAN, P. M.; CAMPANA, O.; HAMPEL, M. **Marine Ecotoxicology**: current knowledge and future issues. Academic Press: 2016.

BONACCI, S.; CORSI, I.; FOCARDI, S. Cholinesterases in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: characterization and sensitivity to pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1481-1488, 2009.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 20 mar. 2000.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ANDRADE, T. S. O. M.; OLIVEIRA, S. R. S.; TORRES JUNIOR, A. R. T.; CARDOSO, W. S.; SANTOS, D. M. S.; BATISTA, W. S.; SERRA, I. M. R. S.; BRITO, N. M. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 15884-15893, Abr. 2019.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CASTRO, J. S.; FRANÇA, C. L.; CARDOSO, R. L.; SILVA, W. M. M. L.; SANTANA, T. C.; SANTOS, D. M. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; TEIXEIRA, E. G. Histological Changes in the Kidney of *Sciades Herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) for Environmental Monitoring of a Neotropical Estuarine Area (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 246-254, maio 2019.

CASTRO, M. S. **Genotoxicidade e mutagenicidade do biocida anti-incrustante clorotalonil na espécie *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

CHEN, L.; YE, R.; XU, Y.; GAO, Z.; AU, D. W. T.; QIAN, P. Comparative safety of the antifouling compound butenolide and 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) to the marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Aquatic Toxicology**, n. 149, p. 116-125, Apr. 2014.

CHEN, L.; LAM, J. C. W. SeaNine 211 as antifouling biocide: a coastal pollutant of emerging concern. **Journal of Environmental Sciences**, n. 61, p. 68-79, Apr. 2017.

CIMA, F.; BRAGADIN, M.; BALLARIN, L. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 299-312, jan. 2008.

CORREA, J. N. **Ostras (*Crassostrea gasar*) como biomonitoros de contaminação costeira no estuário do rio Paciência, na margem equatorial amazônica**. 2019. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

DAFFORN, K. A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 3, p. 453-465, Mar. 2011.

DERÍSIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. São Paulo: CETESB, 1992.

DÖRING, B.; PETZINGER, E. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, v. 46, n. 3, p. 261-282, 2014.

FARRAPEIRA, C. M. R.; MELO, A. V. D. O. M. D.; TENÓRIO, D. D. O. Comunidade bentônica de lagunas costeiras impactadas de Recife e Olinda,

Pernambuco - possível grupamento biológico bioindicador de poluição orgânica. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n. 2, p. 28-38, 2009.

FERES, S. J. C.; SANTOS, L. D. A.; RAFAEL M. C.; MARTINS, R. M. C. T. Família Nereidae (Polychaeta) como bioindicadora de poluição orgânica em praias de São Luís, Maranhão – Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 21, p. 95-98, 2008.

FITZPATRICK, P. J.; O'HALLORAN, J.; SHEEHAN, D.; WALSH, A. R. Assessment of a glutathione S-transferase and related protein in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. **Biomarkers**, v. 2, n. 1, p. 51-56, 1997.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 347-354, 2008.

GALLO, A.; TOSTI, E. Reprotoxicity of the antifoulant chlorothalonil in ascidians: an Ecological Risk Assessment. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-14, 2015.

GUERREIRO, A.; ROLA, R. C.; ROVANI, M. T.; COSTA, S. R. Antifouling biocides: Impairment of bivalve immune system by chlorothalonil. **Aquatic Toxicology**, v. 189, p. 194-199, Jun. 2017.

HARINO, H.; ARAI, T.; OHJI, M.; ISMAIL, A. B.; MIYAZAKI, N. Contamination profiles of antifouling biocides in selected coastal regions of Malaysia. **Archives of Environmental and Toxicology**, v. 56, n. 3, p. 468-478, 2009.

JACOBSON, A. H.; WILLINGHAM, G. L. Sea-Nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. **The Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1-2, p. 103–110, Aug. 2000.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol Med**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEBALI, J; BANNI, M.; GUERBEJ, H.; ALMEIDA, E. A.; BANNAOUI, A.; BOUSSETTA, H. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 93-98, 2006.

KENNISH, M. J. **Ecology of estuaries: anthropogenic effects**. Boca Raton: CRC Press. 494p., 1991.

KIM, N. S.; HONG, S. H.; AN, J. G.; SHIN, K. H.; SHIM, W. J. Distribution of butyltins and alternative antifouling biocides in sediments from shipping and shipbuilding areas in South Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 1, p. 484-490, Jun. 2015.

KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 235-248, Apr. 2004.

LEE, M. R. N.; KIM, U. J.; LEE, I. S.; CHOI, M.; O. J. E. Assessment of organotin and tin-free antifouling paints contamination in the Korea coastal area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 99, n. 1-2, p. 157-165, Oct. 2015.

LEE, S.; CHUNG, J.; WON, H.; LEE, D.; LEE, Y. W. Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea. **Jornal of Hazardous Materials**, v. 185, N. 2-3, p. 1318-1325, Jan. 2011.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, A. C.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Research Internacional**, v. 2013, Article ID 321213, 8 Pages, 2013.

LUCHMANN, K. H.; CLARK, M. S.; BAINY, A. C. D.; GILBERT, J. A.; CRAFT, J. A.; CHIPMAN, J. K.; THORNE, M. A. S.; MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; SCHROEDER, D. C. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic Toxicology**, v. 166, p. 10-20, sept. 2015.

MARTINS, A. L. P.; LOPES, M. J. S.; MELO, O. T. D. Zooplâncton como bioindicador da qualidade ambiental no Estuário do Rio Anil, São Luís, Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 19, p. 51-60, 2006.

MCGLASHAN, D. J.; HUGHIES, J. M. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 55-67, 2001.

MOCHIDA, K.; HANO, T.; ONDUKA, T.; ICHIHASHI, H.; AMANO, H.; ITO, M.; ITO, K.; TANAKA, H.; FUJII, K. Spatial analysis of 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (Sea-Nine 211) concentrations and probabilistic risk to marine organisms in Hiroshima Bay, Japan. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 233-240, Sep. 2015.

MONSERRAT, J. M.; MONSERRAT, L. A. G.; PINHO, G. L. L.; VINAGRE, T. M. M.; FALEIROS, M.; ALCIATI, J. C.; BIANCCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xlenol orange complex formation. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 177–183, 2003.

NOLETO, K. S. **Biomarcadores bioquímicos em ostras do gênero *Crassostrea* para monitoramento ambiental na Baía de São José-Maranhão**. 2018. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

OLIVEIRA, S. R. P.; BATISTA, W. S.; SOUSA, J. B. M.; NOLETO, K. S.; LIMA, I. M. A.; ANDRADE, T. S. O. M.; CARDOSO, W. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, p. 802-810, Apr. 2019.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environment assessment. **Toxicol. Ecotoxicology. News**, v. 1, p. 55-60, 1994.

QUINIOUA, F.; DAMIENS, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; GEFFARD, A.; MOUNEYRAC, C.; BUDZINSKI, H.; ROMÉO, M. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. **Environment International**, v. 33, n. 1, p. 27-33, Jan. 2007.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106-117, 2014.

RIBEIRO, E. B.; BASTOS, L. S.; GALENO, L. S.; MENDES, R. S.; GARINO Jr., F.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; COSTA, F. N. Integrated assessment of biomarker responses and microbiological analysis of oysters from São Luís Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 113, v. 1-2, p. 182-186, sep. 2016.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J. M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, n.1, p. 116-122, jan. 2011.

RÜDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. *In*: MARQUART, H; SCHÄFER, S. G.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press p.1027-1039, 1999.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca. Ed. n.6, p. 412-449, 1996.

SÁENZ, L. A.; SEIBERT, E. L.; ZANETTE, J.; FIEDLER, H. D.; CURTIUS, A. J.; FERREIRA, J. F.; ALMEIDA, E. A.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 796-804, 2010.

SAKKAS, V. A.; KONSTANTINOOU, I. K.; LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 9, Article 327, 2002.

SÁNCHEZ-GARAYZAR, A. B.; BETANCOURT-LOZANO, M.; MARTYNIUK, C. J.; MUNKITTRICK, K. R.; ALMAZAN, P.; MEJIA-RUIZ, H.; GARCIA-GASCA, A.; SOTO, S. Molecular, biochemical and behavioral effects of the pesticide chlorothalonil in the zebrafish (*D. rerio*). **Toxicology Letters**, 259, S224, oct. 2016.

SARDI, A. E.; RENAUD, P. E.; LANA, P. C.; CAMUS, L. Baseline levels of oxidative stress biomarkers in species from a subtropical estuarine system (Paranaguá Bay, southern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1-2, p. 496-508, dec. 2016.

SHENAI-TIRODKAR, P. S.; GAUNS, M. U.; MUJAWAR, M. W. A.; ANSARI, Z. A. Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 87–94, agu. 2017.

SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D.; SANTOS, Z. L. Biomonitoring of TRACE metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4072–4078, dec. 2001.

SILVA, C. A. R.; SMITH, B. D.; RAINBOW, P. S. Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). **Marine Environmental Research**, v. 61, n. 4, p. 439–455, may. 2006.

SILVA, D. A. M.; BUZITIS, J.; KRAHN, M. M.; BÍCEGO, M. C.; PIRES-VANIN, A. M. S. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. **Marine Pollution Bulletin**. v. 52, p. 175-183, 2006.

SILVA, Z. D. S. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos na ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) (Mollusca:Bivalvia) exposta a óleo diesel em diferentes salinidades**. 2004. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SOUZA, P. R.; SOUZA, K. S.; ASSIS, C. R. D.; ARAÚJO, M. C.; SILVA, K. C. C.; SILVA, J. F. X.; FERREIRA, A. C. M.; SILVA, V. L.; ADAM, M. L.; CARVALHO Jr, L. B.; BEZERRA, R. S. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 109-121, Apr. 2018.

SUNILA, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Annales Zoologici Fennici**. v. 24, p. 55-69, 1987.

TORRES, T. A. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* exposto agudamente ao anti-incrustante clorotalonil**. 2019. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

U. S. EPA. Understanding Variation in Partition Coefficient (K_d) Values. United States Environmental Protection Agency, Office of Air and Radiation, Report No: EPA 402-R-99-004A, 1999.

VALDEZ DOMINGOS, F. X.; AZEVEDO, M.; SILVA, M. D.; RANDI, M. A. F.; FREIRE, C. A.; ASSIS, S.; RIBEIRO, C. A. O. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. **Environmental Research**, v. 105, n. 3, p. 350–363, nov. 2007.

VOULVOULIS, N. Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and Partitioning in Water and Sediments. *In*: KONSTANTINOOU, I. K. (eds.). **Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides**. Springer-Verlag, Berlin. p. 155-170, 2006.

VOULVOULIS, N.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. 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**, v. 40, n. 11, p. 938-946, 2000.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 321 p. 1996.

WENDT, I.; BACKHAUS, T.; BLANCK, H.; ARRHENIUS, A. The toxicity of the three antifouling biocides DCOIT, TPBP and medetomidine to the marine pelagic copepod *Acartia tonsa*. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 871-879, Jul. 2016.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Agonistas e antagonistas adrenérgicos. *In*: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. (ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 215-264, 2006.

WHO; IPCS. World Health Organization; International Programme on Chemical Safety. **Biomarkers and risk assessment**: concepts and principles. Published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the

International Labour Organisation, and the World Health Organization. World Health Organization, Geneva, 1993.

ZANETTE, J.; NUNES, F. F.; MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; MATTOS, J. J.; LÜCHMANN, K. H.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-198, jul. 2008.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, v. 143, n. 2, p. 187-195, jun. 2006.

CAPÍTULO II: Artigo Científico

Biomarcadores de exposição e efeito em juvenis de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) expostos aos biocidas clorotalonil e DCOIT

Artigo a ser submetido ao periódico Marine Pollution Bulletin

ISSN: 0025-326X

Biomarcadores de exposição e efeito em juvenis de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) expostos aos biocidas clorotalonil e DCOIT

Rômulo Sampaio Pinheiro^a, Thamires Alexsandra Torres^b, Gilberto Fillmann^d,
Ricardo Luvizotto Santos^{b,c}, Marianna Basso Jorge^{a,b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^c Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
MA, Brasil.

^d Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande,
RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

O processo de contaminação dos ecossistemas aquáticos é crescente e se intensifica como resultado das atividades antrópicas (Prates et al., 2012). Logo, a introdução de compostos tóxicos persistentes e bioacumulativos no ambiente marinho, a exemplo do uso de biocidas em tintas anti-incrustantes e insumos agrícolas, apresenta-se como um grave problema à biota aquática (Castro et al., 2011).

As tintas anti-incrustantes são empregadas para evitar a bioincrustação (Dominguez et al., 2014), sendo que atualmente existem cerca de 23 compostos tidos como biocidas anti-incrustantes, incluindo o clorotalonil (2,4,5,6 Tetracloroisoftalonitrila) e o DCOIT (4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (Soroldoni et al., 2017).

O clorotalonil é um pesticida de amplo espectro usado há mais de 50 anos na agricultura, e embora tenha sido proibido em pela União Europeia em 2019, é o mais usado no Reino Unido, e o fungicida mais popular nos EUA. Além disso, pode ser empregado, em menor proporção, como composto em tintas anti-incrustantes, o que contribuiu para o seu aumento no ambiente aquático (Gallo and Tosti, 2015). Por atuar principalmente na inibição da glicólise ou da glutatona reduzida (Caux et al., 1996) e apresentar múltiplos centros eletrofílicos reativos, este composto torna-se extremamente tóxico (Castro et al., 2011) causando efeitos deletérios em vários organismos aquáticos (Sánchez-Garayzar et al., 2016).

Destacam-se os efeitos no comportamento de crustáceos e mortalidade de larvas, juvenis e adultos (Armstrong et al., 1976; Montforts, 1999; US EPA, 2000). Em moluscos observam-se efeitos no crescimento, inibição do

desenvolvimento embrionário, inibição do assentamento e crescimento larval, deposição de concha, alterações nas respostas imunes e mortalidade (Mayer, 1987; Montforts, 1999; US EPA, 2000; Ernst et al., 1991; Bellas, 2006; Guerreiro et al., 2017).

Outro grupo de organismos aquáticos cujos efeitos deste composto foram estudados são os tunicados, onde foi encontrado embriotoxicidade e inibição do assentamento larval (Bellas, 2006), além de alteração morfológica dos fagócitos (Cima et al., 2008). Em peixes o clorotalonil causa mortalidade de larvas, juvenis e adultos (Yokoyama et al., 1988; Montforts, 1999; US EPA, 2000), além de danos genotóxicos e mutagênicos (Castro, 2018; Lopes et. al., 2020), neurotóxicos e alterações nos processos de biotransformação (Torres, 2019).

