UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

ANDRÉ VINÍCIUS OLIVEIRA DE GODOI

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TINTA IMPERMEABILIZANTE EM ESTRUTURAS DE CONCRETO SOBRE OSTRAS DA ESPÉCIE *Crassostrea brasiliana*

SANTOS/SP
2020

ANDRÉ VINÍCIUS OLIVEIRA DE GODOI

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TINTA IMPERMEABILIZANTE EM ESTRUTURAS DE CONCRETO SOBRE OSTRAS DA ESPÉCIE *Crassostrea brasiliana*

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Prof. Dr. Tomas Angel del Valls Casillas e do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

SANTOS/SP
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

615.902 Godoi, André Vinícius Oliveira de.
G531a Avaliação ecotoxicológica de tinta impermeabilizante em estruturas de concreto sobre ostras da espécie *Crassostrea brasiliana* / André Vinícius Oliveira de Godoi. – 2020.
48f.:il

Orientador: Prof. Dr. Tomas Angel del Valls Casillas
Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2020.

1. Tintas anti-incrustantes. 2. Píeres. 3. Estacas
4. Organismos aquáticos. 5. Toxicidade. I. Casillas, Tomas Angel del Valls. II. Pereira, Camilo Dias Seabra. III. Avaliação ecotoxicológica de tinta impermeabilizante em estruturas de concreto sobre ostras da espécie *Crassostrea brasiliana*.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, 'in memorian', à minha esposa, aos meus familiares e amigos, e aos meus mestres, pelo apoio e incentivo dados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser fiel em todas as promessas que se cumprem em minha vida, pois através dele encontro forças e fé para não desistir nunca dos meus objetivos.

Meu orientador, Prof. Dr. Tomas Angel Del Valls Casilas pelo auxílio na construção do projeto, soluções dadas ao longo do experimento e projeções futuras da pesquisa, pois fico muito honrado em ter uma referência como orientador. Obrigado Professor!

Meus coorientadores, Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e o Prof. Dr. Ítalo Braga de Castro, pela paciência, pelo suporte dado em momentos de indecisão e muitas dúvidas que chegaram ao longo do caminho, por acreditarem que seria possível um estudo aliando engenharia e biologia, áreas tão distintas, mas que estou amando mais a cada dia que passa. Saibam que vocês são grandes referências em minha caminhada, pois pude perceber que a pesquisa muda o nosso pensamento, a perspectiva e o agir. Mais uma vez obrigado!

Às universidades UNISANTA, UNIFESP, UNESP, UFPE e UFRGS pelo suporte e estrutura institucional oferecida para realização dos estudos e ensaios nos laboratórios de ecotoxicologia e de química.

A bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Ursulla Souza, por ter apresentado e me convencido que esse mestrado seria muito bom em diversos aspectos, onde superou minhas expectativas, e pelo incentivo dado na construção do meu projeto a cada apresentação na disciplina de pesquisa de dissertação.

Ao Prof. Dr. Aldo Ramos Santos, por fazer parte de minha formação como Engenheiro Civil a agora como Mestre em Ecologia, um grande exemplo de perseverança e profissionalismo. Um grande amigo que fiz nas caronas, em que compartilhávamos diversos assuntos.

Ao Prof. Dr. Fábio Giordano, por tornar suas aulas e saídas de campo tão interessantes e atrativas, que se tornaram temas de grandes assuntos em meu dia a dia com alunos, amigos e familiares.

À Profa. Dra. Milena Ramires, pela saída de campo e pelas aulas, que

superaram minhas expectativas, mudando minha visão da ecologia, sendo uma área tão diferente ao meu cotidiano.

À Prefeitura Municipal de Santos (PMS) pelo apoio ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

À ETEC Aristóteles Ferreira, pela disponibilização dos laboratórios de Edificações e dos equipamentos utilizados para execução dos corpos de prova, empregados nos ensaios.

Aos meus pais *in memorian*, por serem grandes referências de honestidade, perseverança e sabedoria, nos momentos que compartilhamos tais passagens em vida. Muita saudade e gratidão por tudo que fizeram por mim. Obrigado meus amores!

Aos meus irmãos Cibele e Rafael, por serem tão importantes em minha vida e entenderem dentro do possível, minha ausência em momentos decisivos na busca dos meus objetivos. Amo Vocês!

Minha esposa Viviane Godoi, minha grande amiga, companheira, auxiliadora e uma grande mulher de Deus. Exemplo de fé, perseverança em tudo que se propõe a fazer. Principal incentivadora de minhas decisões e de tudo que conquistei até hoje. Te amo linda!

Agradeço ao suporte nos estudos e ensaios dados pela Mestre Mayana Karoline Fontes, Mestre Caio Nobre, Prof. Dr. Fernando Cortez, Prof. Dr. Fábio Pusceddu, Mestre Bruno, Mestre Beatriz Barbosa e aos estagiários dos laboratórios de Ecotoxicologia da Unisanta.

Ao amigo Roberto Toyama pelo suporte técnico e pelo empenho no fornecimento dos materiais que foram utilizados nos ensaios.

Como poderia não falar da Ana Chiovatto, uma grande companheira nessa jornada da pesquisa, em que nos propomos a estudar, a engenharia, fácil para mim, difícil para você, e vice-versa na área da biologia. Obrigado pela sua ajuda!

Minha família e amigos, tão importante em toda minha caminhada, e formação em todos os aspectos, em especial aos meus avôs André e Joaquim *(in memorian)* e avós Minervina e Doralice *(in memorian)*, muitas lembranças maravilhosas, ou seja muitas pessoas especiais, que sempre contribuíram para se fazer verdade a palavra, que diz: “mas há um amigo mais chegado do que um irmão” (Provérbios 18:24).

EPÍGRAFE

“Qualquer filosofia que trate apenas do aqui e agora não serve para o homem”

(Billy Graham)

RESUMO

Atualmente são executados diferentes tipos de construções de píeres, porém nas estacas, as técnicas utilizadas se limitam ao concreto estrutural aparente. Ataques de organismos incrustantes e as variações de maré têm um papel fundamental no desgaste superficial dessas estruturas de atracação. Tendo em vista tais fenômenos, e constantes recuperações estruturais, os terminais marítimos adotaram o uso de tintas antiincrustantes e/ ou impermeabilizantes utilizadas em embarcações e construções convencionais, que foram adaptadas para estruturas fixas de concreto armado expostas à água do mar. O presente trabalho visou avaliar os efeitos toxicológicos causados em ostras da espécie *Crassostrea brasiliana* expostas a estacas pintadas com tinta impermeabilizante Weber em aquários com salinidade, temperatura e alimentação controladas. No T0 e após 48 horas de exposição, foram avaliadas a biometria, mortalidade e o estado de saúde dos organismos através do ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro. Os resultados indicam diminuição da estabilidade da membrana lisossômica, sugerindo estresse fisiológico severo, entretanto não houve mortalidade no período avaliado.

Palavras Chave: tintas antiincrustantes. píeres. estacas. organismos aquáticos. toxicidade.

ABSTRACT

Currently, different types of pier construction are performed, but in piles, the techniques used are limited to the apparent structural concrete. Attacks from fouling organisms and tidal variations play a fundamental role in the superficial wear of these mooring structures. In view of these phenomena, and constant structural recoveries, marine terminals adopted the use of antifouling and / or waterproofing paints used in conventional vessels and constructions, which were adapted for fixed reinforced concrete structures exposed to sea water. The present work aimed to evaluate the toxicological effects caused in oysters of the species *Crassostrea brasiliana* exposed to cuttings painted with waterproofing paint Weber in aquariums with controlled salinity, temperature and feeding. At T0 and after 48 hours of exposure, the biometrics, mortality and health status of the organisms were evaluated by testing the retention time of the neutral red dye. The results indicate a decrease in the stability of the lysosomal membrane, suggesting severe physiological stress; however, there was no mortality in the evaluated period.

Keywords: antifouling paints. piers. stakes. aquatic organisms. toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ostra *Crassotrea brasiliana* adulta.....20

Figura 2 – A: Concretagem dos corpos de prova. B: Desforma e armazenamento dos corpos de prova, após o grauteamento e cura C: Pintura dos corpos de prova com tinta epóxi Weber.....22

Figura 3 – Desenho experimental do ensaio do teste para a toxicidade da tinta nas ostras 24

Figura 4 – Aquário T2, estacas pintadas para exposição de 30 ostras no Controle e tempo T0 25

Figura 5 – Peroxidação Lipídica (LPO) em brânquias 31

Figura 6 – Peroxidação lipídica (LPO) em glândulas digestivas.....31

Figura 7 – Tempo médio e desvio-padrão de retenção do corante vermelho neutro.....32

Figura 8 – Danos em DNA (*strand break*) em brânquias.....33

Figura 9 – Danos em DNA (*strand break*) em glândulas digestivas.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ficha técnica WEBER. TEC GRAUTE UW.....22

Tabela 2 – Ficha técnica WEBER. GUARD SF P235.....23

Tabela 3 – Parâmetros operacionais para a determinação dos analitos por ICP – MS e ICP OES.....26

Tabela 4 – Elementos traço – Metais.....29

Tabela 5 – Quantificação dos HPAs, DN= Dados não disponíveis, ND= Não Detectado e LQ= Limite de Quantificação resultando na somatória dos HPAs disponíveis nos tecidos e na água.....30