Outro composto também empregado em tintas anti-incrustantes é DCOIT, considerado um biocida de amplo espectro utilizado como herbicidas ou fungicidas (Fernández-Alba et al., 2002). Classificado como altamente tóxico pela US EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) desde 2002. O composto atua reagindo com proteínas de organismos incrustados, resultando na interrupção dos processos metabólicos e perturbação dos processos fisiológicos envolvidos na fixação do organismo a superfícies sólidas (Martins et al. 2017).

Estudos relatam alta toxicidade do DCOIT para organismos aquáticos, a exemplo de mortalidade de crustáceos em estágio larval e adulta (Jacobson and Willingham, 2000; Yamada, 2006); assim como inibição do crescimento larval, imobilidade e mortalidade de larvas e embriões, danos na capacidade de filtração e mortalidade em moluscos (US EPA, 2000; Bellas, 2006). A

embriotoxicidade também foi relatada em equinodermos e tunicados expostos a este composto (Kobayashi and Okamura, 2002). Já para peixes a mortalidade pelo DCOIT é o efeito mais descrito na literatura (US EPA, 2000; Mochida et al., 2010; Cima et al., 2008; Okamura et al., 2002; Shade et al., 1993).

Dada à toxicidade dos compostos apresentados, faz-se necessária a investigação dos efeitos em outras espécies. Os moluscos bivalves, como a *Crassostrea rhizophorae*, são bem conhecidos por suas características sentinelas. É um animal filtrador, capaz de ingerir partículas em suspensão na coluna d'água, como materiais orgânicos, inorgânicos e, principalmente, fitoplâncton. Esta espécie representa uma importante fonte alimentar nas áreas costeiras do Brasil (Silva et al., 2006) e vem sendo utilizada como modelo biológico para estudos toxicológicos e ambientais no Brasil (Zanette et al., 2006).

Sendo assim, este estudo apoiou-se em investigar a toxidade dos biocidas através de alterações bioquímicas relacionadas à biotransformação, estresse oxidativo e atividade colinérgica em *Crassostrea rhizophorae*, e identificar possíveis biomarcadores de exposição e efeito (Depledge et al., 1995) dos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes. Para tanto, foram avaliados os efeitos dos biocidas clorotalonil e DCOIT nas atividades enzimáticas da glutathione-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE), além da detecção de danos de membrana através da lipoperoxidação (LPO) em tecidos de brânquias, músculo adutor e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostas agudamente a diferentes concentrações de biocidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e aclimação

Juvenis de ostra *Crassostrea rhizophorae* foram obtidos em um cultivo no município de Raposa, Maranhão, Brasil (02° 25' 22"S e 44° 05' 21"W) e imediatamente transportadas ao Laboratório de Aclimação de Organismos Aquáticos da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). A coleta dos exemplares ocorreu em 03 lotes distintos na mesma estação do ano, com intervalo de um mês entre si, a fim de contemplar a suscetibilidade da espécie. Cada lote era composto por 50 indivíduos, totalizando 150 organismos coletados e aclimatados para experimentação em laboratório.

Para aclimação, os animais foram dispostos sobre uma estrutura suspensa (cama) dentro de tanque de 300L para evitar o contato direto com as fezes. A aclimação ocorreu sem renovação de água, em sistema de recirculação e fluxo contínuo e aeração constante. Os organismos foram mantidos em água do mar, obtida na região do cultivo, por um período de 15 dias em salinidade 30, temperatura 25 °C, fotoperíodo de 12C:12E e a alimentação ocorreu a cada 48 horas com mix de fitoplâncton. Importante salientar que durante o período de aclimação não houve mortalidade.

Desenho experimental e ensaios ecotoxicológicos

Após o período de aclimação, os organismos (30 indivíduos), foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais, contendo 5 aquários (1L) cada e um organismos por aquário para a realização dos ensaios

ecotoxicológicos. Cada grupo experimental representa um tratamento específico e foi denominado de: (A) controle sem solvente com apenas água salina; (B) controle com 0.005% de solvente (DMSO); (C1) clorotalonil 0.1 µg/L (0,37 nM); (C2) clorotalonil 10 µg/L (37 nM); (D1) DCOIT 0.1 µg/L (0,37 nM); e (D2) DCOIT 10 µg/L (37 nM). A fim de comparação, as concentrações (0.1 µg/L e 10 µg/L) utilizadas neste estudo são as mesmas empregadas em outros trabalhos com diferentes organismos aquáticos expostos aos compostos analisados (Cima et al., 2013; Guerreiro et al., 2017; Barreto et al., 2018; Eom et al., 2019; Chaves et al., 2020).

A exposição aos biocidas durou 96h e durante todo o tempo experimental, os animais não foram alimentados. Considerando a meia-vida do clorotalonil e do DCOI em água marinha (Caux et al., 1996), a água foi totalmente renovada após 48h e 24h de exposição aos respectivos biocidas. As soluções estoque de clorotalonil e DCOIT foram preparadas com o solvente dimetil-sulfóxido (DMSO), devido à sua moderada solubilidade em água (0,9 mg/L) (Thomas et al., 2001). As proporções de solvente nos aquários foram os mesmos para todos os tratamentos (0.005%).

Obtenção dos tecidos e preparo das amostras

Ao final do período de exposição de 96h, os indivíduos foram transportados para o Laboratório de Ecotoxicologia (LABECOTOX) da UFMA, onde foram anestesiados em gelo, a fim de serem eutanasiados por meio da ruptura do músculo adutor, e dissecação dos tecidos (brânquias, músculo adutor e glândula digestiva), os quais foram armazenados imediatamente em tubos de polipropileno de 2 mL a -80°C para posterior processamento

(Guerreiro et al., 2017). Para fins das análises laboratoriais, foram selecionados por tratamento 02 organismos de cada lote, totalizando 06 amostras por tratamento. Os tecidos foram então descongelados em gelo e o peso obtido (brânquias, músculo adutor e glândula digestiva) para posterior homogeneização das amostras.

Quantificação dos biomarcadores

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade de GST foi determinada a partir da fração citosólica do músculo adutor, brânquia e glândulas digestivas de acordo com Keen et al. (1976), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Nesse ensaio, a conjugação de glutathione reduzida (GSH) com o CDBN, catalisada pela enzima GST, produz um composto (GS-DNB) que pode ser detectado em 340 nm ($\epsilon=9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). O ensaio foi realizado em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, com EDTA 1mM e GSH 1mM. Para iniciar a reação, foi adicionado 1mM de CDBN e a cinética da reação foi monitorada a 340 nm, por 5 min em intervalos de 15 seg, a 25°C em um BioTek Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1, usando o software BioTek Gen5.

Lipoperoxidação (LPO)

A concentração da LPO foi determinada nos extratos de músculo adutor, brânquia e glândulas digestivas, com base na metodologia descrita por Oakes and Van Der Kraak (2003). Os danos de radicais livres em lipídios resultam na produção de MDA, que reage com o TBA, podendo ser medido pela técnica de fluorescência em 532 nm. O preparo da reação ocorreu em triplicatas, em

microplaca preta (96 poços, fundo chato), com a adição de 10 µL do homogeneizado, 20 µL da solução estoque de BHT (1,40 mM), 150 µL da solução de ácido acético (20 %), 150 µL da solução de TBA (0,8 %), 50 µL de água ultrapura, 20 µL de solução SDS. A leitura foi realizada em um BioTek Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 usando o software BioTek Gen5.

Acetilcolinesterase (AChE)

O AChE apresenta duas formas, uma principal de membrana representando 94-97% da atividade e uma forma solúvel menor, responsável pelos restantes $4,5 \pm 1,5\%$ da atividade (Belzunces et al., 1988). Portanto, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi determinada na fração solúvel (FS) e de membrana (FM) do músculo adutor utilizando-se o método de Ellman et al. (1961), adaptado para leitores de microplacas (Sandahl and Jenkins, 2002). Nesse método, a atividade enzimática foi medida via hidrólise do substrato iodeto acetiltiocolina (1 mM) através da absorbância em 412 nm, da reação com o ácido nitrobenzóico (DTNB) em fosfato tampão (100 mM, pH 7,4, T = 25 °C) por 1 minuto em intervalos de 15 segundos a 25°C em um BioTek Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1, usando o software BioTek Gen5.

Proteínas totais

As atividades enzimáticas foram normalizadas pela quantidade de proteínas totais determinadas em cada fração analisada. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto, utilizando o kit Bioclin (proteínas totais monoreagente – K031), de acordo com as instruções do fabricante. O soro albumina bovina (4g/dL) da marca Bioclin (fabricado pela

Quibasa) foi utilizado como padrão nas concentrações de: 0,6; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 mg/mL.

Análises estatísticas

Os dados em cada tratamento dos grupos experimentais foram analisados quanto à distribuição normal (por Shapiro-Wilks) e homogeneidade (por Levene), logo os pressupostos foram testados para a aplicação dos testes. Após cumprir os requisitos para as análises estatísticas paramétricas, foi realizado o teste ANOVA (post-hoc de Tukey) e para os dados não paramétricos foi empregado Kruskal-Wallis (post-hoc de Mann-Whitney). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o software R (TEAM, 2012).

RESULTADOS

Glutationa-S-Transferase (GST)

A atividade da GST nos tecidos dos organismos expostos ao clorotalonil está apresentada na Figura 1 e revelou diferença significativa ($p < 0,05$) somente nas brânquias dos organismos expostos a maior concentração do mesmo ($10 \mu\text{g/L}$). Já para os demais tecidos, não foram encontradas diferenças significativas entre os controles e os grupos expostos. Em relação ao DCOIT, foi possível identificar diferenças significativas dos organismos expostos em relação ao controle no músculo adutor e na glândula digestiva quando exposto a maior concentração de $10 \mu\text{g}$ de DCOIT/L e na brânquia em ambas concentrações de DCOIT (Fig. 2)

Lipoperoxidação (LPO)

Para a análise de concentração da lipoperoxidação frente à exposição ao clorotalonil nos diferentes tratamentos (Fig. 3), foi encontrado um aumento de danos no músculo adutor de ostras expostas a menor concentração de clorotalonil ($0,1 \mu\text{g/L}$) e nas glândulas digestivas de ostras expostas a ambas concentrações do composto ($0,1$ e $10 \mu\text{g/L}$). Já em relação às brânquias, houve uma diminuição de dano nos organismos expostos a maior concentração do composto ($10 \mu\text{g/L}$).

Para o DCOIT (Fig. 4) ocorreram diminuição de danos no músculo adutor e brânquia de organismos expostos à $0,1 \mu\text{g/L}$ assim como no músculo adutor de organismos expostos a maior concentração ($10 \mu\text{g/L}$). No entanto, observou-se um aumento da concentração de LPO na glândula digestiva

exposta à ambas concentrações de DCOIT e nas brânquias expostas a maior concentração (10 µg/L).

Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE determinada no músculo adutor dos organismos expostos ao clorotalonil na maior concentração (10 µg/L), indicou diferenças significativas, tanto na fração solúvel quanto na fração de membrana, quando comparado aos grupos controles, sendo que não foram percebidas diferenças entre as duas concentrações do composto (Fig. 5).

A atividade da AChE determinada no músculo adutor dos organismos expostos ao DCOIT, indicou diferenças significativas, na fração solúvel, entre o grupo exposto a menor concentração quando comparado aos grupos controles, sendo percebidas diferenças entre as duas concentrações do composto. Na fração de membrana as diferenças significativas foram observadas entre a maior concentração em relação aos controles ($p > 0,05$) (Fig. 6).

DISCUSSÃO

A não existência de diferenças significativas na atividade da GST no músculo adutor, entre os tratamentos quando expostos ao clorotalonil, pode ter relação com o fato desse tecido ser pouco sensível ao composto nestas condições, ou não acumular o composto em concentrações suficientes para ativar suas defesas. Assim, alterações não foram facilmente detectadas por este órgão devido seu baixo aparato metabólico em termos de defesa antioxidante (Miranda dos Santos, 2018).

A diferença significativa nas brânquias, percebida pela atividade aumentada da Glutathione-S-transferase no grupo experimental de maior concentração (10 µg/L), em relação aos demais tratamentos, pode estar associada ao fato de apenas esta dose causar algum desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante e de biotransformação do organismo. Além disso, o aumento na atividade da GST neste órgão pode estar relacionado com o fato de as brânquias serem o primeiro órgão do corpo em contato com o biocida, funcionando como uma rota de entrada, onde a resposta antioxidante começa (Lopes et al., 2020). Fato este, demonstrado em outros estudos, com outros organismos aquáticos expostos ao clorotalonil, onde a atividade GST é induzida em brânquias sob situação de estresse oxidativo (Rosa et al., 2005).

Assim, o aumento da atividade da enzima GST em *Crassostrea rhizophorae*, assemelha-se ao comportamento de *Laeonereis acuta* expostos às mesmas concentrações de clorotalonil do presente trabalho e pode estar relacionado à desintoxicação através de sua conjugação com GSH (Barreto et al., 2018). Reforçando esses resultados, Gallagher et al. (1992) e Lopes et al. (2020) sugerem que a primeira linha de defesa em peixes expostos ao clorotalonil ocorre nas brânquias via metabolização da GSH.

Em relação à glândula digestiva, principal órgão de detoxificação de xenobióticos, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos expostos e o controle, o que pode estar relacionado a um maior acúmulo do composto nesse tecido e consequente depleção dos níveis de GSH (Gallagher et al., 1992), ou ainda, o composto pode estar afetando o processo de regeneração da GSH, via oxidação, comprometendo a manutenção de seus níveis (Torres, 2019).

Para o DCOIT, a concentração de 10 µg/L causou o aumento da atividade da enzima GST no músculo adutor, brânquia e glândula digestiva, reforçando seu papel de detoxificação frente a exposição ao composto em questão (Morionnet et al., 2006). Níveis significativamente mais altos em atividades de enzimas relacionadas à defesa antioxidante como GST também foram observadas após exposição a 10 µg/L a este composto em corais (Cima et al., 2013) e em poliquetas (Eom et al., 2019). Estes autores afirmam que pouco se sabe sobre a modulação da biotransformação DCOIT, com base no sistema enzimático especializado que compreende as fases I e II da biotransformação, sugerindo que novos experimentos sejam conduzidos para esclarecer o envolvimento do GST na desintoxicação deste composto.