Tabela 6 – Média e desvio padrão de dados biométricos nos diferentes tratamentos.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	–	Área
ABNT	–	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	–	Análise de variância
As	–	Arsênio
Br	–	Brânquias
°C	–	Graus Celsius
CA	–	Controle Água
$Ca(OH)_2$	–	Hidróxido de Cálcio
CE	–	Controle Estaca
Cd	–	Cádmio
Cr	–	Cromo
cm	–	Centímetro
cm^2	–	Centímetro quadrado
Cu	–	Cobre
DNA	–	Danos em DNA (*strand breaks*)
DTT	–	Ditiotreitol
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETEC	–	Escola Técnica Estadual
Fe	–	Ferro
FISPQ	–	Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos
g/cm^3	–	Grama por centímetro cúbico
GD	–	Glândula Digestiva
h	–	Altura
Hg	–	Mercúrio
HPAs	–	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
ICP-MS	–	*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*
ICP-OES	–	*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
IMO	–	*International Maritime Organization*
KCL	–	Cloreto de potássio

Kg	–	Quilograma
Kg/dm³	–	Quilograma por decímetro cúbico
L	–	Litro
L min	–	Litro por minuto
LMS	–	Estabilidade de membrana lisossômica
LPO	–	Peroxidação lipídica
m	–	Metro
m²	–	Metro quadrado
MDA	–	Malondialdeído
mg	–	Miligrama
Mg	–	Magnésio
mg.ml	–	Miligrama por Mililitro
ml	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
Mn	–	Manganês
MPa	–	Mega Pascal
m/z	–	Massa / Carga
NBR	–	Norma Brasileira
NR	–	Corante Vermelho Neutro
NRRT	–	Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro
Ni	–	Níquel
NO VOC	–	*No Volatile Organic Compound*
Pb	–	Chumbo
pH	–	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	–	*Phenylmethylsulfonyl fluoride*
Se	–	Selênio
Sn	–	Estanho
TBARS	–	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBT	–	Tributilestanho
TPT	–	Trifenilestanho
TRIS	–	Hidroximetil
UFPE	–	Universidade Federal de Pernambuco
UFRGS	–	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNESP	–	Universidade Estadual Paulista
UNIFESP	–	Universidade Federal de São Paulo
UNISANTA	–	Universidade Santa Cecília
W	–	Watt
Zn	–	Zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....08
ABSTRACT.....09
LISTA DE FIGURAS.....10
LISTA DE TABELAS.....11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....12
1 INTRODUÇÃO.....16
2 OBJETIVOS.....19
2.1 Objetivo Geral.....19
2.2 Objetivos Específicos.....20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....20
3.1 Organismo – Teste: *Crassostrea brasiliana*.....20
3.2 Desenho Experimental.....21
3.3 Caracterização química da tinta, dos meios de exposição e bioacumulação.....25
3.4 Preparação das amostras.....26
3.5 Proteínas totais.....27
3.6 Peroxidação Lipídica (LPO).....27
3.7 Estabilidade da Membrana Lisossômica.....27
3.8 Danos em DNA (*Strand breaks*) 28
3.9 Análise Estatística.....28
4 RESULTADOS.....28
4.1 Metais.....28
4.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....29
4.3 Biometria das Ostras.....30
4.4 Peroxidação Lipídica – (LPO).....31
4.5 Estabilidade da Membrana do Lisossomo – (LMS).....32
4.6 Danos em DNA.....32
5 DISCUSSÃO.....34
6 CONCLUSÕES.....38
TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....40
APÊNDICE A – DADOS BIOMÉTRICOS.....45
APÊNDICE B – ENSAIO DO TEMPO DE RETENÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO.....47

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Almeida, Diamantino e Sousa (2007) os processos corrosivos são potencializados devido à exposição das estruturas à água do mar e diferentes tipos de incrustações de organismos conhecidos genericamente como *"fouling"*. Tais organismos incrustantes causam diferentes danos para as embarcações, tanto para conservação da estrutura, quanto para o rendimento e autonomia, sendo eles: aumento do atrito entre o casco e a água, maior frequência nas manutenções, aumento do processo corrosivo no casco, introdução de espécies invasoras de diferentes ambientes marinhos (KOTRIKLA, 2009).

A fim de encontrar alternativas de combate às incrustações, foram experimentados diferentes tipos de materiais, desenvolvidos pelas civilizações Gregas, Romanas, Cartagineses e Fenícios, os quais aplicaram como pintura nos cascos: asfalto, ceras naturais, derivados de chumbo e cobre (YEBRA; KIIL; DAM-JOHANSEN, 2004).

Entre as décadas de 1940 e 1950 tintas de primeira geração ficaram conhecidas por sua incapacidade de proteção em longo prazo, tornando o processo de proteção das embarcações inviável devido à durabilidade das tintas à base de óxidos metálicos ser inferior a um ano (CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011).

Já na década seguinte, foi desenvolvida a primeira tinta anti-incrustante, que foram classificadas como tintas de segunda geração, por ter à sua base composto organoestânico e um princípio ativo de tributilestanho (TBT) e/ou trifenilestanho (TPT) (CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012). O (TBT) e o (TPT) foram muito utilizados até 2008, pois eram compostos altamente eficazes contra os organismos marinhos, mas também tornou-se evidente que ambos apresentavam alta toxicidade, fatos estes que levaram a proibições pela Organização Marítima Internacional (IMO, 2016).

Segundo Thomas e Brooks (2010), no início da década de 1990 foram lançados novos produtos a fim de impedir o ataque dos organismos incrustantes, sendo eles: Irgarol, Diuron, Clorotalonil, Dicloflua, Seanine, Zinco piritiona, todos com bases diferentes das tintas de primeira e segunda geração utilizadas em

décadas anteriores.

De acordo com (HEMPEL, 2014), as tintas para aplicação em ambientes marítimos têm como características fundamentais, seu alto poder de fixação ao substrato, pois sua aplicação depende de situações favoráveis de maré e agilidade no manuseio, e um material de secagem rápida. Sendo assim, tais superfícies passam por diferentes tipos de manutenções, onde são incluídas tintas impermeabilizantes e antiincrustantes.

Segundo Castro, Westphal e Fillmann (2011), na busca pelo antiincrustante de alto desempenho, a indústria naval tem procurado equilibrar eficiência e a durabilidade dos novos produtos com níveis de toxicidade ambientalmente toleráveis. Vários estudos relatam efeitos deletérios do tributilestanho (TBT) em animais marinhos, incluindo imposex, que é a imposição de órgãos sexuais masculinos às fêmeas, em espécies de gastrópodes.

Mais recentemente, diversos fabricantes como: *Weber Saint-Gobain-Quartzolit*®, *MC-Bauchemie*®, Viapol® e *BASF*® desenvolveram produtos específicos a fim de atender as demandas de mercado quanto à manutenção e recuperação de estruturas de concreto marítimas.

Segundo estudos de Lima e Morelli (2004), os organismos incrustantes também causam prejuízos a estruturas de concreto como píeres de atracação, pois moluscos, crustáceos, equinodermos e algas liberam resíduos metabólicos, que por sua vez atacam o substrato. Tais patologias são muito significativas na região de variação de marés, pois seus efeitos são potencializados nas estacas, devido disponibilidade da água e do Oxigênio, necessários à reação de corrosão. A partir desses metabólitos, inicia-se um processo patológico no concreto através da liberação do hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$, substância presente na fabricação do cimento, criando pequenos orifícios na camada de cobrimento, ou protetiva das estruturas, por fim diminuindo a resistência estrutural (COLE, 1953).

Nesse contexto, profissionais especializados em recuperações estruturais portuárias, afirmam que tintas protetivas são um importante aliado, para a durabilidade das estruturas de concreto portuárias, sendo elas: pilares, vigas e lajes. As recuperações estruturais são executadas com materiais cimentícios específicos para ambientes úmidos e saturados, pois todos trabalham com propriedades e características bem semelhantes: redução ou aumento do início

de pega, aumento de resistência ao longo do tempo, boa fluidez, otimização da resistência à tração e à deformidade.

Atualmente as marcas de tintas específicas, para estruturas de concreto em ambientes marinhos disponíveis no mercado têm como principais elementos: pirosulfitos, fosfatos, cotolômeros acrílicos, entre outros**.** Dentre eles existem tintas à base de compostos de epóxi tratados com poliamina, com papel fundamental na impermeabilização de superfícies úmidas e inibição de incrustações.

Na ficha de informações de segurança de produto químico (FISPQ), dentre as técnicas e precauções disponibilizadas pelo fabricante, é indicado que esse produto é nocivo a organismos aquáticos, em conformidade com a ABNT NBR 14725-2:2009. Entretanto, não foram encontrados estudos avaliando os efeitos tóxicos das tintas empregadas em estruturas de píeres, considerando a possível dispersão dos compostos químicos na água do mar e sedimento adjacentes.

A biodiversidade marinha é afetada por diferentes tipos de substâncias lançados ao mar: produtos químicos, combustíveis e esgoto doméstico, entre outros (YOUNG e EVANS, 1972), especialmente em ambientes portuários (GALANTE-OLIVEIRA *et al*., 2010).

Os organismos aquáticos sofrem danos relacionados à exposição a xenobióticos, afetando diretamente processos fisiológicos importantes como a reprodução (PUSCEDDU *et al.*, 2018). Segundo Maranho *et al.* (2014), tais exposições de organismos a resíduos tóxicos afetam diretamente mecanismos genéticos, bioquímicos e celulares, levando ao comprometimento do ciclo de vida.

A ecotoxicologia demonstra a relação causa-efeito entre a ocorrência de xenobióticos e degradação ambiental, pois fornece diretrizes para avaliação e aplicação de ações mitigadoras e investigativas, a fim de monitorar as contaminações e soluções para conservação ambiental. Somente através de tais informações podemos estimar os danos causados aos organismos que ali vivem (ABESSA, 2002).

Atualmente, biomarcadores são utilizados extensivamente para identificar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos de poluentes ambientais. Biomarcadores têm a vantagem de quantificar apenas poluentes biologicamente

disponíveis e integrar efeitos de múltiplos estressores para auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação (ADAMS *et al.*, 1990).

Biomarcadores podem ser definidos como alterações precoces bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser medidas, em amostras de tecidos ou fluídos corporais, ou no nível de organismos inteiros, para fornecer evidências de exposição e / ou efeitos de um ou mais contaminantes (DEPLEDGE; BILLINGHURST, 1999).

Dentre os organismos aquáticos empregados para avaliação de biomarcadores, os bivalves têm demonstrado bons resultados em estudos de campo e laboratório (PEREIRA *et al.,* 2014). Esses organismos são membros importantes do ecossistema aquático e interagem com a água e o sedimento. São organismos sésseis e de vida longa que filtram grandes quantidades de água durante a alimentação e respiração e são particularmente suscetíveis aos estressores ambientais. Estes organismos podem bioacumular poluentes orgânicos e inorgânicos, sendo essas características altamente desejáveis em estudos ecotoxicológicos (GAGNÉ *et al.*, 1995).

As estruturas de concreto em ambientes estuarinos tendem a ser colonizadas por diversos organismos incrustantes, dentre eles bivalves, e desta forma foi escolhida a ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* para realização do estudo ecotoxicológico que se apresenta a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo principal caracterizar a composição da tinta impermeabilizante *Weber Guard* SF P235 da fabricante *Saint-Gobain-Quartzolit*®, bem como seus efeitos tóxicos sobre um organismo séssil estuarino (*C. brasiliana*) após exposição de curto prazo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a composição da tinta *Weber Guard* SF P235 quanto a metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;
- Avaliar as concentrações de metais e HPAs em água e ostras após diferentes tempos de exposição a estacas impermeabilizadas;
- Avaliar efeitos subletais (citogenotoxicidade) em ostras *C. brasiliana* expostas por curto prazo a estacas de concreto impermeabilizadas com a tinta impermeabilizante *Weber Guard* SF P235.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismo-teste: *Crassostrea brasiliana*

Ostras empregadas no estudo são da espécie *Crassostrea brasiliana* (Figura 1) e foram compradas de um cultivo localizado na reserva extrativista do Mandira localizada no município de Cananéia litoral sul do Estado de São Paulo. Ostras desse local têm sido empregadas em estudos ecotoxicológicos anteriores devido às boas condições ambientais (PEREIRA *et al.,* 2014).

Após à obtenção dos organismos, eles ficaram em aclimatação em caixa d'água de 350 L com filtro biológico, vigorosa aeração e fatores físico químicos controlados sendo alimentados a cada 48h, com um concentrado líquido de fitoplâncton marinho (*Fitoplancton Phytogold S, Brighttwell Aquatics®)* com tamanho 4-10 µm por um período de 5 dias.

Figura 1. Ostra *Crassostrea brasiliana* adulta

3.2 Desenho experimental

De acordo com projetos estruturais de engenharia e verificação *in loco* de píeres de atracação de navios, foi calculado que em sua construção, é ocupada uma área de 0,28 estacas de concreto por m², onde as mesmas atuam em uma variação de maré de 3 metros de altura, com diâmetro de 0,80 m, sendo que nessa região, é onde ocorrem as incrustações de organismos marinhos. A fim de proteger as estruturas fixas de concreto de tais ações, é executada a pintura superficial nas estacas.

Dados:

- 3 metros de altura da superfície lateral pintada (área de variação de maré)
- 0,80 metros de diâmetro da estaca ou 0,40 metros de raio
- Valor constante de π

Área lateral a ser pintada:

A: área lateral	**A = 2 π.r.h**
π (Pi): constante de valor 3,14	**A= 2 x 3,14 x 0,40 x 3**
r: raio	**A= 7,53 m²**
h: altura	

Teremos então 7,53 m² de superfície em contato direto com água do mar, sendo assim a pintura epóxi é aplicada na zona de variação, a fim de impermeabilizar o substrato de ataques dos organismos incrustantes e de evitar o desgaste superficial das estacas.

Sendo assim, foram desenvolvidos em laboratório, 12 corpos de prova cilíndricos 5 cm x 10 cm em escala reduzida, de modo a referenciar as estacas cilíndricas de concreto conforme (Figura 2 A, B e C), empregadas na grande maioria dos portos marítimos. Foram utilizados todos os materiais e técnicas de execução para a constituição das estacas *in loco*, conforme método descrito na ABNT NBR 5738 (2002), onde os moldes cilíndricos metálico devem ter a altura igual ao dobro do diâmetro. Após tais etapas, foram pintados 8 corpos de prova e 4 corpos de prova ficaram sem pintura para realização dos tratamentos.

Na aplicação dos 12 corpos de prova, foi adotado as mesmas características encontradas *in loco*, porém em escala reduzida, assim cada peça ficou com uma área de 20 cm².

Figura 2. A: Concretagem dos corpos de prova em laboratório. B: Desforma e armazenamento dos corpos de prova, após grauteamento e cura. C: Pintura dos corpos de prova com tinta epóxi WEBER.

O Concreto utilizado na execução dos 12 corpos de prova foi o *Weber.Tec Graute UW* da fabricante *Saint-Gobain-Quartzolit*®, desenvolvido especificamente para uso subaquático, sua aplicação pode ser feita por gravidade ou vertido por gravidade. Composto por cimento *Portland*, agregados devidamente graduados, aditivos plastificantes compensados de retração e aditivo anti-segregação de finos. Para a preparação do graute, foram adicionados 3,5 litros de água potável para uma embalagem de 30 Kg, sendo misturados manualmente de maneira constante durante 5 minutos, com o auxílio de uma colher de pedreiro com canto reto de 8” e uma caixa plástica de pedreiro com capacidade 20 litros, obtendo assim uma mistura homogênea e fluída, conforme resultado descrito pelo fabricante. A Tabela 1 apresenta a ficha técnica da *Weber.Tec Graute UW*.

Tabela 1. Ficha técnica WEBER, TEC GRAUTE UW.

PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS - WEBER. TEC GRAUTE UW	
Massa unitária	2,120 kg/dm³
Resistência à compressão às 24 horas (NBR 7.215)	20MPa
Resistência à compressão aos 3 dias (NBR 7.215)	35MPa
Resistência à compressão aos 7 dias (NBR 7.215)	45MPa
Resistência à compressão aos 28 dias (NBR 7.215)	60MPa
Relação água / materiais secos	0,12
Tempo em aberto para lançamento a 25 °C	30 minutos
Teor de Cloretos	Isento

Fonte: Catálogo técnico https://www.quartzolit.weber/files/br/2018-01/weber.tec_graute_UW.pdf

Já na pintura dos 8 corpos de prova, utilizamos uma tinta formulada e desenvolvida pela *Weber Saint-Gobain-Quartzolit*®, à base de resina epóxi poliamina, bicomponente, isenta de solventes.

A tinta impermeabilizante *Weber Guard* SF P235 tem como característica, sua dupla função (primer e/ou acabamento) e foi especialmente desenvolvida para atender às exigências ecológicas ‘*’NO VOC’’*. Cura em temperaturas acima de 0°C tolera superfícies úmidas, molhadas, com agressividade química e umidade relativa do ar acima de 85%.

A Tabela 2 apresenta a ficha técnica da *Weber.Tec Graute UW*.

Tabela 2. - Ficha técnica WEBER. GUARD SF P235

PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS - WEBER. GUARD SF P235	
Aspecto da película	Brilhante
Cor	Branco e cores
Sólidos por volume	96 +/-1%
Massa específica máxima	1,60g/cm³
Espessura de filme úmido por demão	208µm
Espessura de filme seco por demão	200µm
Vida útil da mistura a 25°C	90 minutos
Ponto de fulgor	Acima de 200°C
Resistência de aderência	10 MPa
Intervalo mínimo entre demãos a 25°C	12 horas
Intervalo máximo entre demãos a 25°C	24 horas
Tempo máximo de secagem ao toque a 25°C	16 horas
Tempo máximo de secagem ao manuseio a 25°C	24 horas
Tempo máximo de secagem completa a 25°C	7 dias
COV*	36,8 **

Fonte: Catálogo técnico https://www.quartzolit.weber/files/br/2018-01/weber.guard_SF_P235.pdf

Um dia após a concretagem, foi executada a desforma dos 12 corpos de provas, onde os mesmos ficaram submersos em tanques com água por 7 dias, imitando assim a situação de campo, conforme método descrito na ABNT NBR 7215 (1996) onde as estacas ficam totalmente submersas nas variações de maré, onde tal procedimento é crucial para a cura e obtenção da resistência de 35 MPa. Posteriormente, a tinta epóxi foi misturada manualmente com o auxílio de balde plástico de 18 litros e espátula de madeira de 30 cm durante 10 minutos, alcançando assim a homogeneidade desejada do produto.

Foi aplicada a primeira demão da tinta epóxi nos 8 corpos de prova, com

pincel trincha com cerda natural de 1”, no sentido vertical, e após 30 minutos foi aplicada a segunda demão da tinta com o mesmo pincel, no sentido horizontal. Após a segunda demão da pintura, foi feita a secagem superficial da tinta, durante três horas em temperatura ambiente.