Em brânquias, além de um aumento na atividade da enzima na maior concentração (10 µg/L), também houve um aumento na menor concentração (0,1 µg/L), reforçando a toxicidade deste biocida em pequenas quantidades para a brânquia e evidenciando-a como importante sítio de ação. Em geral, a brânquia constitui-se como um importante alvo dos poluentes presentes na água, devido à sua extensa área superficial (Viarengo, 1989; Garcia-Santos et al., 2007) e tem ganhado destaque em estudos ecotoxicológicos. No presente estudo, podemos concluir que as brânquias se demonstraram sensíveis aos dois compostos, o que nos leva a propor estudos futuros que investiguem os efeitos desses compostos também sobre as principais funções fisiológicas desse órgão, tais como filtração, respiração e trocas iônicas.

O aumento na lipoperoxidação em exposição ao clorotalonil no músculo adutor foi observado entre os grupos de menor concentração do composto 0,1 µg/L, enquanto na glândula digestiva observou-se um aumento em ambas as

concentrações de exposição (0,1 µg/L e 10 µg/L). Barreto et al. (2018) demonstraram que a exposição ao clorotalonil também causou o mesmo efeito nos tecidos do poliqueta quando expostos a 10 µg/L.

Em relação às brânquias, os resultados encontrados foram contrários dos outros tecidos, com uma diminuição dos níveis de LPO na concentração de 10 µg/L, reforçando a atuação da GST, que neste tecido foi mais elevada, o que demonstra o desempenho da atividade de peroxidase, exercendo um papel antioxidante suplementar significativo na célula (Barata et al., 2005). Esta relação foi observada também por Torres (2019) em brânquias de peixes expostos ao mesmo composto. De acordo com Bebianno and Barreira (2009) e Lima et al. (2007), variações no comportamento da oxidação lipídica estão associadas às diferenças nos níveis e natureza dos compostos orgânicos, assim como aos mecanismos de defesa relacionados a capacidade antioxidante específica que cada composto gera.

Já para os organismos expostos ao DCOIT, no músculo adutor, foram encontradas diferenças significativas entre a menor (0,1 µg/L) e a maior (10 µg/L) concentração do composto em relação aos controles, no entanto, o comportamento observado foi a diminuição da lipoperoxidação. Enquanto nas brânquias o DCOIT atuou aumentando a lipoperoxidação 10 µg/L e diminuindo em 0,1 µg/L. Já para a glândula digestiva ocorreu um aumento da oxidação lipídica em ambas as concentrações (0,1 e 10 µg/L). De acordo com Eom et al. (2019), o DCOIT age no aumento significativo de produtos relacionados a lipoperoxidação de maneira dependente da dose e do tempo. Comportamento este, também encontrado no presente trabalho, evidenciando que o aumento nos níveis de MDA é considerado como prova crucial dos danos oxidativos,

uma vez que este aumento de peróxido lipídico (LPO) é um dos principais contribuintes para a perda de importantes funções celulares (Hermes-Lima et al., 1995).

Considera-se, ainda, nestes processos, o proposto por Lüchmann et al. (2015), que indicam a eficácia na atividade da GST na prevenção de danos nas membranas lipídicas das ostras, e sugerem um efeito de correlação negativa entre GST e LPO, reforçando o papel protetor do GST em *C. brasiliiana* após a exposição a compostos orgânicos tais como o hidrocarboneto.

A atividade da AChE foi determinada nas frações solúvel e de membrana no músculo adutor dos organismos expostos ao clorotalonil e ao DCOIT. Apenas a maior concentração (10 µg/L) de ambos os compostos causou alterações em ambas as frações quando comparados aos demais grupos experimentais. Em relação ao clorotalonil, Torres (2019) encontrou comportamento igual ao descrito no presente trabalho, para a espécie de peixe *Micropogonias furnieri*. Este aumento da atividade da AChE, também descrito por Moraes et al. (2007), pode ser um mecanismo de compensação ao estresse causado pelo composto que o organismo está sujeito ou como resposta a uma hiperexcitação causada pelo composto (Chen et al., 2014), no entanto, maiores estudos seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Já em relação ao DCOIT, a atividade da AChE foi inibida, comportamento esperado para moluscos bivalves expostos a xenobióticos orgânicos, como descrito por Ricciardi et al. (2006) e Lionetto et al. (2003). Comportamento semelhante também foi descrito para peixes (Do et al., 2018), crustáceos (Chen et al., 2014) e poliquetas (Eom et al., 2019) expostos, especificamente, a concentração de DCOIT de 10 µg/L, sugerindo um dano

neurotóxico, com o potencial para perturbar a neurotransmissão no sistema colinérgico.

Uma diminuição da atividade do AChE reduz a hidrólise do ACh em colina e conseqüentemente induz sua acumulação nas sinapses e junções neuromusculares. Assim, a inibição da atividade da AChE pode exercer efeitos deletérios sobre a fisiologia do organismo, interferindo a fisiologia normal da comunicação nervosa, comprometendo inúmeras funções fisiológicas (Rotundo, 2003).

Desta forma, no presente trabalho foi possível observar respostas biológicas em tecido das ostras expostas ao clorotalonil e DCOIT que poderiam ser utilizadas como biomarcadores de contaminação ambiental por biocidas. No entanto, como mencionado por Moncaleano-Nino et al. (2018) a atividade da colinesterase não é um biomarcador específico de exposição, mas, sim, um biomarcador de exposição a múltiplos xenobióticos, o que vale aos demais biomarcadores analisados no presente trabalho.

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que as concentrações sub-letais dos dois compostos estudados (clorotalonil e DCOIT) são bioquimicamente tóxicas e possuem efeitos nocivos para a espécie estudada, através da indução do estresse oxidativo, da peroxidação lipídica e modulação do sistema colinérgico. Além disso, foi possível empregar a espécie *Crassostrea rhizophorae* como organismo monitor para análise destes biomarcadores expostos ao clorotalonil e DCOIT através de ensaios toxicológicos. O estudo demonstrou também que os endpoints analisados também atuam como biomarcadores de exposição e efeitos a biocidas. Desta forma, espera-se que este trabalho possa contribuir para futuros estudos a respeito dos mecanismos de ação destes biocidas, de forma a elucidar vias específicas de toxicidade que auxiliem no monitoramento dos biocidas em questão. Sugere-se, também, que o emprego destes biocidas anti-incrustantes deva ser continuamente monitorado, uma vez que a exposição em longo prazo possivelmente tende a causar efeitos ainda mais severos às espécies e ecossistemas aquáticos.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por meio do Edital Ciências do Mar nº 43/2013 (Projeto CIMAR nº 1988/201); Financiadora de Inovação e Pesquisa – FINEP, pelo Projeto AIBRASIL 2 e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA pela concessão da bolsa. Aos laboratórios parceiros: Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox) da UFMA; Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia (CONECO) do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG); Laboratório de Fisiologia da UFMA (LEFisio); e Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

REFERÊNCIAS

- Armstrong, D. A., Buchanan, D. V., Caldwell, R. S., 1976. A mycosis caused by *Lagneidium* sp. in laboratory-reared larvae of the dungeness crab, *Cancer magister*, and possible chemical treatments. J. Invertebr. Pathol. 28, 329– 336.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J. C., et al., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 140, 2, 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.013>.
- Barreto, J. S., Tarouco, F. M., Godoi, F. G. A., et al., 2018. Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta*. Aquatic Toxicology 196, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.004>.
- Bebianno, M. J., Barreira, L. A., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussates* transplanted in the Ria Formosa lagoon. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72, 7, 1849-1860. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.016>.
- Bellas, J. 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. Science of the Total Environment, 367, 573–585. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.028>.
- Belzunces, L. P., Toutant, J. P., Bounias, M., 1988. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X- 114 phase separation. Biochem. J. 255, 463–470. <https://doi.org/10.1042/bj2550463>.
- Castro, I. B., Westphal, E., Fillmann, G, 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. Química Nova, 34, 6, 1021–1031. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000600020>.

Castro, M. S., 2018. Genotoxicidade e mutagenicidade do biocida anti-incrustante clorotalonil na espécie *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

Caux, P. Y., Kent, R. A., Ventilador, G. T., et al., 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil - a Canadian perspective. *Critical Reviews of Environmental Science and Technology*, 26, 45-93. <https://doi.org/10.1080/10643389609388486>.

Chaves, V. de S., Marcon, J. L., Duncan, W. P., Alves-Gomes, J. A., 2020. Acute toxicity of a deltamethrin based pesticide (DBP) to the Neotropical electric fish *Microsternarchus cf. bilineatus* (Gymnotiformes). *Acta Amazonica*, 50, 4, 355-362. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201904001>.

Chen, L., Ye, R., Xu, Y., et al., 2014. Comparative safety of the antifouling compound butenolide and 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) to the marine medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*. 149, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.023>.

Cima, F., Ferrari, G., Ferreira, N. G. C., et al., 2013. Preliminary evaluation of the toxic effects of the antifouling biocide Sea-Nine 211™ in the soft coral *Sarcophyton cf. glaucum* (Octocorallia, Alcyonacea) based on PAM fluorometry and biomarkers. *Mar. Environ. Res.* 83, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.10.004>.

Cima, F., Bragadin, M., Ballarin, L., 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes. *Aquatic Toxicology*, 86, 2, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.010>.

Depledge, M. H., Aagaard, A., Györkös, R., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*. 31: 19-27. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00006-9](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00006-9).

Do, J. W., Haque, M. N., Lim, H. J., et al., 2018. Constant exposure to environmental concentrations of the antifouling biocide Sea-Nine retards growth and reduces acetylcholinesterase activity in a marine mysid. *Aquatic Toxicology*, 205, 165-173. <https://doi.org/j.aquatox.2018.10.019>.

Dominguez, L. A., Caldas, S., Primel, E. G., et al., 2014. The Influence of Salinity and Matrix Effect in the Determination of Antifouling Biocides in Estuarine Waters of Patos Lagoon (Southern Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 7, 1302-1310. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140110>.

Ellman, G. L; Courtney, K. D., Andres Jr., V., et al., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

Eom, H. J., Haque, M. N., Nam, S. E., et al., 2019. Effects of sublethal concentrations of the antifouling biocide Sea-Nine on biochemical parameters of the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 222, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.05.001>.

Ernst, W., Doe, K., Jonah, P., et al., 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF01055550>.

Fernández-Alba, A. R., Hernando, M. D., Piedra, L., et al., 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* 456, 2, 303–312. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00037-5).

Gallagher, E. P., Canada, A. T., Di Giulio, R. T., 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonilinduced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 23, 155-168. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90049-S](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90049-S).

Gallo, A., Tosti, E., 2015. Reprotoxicity of the antifoulant chlorothalonil in ascidians: an Ecological Risk Assessment. PLoS ONE. 10:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123074>.

Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., et al., 2007. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59, 2, 376-381. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000200017>.

Guerreiro, A. D. S., Rola, R. C., Rovani, M. T., et al. 2017. Antifouling biocides: Impairment of bivalve immune system by chlorothalonil. Aquatic Toxicology, 189, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.012>.

Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., Storey, K. B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. Free Radic. Biol. Med. 19, 271–280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X).

Jacobson, A. H., Willingham, G. L., 2000. Sea-Nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. Sci. Total Environ. 258, 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00511-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00511-8).

Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W., 1976. Mechanism for the several activities of the Glutathione-S-Transferase. The Journal of Biological Chemistry. 251, 6183-6188. PMID: 977564.

Kobayashi, N., Okamura, H., 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Mar. Pollut. Bull. 44, 748–751. [https://doi.org/10.1016/S0025-326\(02\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326(02)00052-8).

Lionetto, M. G., Caricato, A. C., Giordano, M. E., et al., 2003. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. BioMed Research Internacional, 2013, ID 321213, 8 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/321213>.

Lopes, F. C., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., et al., 2020. Impacts of the biocide chlorothalonil on biomarkers of oxidative stress, genotoxicity, and sperm quality in guppy *Poecilia vivípara*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 188, 109847. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109847>.

Lüchmann, K. H., Clark, M. S., Bainy A. C. D., et al., 2015. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. *Aquatic Toxicology*. 166, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.012>.

Martins, S. E., Fillmann, G., Lillicrap, A., et al., 2017. Review: ecotoxicity of organic and organo-metallic antifouling co-biocides and implications for environmental hazard and risk assessments in aquatic ecosystems, *Biofouling*. 34, 1, 34-52. <https://doi.org/10.1080/089270014.2017.1404036>.

Mayer, F. L. 1987. *Acute Toxicity Handbook of Chemicals to Estuarine Organisms*. Gulf Breeze, Florida. Washington DC. U.S. Environmental Protection Agency (EPA-600/8-017; NTIS PB 87-188686).

Miranda dos Santos, C. C., 2018. Modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo em duas espécies de invertebrados com potencial para biomonitoramento. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém.

Mochida, K., Amano H., Onduka T., et al., 2010. Toxicity of 4,5-dichloro-2-n-octyl-3 2H-isothiazolone Sea-Nine 211 to two marine teleostean fishes. *Biology Japaneses Journal of Environmental Toxicology*. 13. 105-116. <https://doi.10.11403/JSET.13.105>.

Moncaleano-Niño, A., Ahrens, M. J., Cubillos, M. C. G., et al., 2018. Respuesta de los biomarcadores Metalotioneína y Colinesterasa em bivalvos de

ecosistemas marino costeros del Caribe Colombiano. Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular.

Montforts, M. H. M. M., 1999. Chlorothalonil. CSR Advisory Report 06105A00.

Oakes, K. D., Der Kraak, G. J. V., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00204-7).

Okamura, H., Watanabe, T., Aoyama, I., et al., 2002. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere*. 46, 7, 945-951. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00204-1).

Prates, A. P. L., Gonçalves, M. A., Rosa, M. R., 2012. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil. Brasília: MMA. 152 p.

Ricciardi, F., Binelli, A., Provini, A., 2006. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63, 3, 406-412, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.007>.

Rosa, E. F., Silva, A. C., Ihara, S. S. M., et al., 2005. Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging. *Journal of Applied Physiology*. 99, 4, 1569-1575. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00417.2005>.

Rontundo, R. L., 2003. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* 32, 5-8, 743-766. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000020621.581.97.d4>.

Sandahl, J. F., Jenkins, J. J. 2002. Pacific steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to chlorpyrifos: Benchmark concentration estimates for

acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 11, 2452-2458. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211126>.

Sánchez-Garayzar, A. B., Betancourt-Lozano, M., Martyniuk, C. J., et al., 2016. Molecular, biochemical and behavioral effects of the pesticide chlorothalonil in the zebrafish (*D. rerio*). *Toxicology Letters*, 259, S224. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.538>.

Shade, W., Hurt, S., Jacobson, A. et al., 1993. Ecological Risk Assessment of a Novel Marine Antifoulant. In: GORSUCH, J., Dwyer, F., Ingersoll, C., et al., *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Second Volume* (West Conshohocken, PA: ASTM International. 381-408. <https://doi.org/10.1520/STP13169S>.