Com a secagem da tinta, foram colocados 4 corpos de prova em 3 aquários de vidro com 30 litros de água do mar a salinidade 30, sendo que 1 aquário ficou sem estacas, e em seguida foram colocadas 30 ostras devidamente aclimatadas em 3 aquários.

A Figura 3 apresenta o desenho do experimento para exposição das ostras à tinta e controles de ensaio.

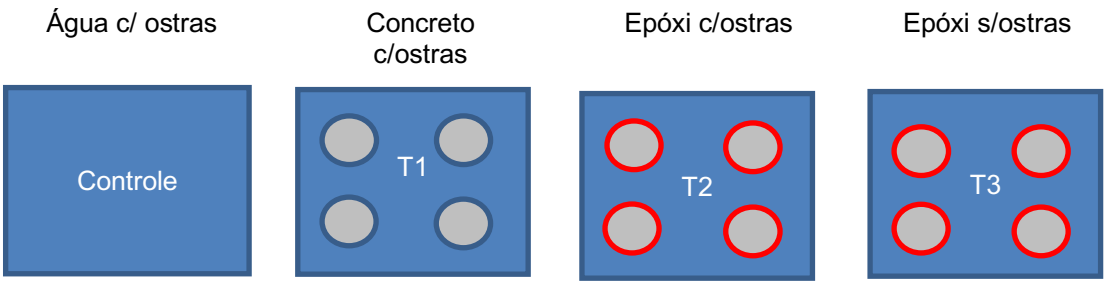

Figura 3. Desenho experimental do ensaio do teste para a toxicidade da tinta nas ostras.

De acordo com a Figura 3, foi utilizado um aquário com controle de água somente com ostras, para a obtenção do comparativo das condições ideais com as opções modificadas pela presença do graute + tinta. Desta forma no aquário T1 foram expostas ostras às quatro estacas sem pintura, a fim de verificar os efeitos que o graute pode causar aos organismos. No aquário T2 foram expostas ostras às estacas com pintura epóxi. E por fim, no aquário T3, foram colocadas as estacas com pintura epóxi sem ostras, para fins de análises químicas na água adjacente às estacas. As variáveis físico-químicas foram medidas diariamente, totalizando um ensaio de 48 horas para as ostras e de 48 horas para água.

Figura 4. Aquário T2, estacas pintadas para exposição de 30 ostras no Controle e tempo T0.

3.3 Caracterização química da tinta, dos meios de exposição e bioacumulação

Para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb, Ni, Sn e Zn foram utilizadas as técnicas de i) espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), empregando um espectrômetro modelo ELAN DRC II (*Perkin* Elmer-SCIEX, EUA) equipado com um nebulizador concêntrico (*Meinhard*, EUA), câmera de nebulização ciclônica (*Glass Expansion*, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro; e ii) espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), empregando um espectrômetro simultâneo *SpectroCiros* CCD (*Spectro Analytical Instruments*, Alemanha) equipado com sistema de nebulização pneumático, nebulizador tipo *cross-flow*, câmera de nebulização de duplo passo e tocha com injetor de quartzo com 2,5 mm de diâmetro interno. As condições operacionais utilizadas, bem como as razões massa carga (m/z) para ICP-MS e comprimentos de onda para ICP OES, estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros operacionais para a determinação dos analitos por ICP-MS e ICP OES.

Parâmetro	ICP OES	ICP-MS
Potência do gerador de RF (W)	1400	1300
Vazão de Ar: principal (L min^{-1})	12	15
auxiliar (L min^{-1})	1,0	1,2
nebulização (L min^{-1})	1,00	1,11
Cone de amostragem e *skimmer*	-	Pt
Vista de observação	axial	-
Elementos monitorados	As (189,042), Cu (327,396), Cr (267,716), Fe (238,204), Mg (279,553), Mn (257,611), Ni (231,604), Sn (189,991), Zn (206,191)	^{75}As, ^{114}Cd, ^{52}Cr, ^{53}Cr, ^{63}Cu, ^{65}Cu, ^{202}Hg, ^{60}Ni, ^{62}Ni, ^{208}Pb, ^{120}Sn

Para a determinação de Ni por ICP-MS nas amostras de tecido de ostra foi considerado o isótopo 62Ni, uma vez que o isótopo 60Ni é suscetível a interferência isobárica do íon poliatômico. Para a determinação de Ni por ICP-MS nas amostras de tinta foi considerado o isótopo 60Ni, uma vez que o isótopo 62Ni é suscetível a interferência isobárica do íon poliatômico TiO.

Adicionalmente, as amostras da tinta *Weber* foram também caracterizadas quanto a presença de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Para isso, foi empregada extração utilizando solventes com diferentes polaridades, após a obtenção dos extratos, os mesmos foram purificados em colunas cromatográficas recheadas com adsorventes. Os extratos purificados foram então injetados em sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas para identificação e quantificação dos hidrocarbonetos de interesse. As referidas técnicas foram também empregadas para identificação e quantificação de elementos e hidrocarbonetos em amostras de água e de ostras retiradas diariamente dos meios experimentais durante o período de exposição. Essa abordagem permitiu estimar as concentrações de exposição assim como fatores de bioacumulação.

3.4 Preparação das amostras

Após o tempo de exposição, os tecidos das brânquias e glândulas digestivas foram dissecados e conservados em -80°C até posterior homogeneização em solução tampão (*buffer*) preparada um dia antes do uso utilizando TRIS (50 mM), EDTA (1 mM), DTT (1mM), sacarose (50 mM), KCl (150 mM) diluído em 250 ml de água Milli-Q. No dia de uso, o pH foi ajustado para

7,6. Preparou-se uma solução de PMSF (100 mM) diluído em 1 ml de etanol.

Cada alíquota de tecido foi pesada para a adição de solução tampão (1:3). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados. Danos em DNA (*strand breaks*), LPO peroxidação lipídica e a quantidade de proteínas totais foram determinados nas amostras de homogeneizado. Todas as respostas bioquímicas foram normalizadas pela concentração de proteína total referente a cada extrato e tecido utilizado.

3.5 Proteínas totais

O teor total de proteína (mg·ml-1) foi determinado de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando soro de bovino para a curva de calibração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em uma absorbância de 595 nm.

3.6 Peroxidação lipídica (LPO)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada mediante o método do ácido tiobarbitúrico (WILLS, 1987). Esta determinação se fez através da fluorescência empregando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os brancos e os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em μM TBARs/mg proteínas.

3.7 Estabilidade da membrana lisossômica

O procedimento utilizado para análise do NRRT Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro em lisossomos de hemócitos foi realizado de acordo com o método descrito por Lowe *et al*. (LOWE; FOSSATO; DEPLEDGE, 1995). Com uma seringa hipodérmica de 1 mL com uma agulha padrão 21 e contendo 0,5 mL de solução fisiológica foram coletados 0,5 mL de hemolinfa do músculo adutor posterior. Cerca de 40 μL desta solução de células (hemolinfa + solução fisiológica) foram expostos ao corante Vermelho Neutro e, sistematicamente, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (aumento 400x) a cada 15 minutos. O tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos foi obtido pela estimativa da proporção de células exibindo “extravasamento” dos

lisossomos para o citosol e/ou exibindo anormalidades no tamanho e cor dos lisossomos. O "*end-point*" foi determinado quando 50% ou mais das células exibirem anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol. O tempo de retenção médio para cada concentração foi calculado pela média do tempo em minutos dos animais analisados em cada concentração.

3.8 Danos em DNA (*strand breaks*)

Danos no DNA serão avaliados por meio alcalino através do ensaio de precipitação (OLIVE, 1988) baseado em precipitação por K-SDS, seguido por detecção de cadeias de DNA (GAGNÉ *et al.,* 1995). DNA de esperma de salmão será utilizado como padrão para a curva de calibração. As leituras de fluorescência a 360 nm e 460 nm serão determinadas. Resultados serão expressos em μg DNA.mg^{-1} proteína total.

3.9 Análise estatística

Para realizar a análise estatística foi usado o *software* R®. Foi testada a homogeneidade dos dados, a normalidade e a dispersão dos resíduos. Foi feito a análise de variância (ANOVA) de uma via entre as médias dos biomarcadores em diferentes tratamentos. Para identificar diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, foi empregado o teste posteriori de Dunnett. O nível de significância foi $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4. 1. Metais

Foram detectados na matriz da tinta, os metais traços As, Cd, Cr, Cu, Hg, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sn, Zn. Entre estes, as concentrações mais elevadas foram observadas para Cromo (0,614 ± 0,044 μg.g), Ferro (219 ± 7 μg.g), Magnésio (2655 ± 85 μg.g), Chumbo (0,534 ± 0,010 μg.g) e Zinco (1652 ± 26 μg.g). Já o Mercúrio (Hg), foi detectado, porém não foi quantificado, devido não haver alteração nos valores de T0 = T48 = T96 = de água <5,0 e tecido <0,12 conforme (Tabela 4).

Tabela 4. Elementos traço - Metais.