Silva, C. A. R., Smith, B. D., Rainbow, P. S., 2006. Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Marine Environmental Research*, 61, 4, 439–455. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.02.001>.

Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, I. B., et al., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *J. Hazard. Mater.* 330, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>.

Team, R. C. R., 2012. A language and environment for statistical computing. Viena, Áustria.

Torres, T. A., 2019. Avaliação de biomarcadores bioquímicos no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* exposto agudamente ao anti-incrustante clorotalonil. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

U.S. EPA Office of Pesticide Programs, 2000. Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). Environmental Fate and Effects Division, U.S. EPA, Washington, D.C. Mayer, 1987.

Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Reviews in Aquatic Sciences*, 1, 295-317.

Yamada, H., 2006. Toxicity and preliminary risk assessment of alternative antifouling biocides to aquatic organisms. *In*: Konstantinou, I. K. (eds.). *Antifouling Paint Biocides. The Handbook of Environmental Chemistry*, 50. Springer, Berlin, Heidelberg. 213–226. https://doi.org/10.1007/698_5_056.

Yokoyama, T., Saka, H., Fujita, S., et al., 1988. Sensitivity of Japanese eel, *Anguilla japonica*, to 68 kinds of agricultural chemicals. *Bull. Agric. Chem. Insp. Stn.* 28, 26–33.

Zanette, J., Monserrat, J. M., Bianchini, A., 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 143, 2, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.001>.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glutathiona-S-transferase – GST ($\mu\text{mol CDNB/min/mg}$ proteína) em músculo adutor, brânquias e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostos ao clorotalonil. Grupos experimentais: (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (C1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil; e (C2) 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 2. Glutathiona-S-transferase – GST ($\mu\text{mol CDNB/min/mg}$ proteína) em músculo adutor de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* exposto ao DCOIT. Grupos experimentais: (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (D1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT; e (D2) 10 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 3. Lipoperoxidação – LPO (nmol MDA/mg proteína) em músculo adutor, brânquias e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostos ao clorotalonil. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (C1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil e (C2) 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 4. Lipoperoxidação – LPO (nmol MDA/mg proteína) em músculo adutor, brânquias e glândula digestiva de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* expostos ao DCOIT. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (D1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT e 10 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 5. Atividade da Acetilcolinesterase – AChE (μmol tiocolina/min/mg proteína) em músculo adutor de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* exposto ao clorotalonil. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (C1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil e (C2) 10 $\mu\text{g/L}$ de clorotalonil. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 6. Atividade da Acetilcolinesterase – AChE (μmol tiocolina/min/mg proteína) em músculo adutor de juvenis de *Crassostrea rhizophorae* exposto ao DCOIT. Grupos experimentais (A) controle sem solvente; (B) controle com solvente; (D1) 0,1 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT e (D2) 10 $\mu\text{g/L}$ de DCOIT. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados estão representados como a média $\pm$ desvio padrão. * indica média significativamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