Elementos	AMOSTRA	ÁGUA ($\mu g.L^{-1}$)			TECIDO OSTRA ($\mu g.g^{-1}$)	
	Tinta WEBER(µg)	T0	T6	T48	T0	T48
As	1,97 ± 0,13	< 933	< 933	< 933	5,47 ± 0,09	4,67 ± 0,06
Cd	1,99 ± 0,10	< 0,7	< 0,7	< 0,7	0,737 ± 0,028	0,545 ± 0,009
Cr	29,6 ± 8,8	< 13	< 13	< 13	0,959 ± 0,057	0,733 ± 0,131
Cu	18,7 ± 0,5	< 5,6	< 5,6	<5,6	10,18 ± 0,41	6,89 ± 0,12
Hg	< 0,3	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 0,12	< 0,12
Fe	326 ± 70	< 132	< 132	< 132	300 ± 3	231 ± 7
Mg	123 ± 14	923496 ± 12671	1004648 ± 49073	974224 ± 14643	2367 ± 36	2774 ± 107
Mn	20,9 ± 6,8	< 65	< 65	< 65	21,3 ± 0,4	13,2 ± 0,9
Ni	2,67 ± 0,91	< 19,1	< 19,1	< 19,1	0,750 ± 0,072	0,363 ± 0,058
Pb	25,1 ± 2,9	< 2,0	< 2,0	< 2,0	0,451 ± 0,005	0,432 ± 0,020
Sn	2,73 ± 0,10	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,06	< 0,06
Zn	71,1 ± 1,2	< 157	< 157	< 157	1651 ± 24	1010 ± 32

4.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

As concentrações de HPAs encontradas na água são ambientalmente relevantes, mesmo considerando os somatórios em T0 = ambiente natural, T6= houve degradação do HPA e no T48= ligeiro aumento das concentrações (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação dos HPAs. DN= Dados não disponíveis, ND= Não Detectado e LQ= Limite de Quantificação resultando na somatória dos HPAs disponíveis nos tecidos e na água.

COMPOSTOS	TECIDO OSTRA (ng g-1)			TECIDO OSTRA WEBER(ng g-1)		ÁGUA WEBER(ng L-1)			
	T0	T48		T0	T48	T0	T6	T48	TINTA WEBER
		CONTROLE	ESTACA	CONTROLE	ESTACA				
Naftaleno	<LQ	4,5	7,3	<LQ	<LQ	93	50	73	0,15
2-Metil Naftaleno	<LQ	<LQ	1,4	<LQ	ND	33	55	44	ND
Acenaftileno	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND
Acenafteno	4,9	19,4	14,2	4,9	1,7	ND	ND	24	ND
Fluoreno	25,8	111,4	92,6	25,8	32,6	19	13	39	ND
Fenantreno	23,3	104,2	74,2	23,3	87,9	38	49	115	ND
Antraceno	7,7	22,8	14,8	7,7	26,9	7	11	21	ND
Fluoranteno	2,3	8,2	1,2	2,3	5	7	7	12	ND
Pireno	3,2	9,1	8,2	3,2	8,9	9	9	9	ND
Benzo[a]antraceno	1,1	1,3	1,8	1,1	ND	ND	ND	ND	ND
Criseno	1,8	1,8	2,4	1,8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	ND
Benzo[b]fluoranteno	<LQ	1,4	<LQ	<LQ	1,2	ND	ND	ND	ND
Benzo[k]fluoranteno	2	2,2	1,6	2	1	ND	ND	ND	ND
Benzo[a]pireno	ND	ND	ND	ND	1,4	ND	ND	ND	ND
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	ND	1,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	7	ND
Benzo[ghi]perileno	1,2	ND	<LQ	1,2	ND	ND	ND	ND	ND
Somatório HPAs	**73,3**	**286,4**	**221,6**	**73,3**	**166,6**	**211**	**195**	**345**	**0,2**

4.3 Biometria das ostras

Os parâmetros biométricos dos diferentes tratamentos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Média e desvio padrão de dados biométricos nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	BIOMETRIA		
	COMPR. (mm)	LARGURA (mm)	PESO(g)
Controle Água	80,43 ± 9,73	48,57 ± 6,13	8,00 ± 1,76
T1 - estaca	77,57 ± 6,19	47,57 ± 4,31	6,37 ± 1,40
T2 - Weber	74,71 ± 9,43	49,57 ± 6,08	7,56 ± 2,99

4.4 Peroxidação Lipídica – (LPO)

A Figura 5 demonstra que não houve uma diferença significativa entre as brânquias do Controle x Controle estaca x Tinta *Weber*. Já nas Glândulas digestivas (Fig. 6), houve diferença apenas entre o Controle de água com o Controle estaca, porém sem indicação de LPO para o grupo exposto à tinta *Weber*.

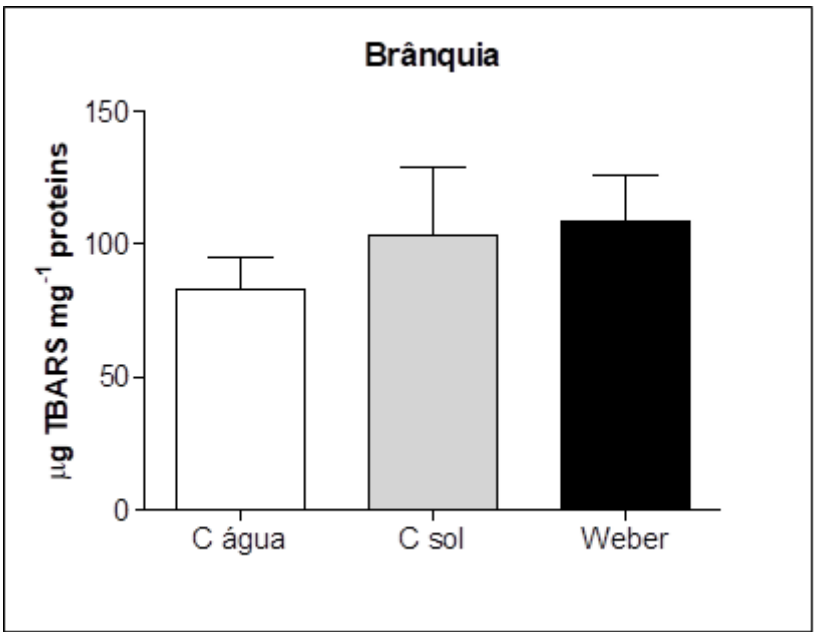

Figura 5. Peroxidação lipídica (LPO) em brânquias

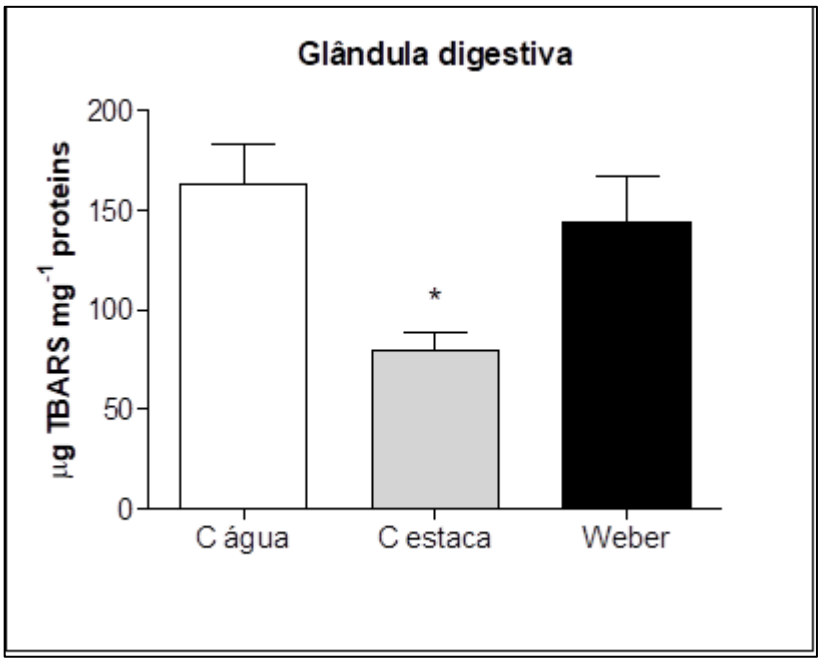

Figura 6. Peroxidação lipídica (LPO) em glândulas digestivas. * = diferença significativa em relação ao Controle água (p<0,05).

4.5 Estabilidade da Membrana do Lisossomo (LMS)

Os resultados obtidos no ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro demonstram que os organismos do Controle Água e do Controle Estacas, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), e ambos demonstraram retenção do corante acima dos 60 minutos. Já os organismos expostos à tinta *Weber* apresentaram tempo de retenção do corante significativamente menor ($p < 0,05$ – ANOVA – Dunnetts). Desta forma, fica evidente a influência da tinta *Weber* sobre a estabilidade da membrana lisossomal de hemócitos, indicando estresse fisiológico. Os resultados estão apresentados na Figura 7.

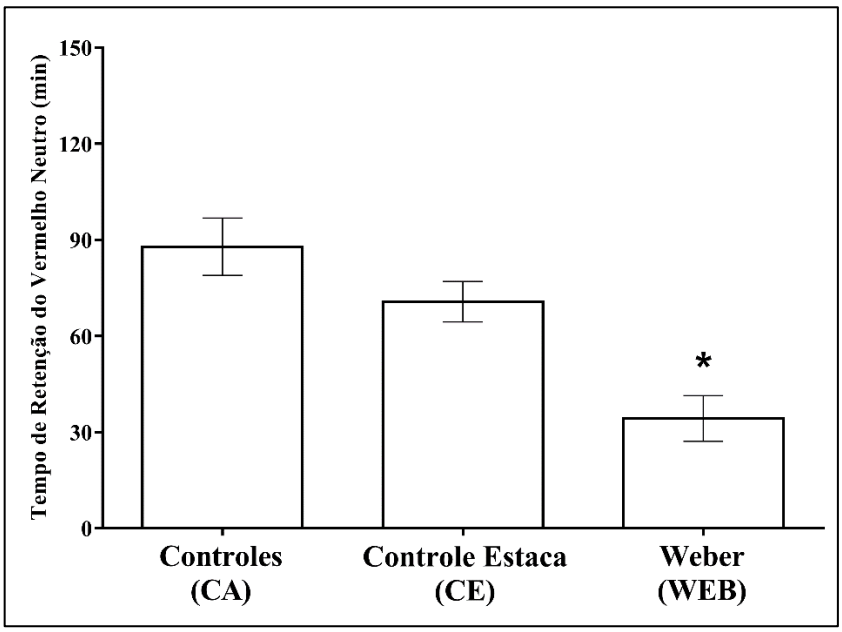

Figura 7. Tempo médio e desvio-padrão de retenção do corante vermelho neutro. * = diferença significativa em relação ao Controle (p<0,05).

4.6 Danos em DNA

Foi evidenciado genotoxicidade nas brânquias dos organismos expostos a estacas com Tinta *Weber*, conforme figura 8.

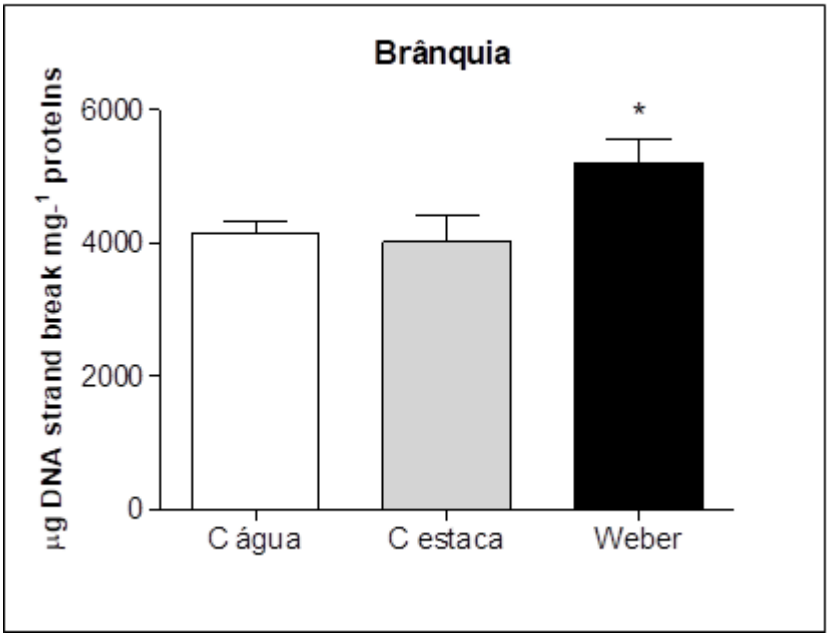

Figura 8. Danos em DNA (*strand break*) em brânquias. * = diferença significativa em relação ao Controle água (p<0,05).

Nas glândulas digestivas, apesar do aumento nos organismos expostos à tinta *Weber*, não houve diferença significativa (Fig. 9).

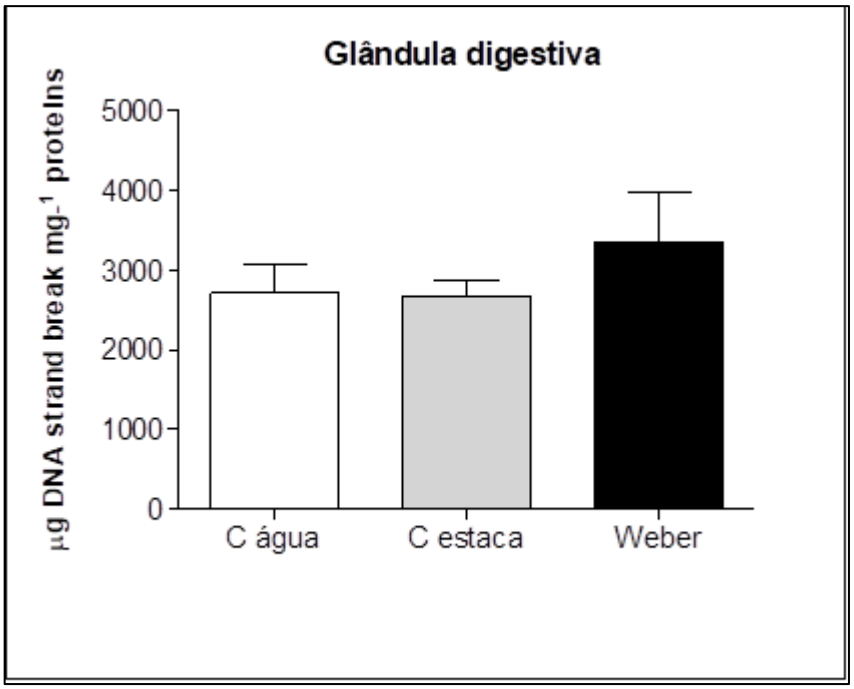

Figura 9. Danos em DNA (*strand break*) em glândulas digestivas.

5. DISCUSSÃO

Segundo Almeida, Diamantino e Sousa (2007) na composição das tintas atualmente utilizadas, inclui-se obrigatoriamente um primário anticorrosivo e um acabamento anti-vegetativo, desta forma são aplicados metais traços, pois tais elementos são comuns na fabricação das tintas antiincrustantes. A liberação de compostos organoestânicos contidas nas tintas antiincrustantes, podem inibir o crescimento das ostras danificando a qualidade de sua concha (AIZIEU, 1986).

No presente estudo, Arsênio (As), Cadmio (Cd) e Estanho (Sn) tiveram concentrações abaixo do limite de quantificação dos métodos empregados, apenas o Magnésio (Mg) foi quantificado por ser um constituinte maior na água do mar conforme (Tabela 6).

As concentrações de metais nas ostras expostas à tinta *Weber* são similares às observadas por Machado *et al*. (2002) no ambiente estuarino de Cananéia, onde ostras da espécie *C. brasiliana*, também expostas aos metais traços Pb, Cd, Hg, Cu e Zn por um período de longa duração, apresentaram concentrações abaixo dos limites preconizados pela legislação brasileira (Portaria Nº685/1998).

Desta forma, as concentrações de elementos traço encontrados nos tecidos das ostras no presente trabalho, foram considerados naturais de acordo com a literatura e não apresentaram aumento após exposição de 48 horas a estacas tratadas com a tinta *Weber*.

Quanto aos HPAs, foram observadas variações significativas nas concentrações medidas em água, do meio de exposição para o Fluoreno, Fenantreno, Antraceno e Fluoranteno. Esses compostos são conhecidos por causar danos biológicos a organismos aquáticos como demostrados nos estudos feitos por (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016).

Comparando os resultados dos tecidos expostos ao Fluoreno, fica evidente a diferença entre T48 Controle e T48 *Weber*, demonstrando assim que o Fluoreno foi o mais persistente em comparação aos demais HPAs.

O Fluoreno também foi encontrado nos estudos feitos por (TORRES *et al*., 2012; 2015), onde ostras *Crassostrea rhizophorae* nativas e transplantadas foram afetadas no sistema estuarino de Santos.

Outro HPA aumentado após exposição à tinta *Weber* foi o Antraceno. A

exposição *in vitro* a Antraceno em ostras *Crassostrea gigas* foi associada a um aumento na presença de lisossomos, após o período de 24 horas (BADO-NILLES *et al*., 2008).

O Fluoranteno é conhecido sendo um dos mais abundantes poluentes ao meio ambiente (Sepic *et al*., 1998). No estudo realizado por Sepic *et al*. (2003) foram verificados os efeitos sobre algas *Scenedesmus subspicatus*, bactérias *Pseudomonas putida* e crustáceos Daphnia magna e *Thamnocephalus platyurus* através dos ensaios de inibição de crescimento e de imobilidade, onde ficou evidente que não houve toxicidade a *T. platyurus*, mas sim para *D. magna*.

Dentre os efeitos subletais, o estresse oxidativo é um componente importante da resposta ao estresse em organismos marinhos, expostos a uma variedade de poluentes encontrados nas condições ambientais, podendo danificar assim lipídios, proteínas e DNA (LESSER, 2006).

Segundo Bonnes-Taourel; Guérin e Torreilles (1992) e Gutteridge (1995) quando o sistema antioxidante está sobrecarregado, o principal dano demonstrado é a peroxidação lipídica (LPO) devido à oxidação de ácidos graxos, produzindo malondialdeído (MDA) e causando danos nas membranas celulares.

Agentes antiincrustantes podem levar a aumentos significativos no conteúdo espécies reativas de oxigênio e subsequentemente induzir a peroxidação lipídica do tecido branquial de ostras *Crassostrea gigas* (PARK *et al*., 2016). No entanto, no presente estudo, não foi observado aumento significativo nos níveis de Peroxidação lipídica, fato também verificado por Lima *et al*. (2018) quando níveis de peroxidação lipídica (LPO) permaneceram inalterados em ostras da espécie *C. brasiliana* expostas ao Fenantreno por um período 24 horas. Apesar dos HPAs e elementos traços encontrados na Tinta *Weber*, capazes de desencadear estresse oxidativo, devido sua composição conforme Tabelas 4 e 5, não foi observado aumento significativo em aldeídos como substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), empregados no presente estudo como indicadores de peroxidação lipídica (LPO).