FIGURAS

Figura 1

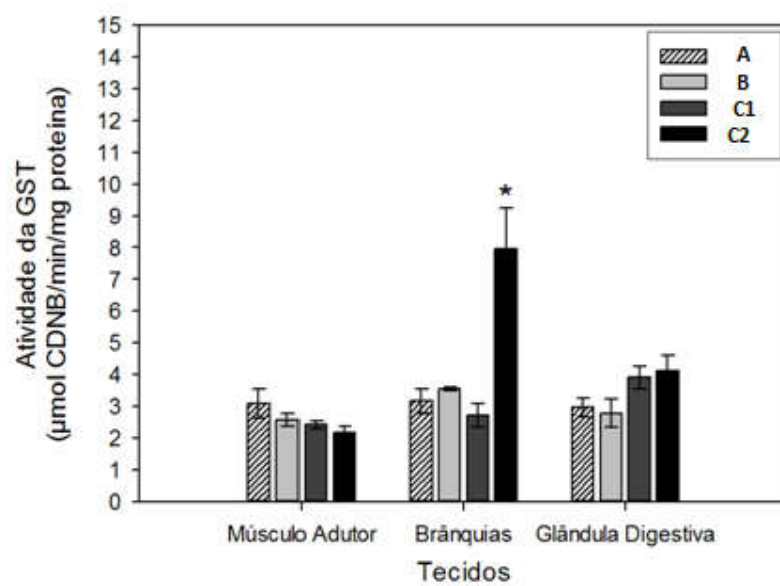


Figura 2

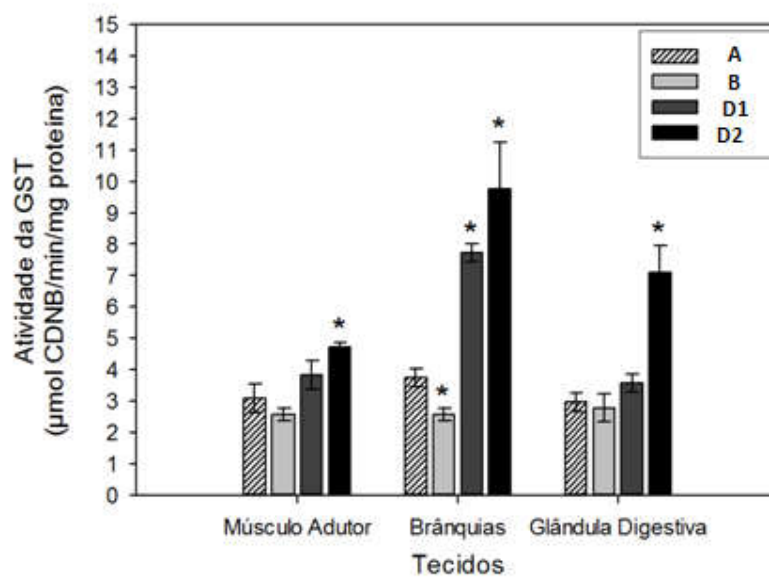


Figura 3

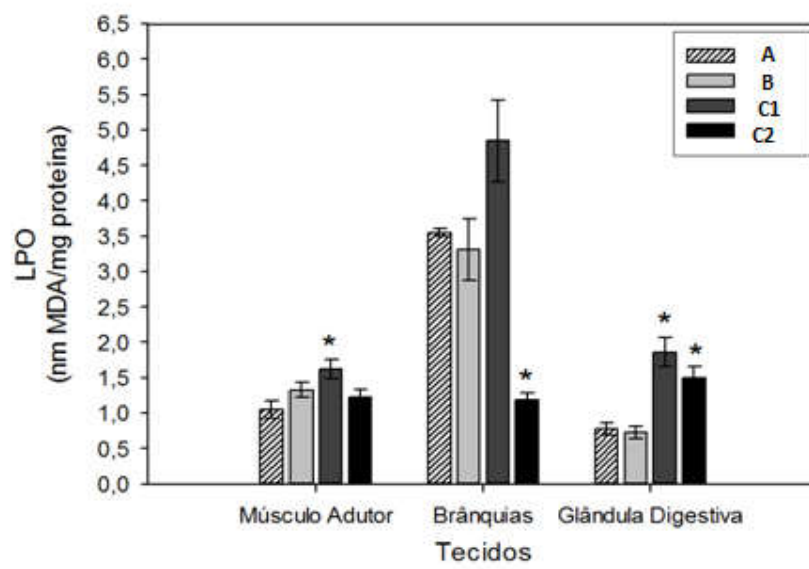


Figura 4

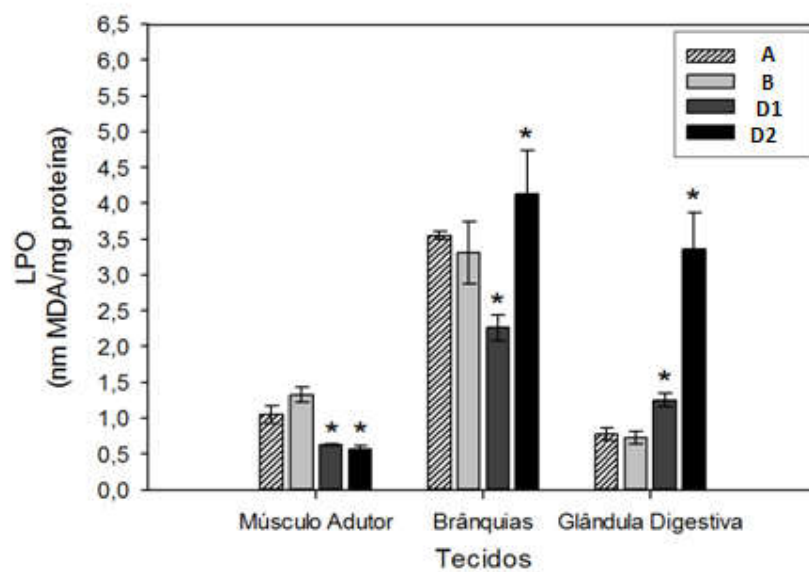


Figura 5

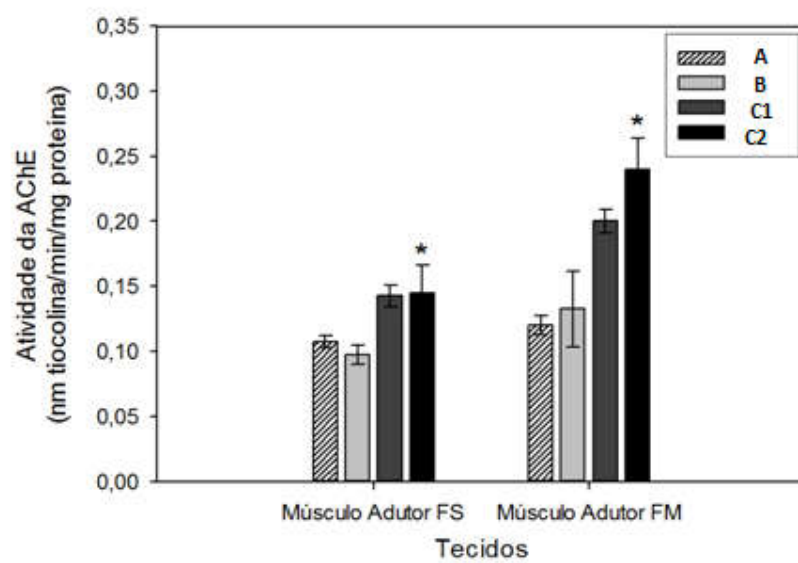
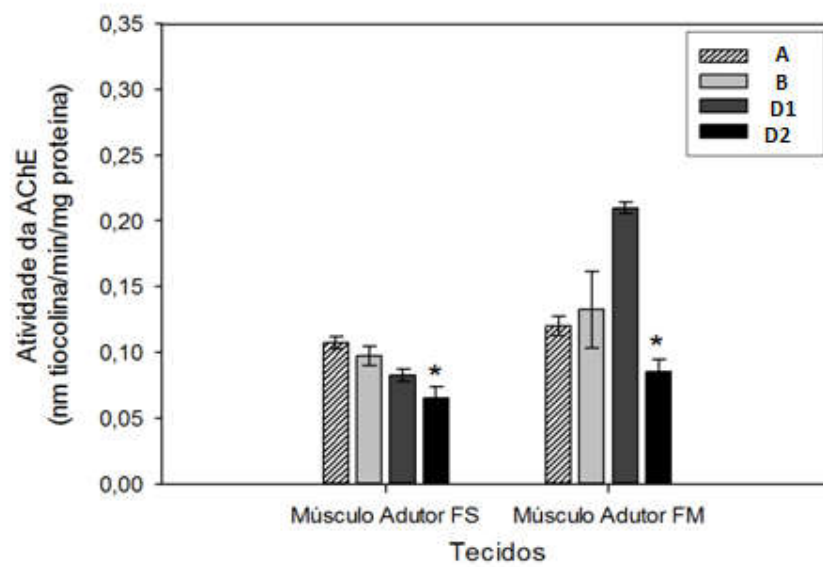


Figura 6



ANEXOS

NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS: REVISTA “Marine Pollution Bulletin”

ISSN 0025-326X

Revista “Marine Pollution Bulletin” (Online)

Área de Avaliação: Biodiversidade

Qualis: A1

REGRAS PARA PREPARAÇÃO DE NOVA SUBMISSÃO

A submissão a este periódico segue totalmente online. Pode ser um arquivo PDF ou um documento do Word, em qualquer formato ou layout que possa ser usado pelos avaliadores para avaliação. As figuras devem estar em alta qualidade. Podem ser enviados todos ou alguns arquivos de origem para a submissão inicial. Figuras individuais com mais de 10 MB devem ser enviadas separadamente.

REFERÊNCIAS

As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Onde for aplicável, o nome (s) do (s) autor (es), título da revista / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo do livro e o número do artigo ou paginação, deve estar presente. O uso do DOI é altamente incentivado. O estilo de referência usada pela revista será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na etapa de revisão. Os dados faltantes serão destacados na fase de revisão para o autor corrigir.

REQUISITOS PARA FORMATAÇÃO

Não há requisitos rigorosos de formatação, mas todos os manuscritos devem conter os elementos essenciais necessário para transmitir o seu manuscrito, por exemplo: Resumo, Palavras-chave, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Conclusões, Figuras e Tabelas com Legendas. Se o artigo incluir

vídeos e/ou outro material suplementar, isso deve ser incluído na submissão inicial para fins de revisão por pares. O artigo deve ser dividido claramente em seções definidas.

RESUMO

O resumo não deve exceder 150 palavras.

PALAVRAS-CHAVE

Imediatamente após o resumo, devem ser fornecidas no máximo 6 palavras-chave, usando ortografia americana e evitando termos gerais, plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, "e", "de"). Onde for relevante, estas devem incluir as principais espécies em causa, a área geográfica e o contaminante. Apenas abreviações estabelecidas firmemente na área podem ser elegíveis. Estas palavras-chave serão usadas para fins de indexação. Observe que as instruções relacionadas ao resumo e ao resumo gráfico ainda se aplicam às novas submissões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados nos permitem concluir que:

1. As concentrações sub-letais dos dois compostos estudados (clorotalonil e DCOIT) são bioquimicamente tóxicas e possuem efeitos nocivos para a espécie estudada;
2. Os compostos (clorotalonil e DCOIT) são capazes de causar danos como a indução do estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e a modulação do sistema colinérgico;
3. É possível empregar a espécie *Crassostrea rhizophorae* como organismo monitor para análise destes biomarcadores expostos ao clorotalonil e DCOIT através de ensaios toxicológicos;
4. As análises realizadas trazem informações importantes para avaliação de risco ambiental pela presença dos compostos clorotalonil e DCOIT aos organismos aquáticos.