Quanto aos efeitos sobre a estabilidade da membrana lisossômica, os bivalves marinhos adotados neste estudo como controles (água e estaca) demonstraram resultados satisfatórios aos padrões do ensaio (NRRT), com tempos de retenção em acima de 60 minutos, de acordo com os resultados reportados por Ortega *et al*. (2019) para mexilhões *Perna perna*. Corroborando

com tais indicações deste estudo, Martínez-Gómez; Bignell e Lowe (2015) adotaram classificações e diretrizes para facilitar o monitoramento das medidas de efeitos biológicos a estabilidade da membrana lisossômica em mexilhões.

As ostras expostas a estacas tratadas com tinta *Weber* apresentaram redução significativa do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro, indicando perda da estabilidade da membrana lisossômica. Ainda de acordo com Ortega *et al*. (2019), tempos abaixo de 30 minutos significam organismos em estresse severo. Da mesma forma Dailianis *et al*. (2003) concluíram que os danos causados na membrana lisossômica pelo impacto de xenobióticos em organismos aquáticos, pode diminuir o tempo de retenção do corante vermelho neutro, induzindo ao vazamento de componentes lisossômicos, impedindo células saudáveis de absorverem o corante, levando a autofagia e redução do crescimento. Nesse sentido, a estabilidade da membrana lisossômica pode ser considerada um indicador da saúde geral dos organismos estudados, e seu comprometimento configura um estado pré-patológico. Também foi avaliado por Pereira *et al*. (2014), que esta resposta de bivalves tem grande correlação com níveis maiores de organização biológica, como população e comunidade, denotando a relevância ecológica deste biomarcador.

Tal resposta pode ser associada a contaminantes inorgânicos e orgânicos, como demonstrado no estudo realizado com ostras submetidas a elementos traços. Slabber *et al*. (2013) determinaram que os tecidos dos organismos, quando submetidos ao ensaio (NRRT), revelaram uma desestabilização da membrana lisossômica e que os animais demonstraram considerável nível de estresse após exposição a metais. Pereira et al. (2007) demonstraram o mesmo padrão de efeitos em bivalves oriundos de um píer de atracação do terminal petrolífero Almirante Barroso (TEBAR) expostos a contaminantes orgânicos, especialmente HPAs.

Ostras *Saccostrea cucullata* expostas a poluentes marinhos como HPAs, demonstraram variações nas atividades de enzimas antioxidantes, onde o aumento das concentrações de hidrocarbonetos nos tecidos, causaram também danos ao DNA (SARKAR *et al*., 2017)

No presente estudo foi observada a possível influência de HPAs nos danos de DNA das ostras expostas a tinta *Weber*, como por exemplo o Fenantreno em destaque, por suas elevadas variações nos resultados dos

tecidos das ostras *C. brasiliana* T0 = 23,3 $ng.g^{-1}$ para o T48 = 87,9 $ng.g^{-1}$ e na água do T0 = 38 $ng.L^{-1}$ para o T48 = 115$ng.L^{-1}$, onde em correlação com estudos apresentados, foi notado a influência do Fenatreno aos organismos aquáticos analisados, tendo em vista que as ostras vivem em áreas sujeitas a variações de marés, onde as condições mudam constantemente, portanto é essencial para o organismo, se adaptar aos xenobióticos, criando macanismos de defesa contra os estressores ambientais, dentre eles os elementos traços e HPAs listados neste estudo. Corroborando com tais resultados Zacchi *et al*. (2017) também concluiu que as ostras *C. brasiliana* expostas a diferentes níveis de salinidade e a 100 $\mu g.L^{-1}$ de Fenantreno pelos períodos de 24 e 96 horas não foram afetadas pela exposição, demonstrando também a capacidade de adaptação dos organismos.

Segundo Bhagat; Sarkar e Ingole, (2016) o Fenantreno empregado em concentrações 10, 25, 50 e 100 (µg / L) produziu sensibilidade em respostas a peroxidação lipídica (LPO), danos em (DNA) e ao estresse oxidativo, pois as respostas demonstraram a genotoxicidade para gastrópodes. Já, Lüchmann *et al*. (2015) analisou as brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. brasiliana* e *C. gigas* também expostas ao Fenantreno, através do sequenciamento DNA, a fim de rastrear a biotransformação de xenobióticos.

Lüchmann *et al*. (2011) concluíram que brânquias são um tecido alvo para identificar efeitos de curto prazo, entre 24 e 96 horas, enquanto as glândulas digestivas, podem ser de maior valor para determinar a resposta ao estresse da ostra sob exposição crônica a este composto. De acordo com Guerreiro *et al*. (2020), bivalves expostos a materiais utilizados nas formulações de tintas antiincrustantes pelo período de 24 e 96 horas mostraram que as brânquias são a primeira linha de defesa, enquanto as glândulas digestivas apresentaram níveis mais baixos de defesas antioxidantes, sendo o órgão mais afetado.

O naftaleno que foi identificado na tinta, porém não observado na água ou organismos provavelmente devido à sua volatilidade, pode também ser responsável pelos danos a membranas, conforme descrito por Mendonza Lopez (2014) para ostras *Crassostrea cortezienses* expostas de 24 a 72 h que apresentaram redução da estabilidade da membrana lisossomal, porém sem indícios de estresse oxidativo. Tal mecanimos de ação pode estar relacionado às bombas de prótons responsáveis pelo transporte de membrana e

consequentemente sua permeabilidade.

Tais resultados apontam para a necessidade do desenvolvimento de tintas com substânica menos tóxicas, conforme amplo estudo realizado por Yebra; Kiil e Dam-Johansen (2004) que defende a implantação de tintas antiincrustantes tendo como base os produtos não tóxicos, demonstrando assim alternativas para o desenvolvimento de sistemas à base de biocidas naturais e de soluções menos impactantes ao ambiente marinho.

6. CONCLUSÕES

Ostras *Crassostrea brasiliana*, adotadas nos ensaios de curta duração em exposição à tinta impermeabilizante *Weber Guard* SF P235, provaram ser excelentes indicadores, por serem bivalves filtradores nativos de regiões portuárias, expostas a tintas antiincrustantes navais e de estruturas de concreto, de fácil cultivo e uso em laboratório para obtenção de diferentes respostas biológicas.

Após exposição de curto prazo, observou-se bioacumulação de HPAs tóxicos como Fluoreno, Fenantreno, Antraceno e Fluoranteno. Tais compostos, em conjunto com o naftaleno encontrado na tinta *Weber,* podem ser responsáveis pelos efeitos citogenotóxicos observados no presente estudo.

Por se tratar de uma tinta desenvolvida com características específicas para o uso em estruturas de concreto submersas em ambientes costeiros como manguezais, praias e costões rochosos, recomenda-se a elaboração de avaliações de risco ambiental empregando organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos, bem como estudos de bioacumulação a médio e longo prazo de exposição.

TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Journal of Hazardous Materials

Effects of substances released from a coal tar-based coating used to protect harbor structures on Oysters

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	biomarkers; polycyclic aromatic hydrocarbons; trace elements; paint
Corresponding Author:	Italo B Castro, Ph.D. Universidade Federal de São Paulo Santos, BRAZIL
First Author:	Ana Cristine Chiovatto
Order of Authors:	Ana Cristine Chiovatto
	André Vinícius Godoi
	Eliete Zanardi-Lamardo
	Fabio Andrei Duarte
	Tomas Angel Del Valls Casillas
	Camilo Dias Seabra Pereira
	Italo B Castro, Ph.D.
Abstract:	Paints have been historically used to minimize chemical and biological deterioration on harbor structures. Products coal tar-based are largely used as protective coatings of static concrete structures including piers and moorings. The present study assessed chemical composition, leaching, bioaccumulation rates and toxicity of the paint Lackpoxi N1761. A laboratory experiment exposing oysters (Crassostrea brasiliana) to miniaturized concrete pillars over time was performed. Trace elements and 17 PAHs were determined in paint, seawater exposure media, and in oyster tissues. High concentrations of trace elements and PAH were detected in the paint. Sharp increases in PAH concentrations were observed after 6 - 96 hours in exposure media and oyster tissues. These results indicated that analyzed substances are leached from the painted structures and could cause environmental contamination. In addition, the organisms exposed showed a significant reduction in the integrity of the hemocytes lysosomal membranes. Considering that this response is universally accepted as a biomarker of the general health status of aquatic organisms, the use of Lackpoxi N1761 may cause environmental impacts. Therefore, it is recommended that coal tar-based paints be evaluated through environmental risk assessment protocols before use in coastal areas.
Suggested Reviewers:	Gregorio Bigatti, phd full professor, CONICET CENPAT gbigatti@gmail.com
	Conrad Sparks, phd full professor, Cape Peninsula University of Technology SparksC@cput.ac.za
	Denis Abessa, phd full professor, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho denis.abessa@unesp.br
	Carlos Barroso, phd full professor, Universidade de Aveiro cmiguez@ua.pt
	Erik Ytreberg, phd full professor, Chalmers tekniska hogskola erik.ytreberg@chalmers.se

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFY,H.I.; MANSOUR, M.S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107-123, 2016.

ABESSA, D. M. S.; ECPM Sousa. Avaliação da qualidade de sedimentos Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 2002. 290 p.

ABNT NBR 14725-2:2009**. Produtos químicos**– Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente – Parte 2: Sistema de classificação de perigo, pág. 61 a 72. Disponível em: (https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=62390). Acesso em: 10 novembro 2019.

ABNT NBR 5738. Projeto Concreto - Procedimento para moldagem e cura de corpos-de-prova,2002.
(https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=357452). Acesso em: 10 novembro 2019.

ABNT NBR 7215 - 1996, Cimento Portland – Determinação de Resistência à Compressão.(https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=4534). Acesso em: 10 novembro 2019.

ADAMS, S. M. et al. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress**. IN: Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers**, Chelsea, Michigan. 1990. p 333-353, 6 fig, 2 tab, 52 ref. DOE Contract DE-AC 05-84 OR 21400., 1990.

ALZIEU Cl., Sanjuan, J., DELTRIEL, J.P. e Borel, M. Tin contamination in Arcachon Bay effects on oyster shell anomalies**, Marine Pollution Bulletin** 17, pp 494-498, 1986.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: the particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, n. 1, p. 2–20, 2007.

BADO-NILLES, A. et al. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg). **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1610-1617, 2008.

BHAGAT, J; SARKAR, A.; INGOLE, B. S. DNA damage and oxidative stress in marine gastropod Morula granulata exposed to phenanthrene. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 4, p. 114, 2016.

BONNES-TAOUREL, D; GUÉRIN, M.C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation. **Biochemical pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BRADFORD, M. B. A rapid and sensitive method for the quantification of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Ana. Biochem**., v. 72, p. 248-254,1976.

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

CASTRO, Í. B.; PERINA, F. C.; FILLMANN, G. Organotin contamination in South American coastal areas. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 3, p. 1781–1799, 2012.

COLE, W. A crystalline hydrated magnesium silicate formed in the breakdown of a concrete sea-wall. **Nature**, v. 171, n. 4347, p. 354, 1953.

DAILIANIS, S. et al. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of Mytilus galloprovincialis (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 56, n. 4, p. 443-470, 2003.

DE LIMA, Maryangela G.; MORELLI, Fabiano. Caracterização da agressividade do ambiente marinho às estruturas de concreto. 2004.

DEPLEDGE, M. H.; BILLINGHURST, Z. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 32-38, 1999.

GAGNÉ, F. et al. Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. **Toxicology letters**, v. 78, n. 3, p. 175–182, 1995.

GALANTE-OLIVEIRA, S. et al. Hydrobia ulvae imposex levels at Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1998 and 2007: a counter-current bioindicator? **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, p. 500–507, 2010.

GUERREIRO, Amanda S. et al. Effects of chlorothalonil on the antioxidant defense system of mussels Perna perna. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 110119, 2020.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HEMPEL. Ficha de Dados de Segurança HEMPADUR MASTIC 45889, 2014.

IMO, L. Status of multilateral conventions and instruments in respect of which the **International Maritime Organization** or its Secretary-General performs depositary or other functions as at 31 December 2016.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. S77–S85, 2009.

LESSER, M.P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol**., v. 68, p. 253-278, 2006.

LIMA, D. et al. Molecular and cellular effects of temperature in oysters Crassostrea brasiliana exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, p. 307-318, 2018.

LOWE, D. M.; FOSSATO, V. U.; DEPLEDGE, M. H. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels Mytilus galloprovincialis from the Venice Lagoon: an in vitro study. **Marine Ecology Progress Series**, v. 129, p. 189–196, 1995.

LÜCHMANN, Karim H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster Crassostrea brasiliana following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 652-660, 2011.

LÜCHMANN, Karim H. et al. 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, 2015.

MACHADO, Ingrid C. et al. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu, e Zn na ostra de mangue Crassostrea brasiliana do estuário de Cananéia-SP, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 13-18, 2002.

Manual do equipamento utilizado para caracterização química da tinta https://www.esc.cam.ac.uk/resources/facilities/equipment-and-instruments/drciib.pdf. Acesso em: 10 novembro 2019.

MARANHO, L. et al. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete Hediste diversicolor as bioindicator species. **Environmental research**, v. 134, p. 353–365, 2014.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, Concepción; BIGNELL, J.; LOWE, D. Lysosomal membrane stability in mussels. 2015.

MENDONZA LOPEZ, D.G. Evaluacion del estres oxidativo en ostion (*Crassostrea corteziensis*) expuestos a naftaleno. Dissertação de Mestrado. Universidad Autónoma de Nayarit. México. 2014.

OLIVE, P. L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 11: 487–495, 1988.

ORTEGA, Andressa dos Santos Barbosa et al. Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel Perna perna. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 27, p. 27569-27578,

2019.

PARK, Mi Seon et al. Effects of antifouling biocides on molecular and biochemical defense system in the gill of the pacific oyster Crassostrea gigas. **PloS one**, v. 11, n. 12, 2016.

PEREIRA, Camilo Dias Seabra et al. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. Environ. Toxicol. Chem., 26, pp. 462-469. 2007

PEREIRA, Camilo D. Seabra et al. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: a multi-level approach. **Marine environmental research**, v. 96, p. 118-126, 2014.

PUSCEDDU, F. et al. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 274–283, 2018.

SARKAR,A.et al. Evaluation of the impact of bioaccumulation of PAH from the marine environment on DNA integrity and oxidative stress in marine rock oyster (Saccostrea cucullata) along the Arabian sea coast. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 8, p. 1105-1116, 2017.

ŠEPIČ, E.; BRICELJ, Mihael; LESKOVŠEK, Hermina. Degradation of fluoranthene by Pasteurella sp. IFA and Mycobacterium sp. PYR-1: isolation and identification of metabolites. **Journal of applied microbiology**, v. 85, n. 4, p. 746-754, 1998.

ŠEPIČ, Ester; BRICELJ, Mihael; LESKOVŠEK, Hermina. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1125-1133, 2003.

SLABBER, Michelle Yvonne et al**. Accumulation and toxicity of metals in oysters (Striostrea margaritacea) from the South African South Coast**. 2013. Tese de Doutorado. Cape Peninsula University of Technology.

THOMAS, K.; BROOKS, S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling**, v. 26, n. 1, p. 73–88, 2010.

TORRES, R.J. et al. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and mercury in oysters (Crassostrea rhizophorae) from two Brazilian estuarine zones. **International Journal of Oceanography**, v. 2012, 2012.

WILLS, E. D. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (eds.), **Biochemical toxicology: A Practical Approach**. IRL Press, Washington, USA, pp.127-150, 1987.

YEBRA, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in organic coatings**, v. 50, n. 2, p. 75–104, 2004.

YOUNG, J. A.; EVANS, R. A. Conversion of Medusahead to Downy Brome Communities with Diuron. **Journal of Range Management**, v. 25, p. 40-, 1972.

ZACCHI, Flavia Lucena et al. Transcriptional changes in oysters Crassostrea brasiliana exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 94-103, 2017

APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados biométricos

T 0			
BIOACUMULAÇÃO		DATA:11/12/2018	
ORGANISMOS	BIOMETRIA		
	COMPR. (MM)	LARGURA (MM)	PESO(G)
1	71	42	6,81
2	77	43	7,66
3	72	45	8,81
4	84	59	15,83
5	70	58	6,6
6	86	55	7,92
7	64	53	5,47
8	76	56	9,26
9	73	47	6,87
10	63	58	5,65
MÉDIA	73,6	51,6	8,09
DESVIO PADRÃO	7,50	6,67	2,98

Tabela 4. - Biometria das ostras no tratamento controle no tempo T48 A.

BIOACUMULAÇÃO	T48	DATA:12/12/2018	
ORGANISMOS	BIOMETRIA		
	COMPR. (MM)	LARGURA (MM)	PESO(G)
1	80	48	6,64
2	72	54	11,6
3	80	55	8,47
4	75	42	6,77
5	100	41	8,43
6	84	45	7,3
7	72	55	6,8
MÉDIA	80,43	48,57	8,00
DESVIO PADRÃO	9,73	6,13	1,76

Tabela 5. – Biometria das ostras no tratamento estaca no tempo T48 A.

BIOACUMULAÇÃO T48 DATA:12/12/2018			
ORGANISMOS	BIOMETRIA		
	COMPR. (MM)	LARGURA (MM)	PESO(G)
1	80	44	4,43
2	72	42	8,05
3	71	50	6,25
4	82	48	8,24
5	88	53	6,41
6	73	52	6,16
7	77	44	5,07
MÉDIA	77,57	47,57	6,37
DESVIO PADRÃO	6,19	4,31	1,40

Tabela 6 Biometria das ostras no tratamento Weber no tempo T48 A.

BIOACUMULAÇÃO T48 DATA:12/12/2018			
ORGANISMOS	BIOMETRIA		
	COMPRIM. (MM)	LARGURA (MM)	PESO(G)
1	67	45	5,02
2	63	53	7,76
3	77	44	6,07
4	71	60	13,19
5	92	52	8,64
6	74	50	8,11
7	79	43	4,12
MÉDIA	74,71	49,57	7,56
DESVIO PADRÃO	9,43	6,08	2,99

APÊNDICE B - Ensaio do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro

Tabela 10. - Vermelho Neutro Controle T0.

T 0									
VERMELHO NEUTRO			Data:10/12/2018						
BIOMETRIA			TEMPO						
ORGANISMOS	COMPRIM. (MM)	LARGURA (MM)	15	30	45	60	75	90	T
1	69	56	+	±	-	0	0	0	30
2	75	55	±	±	±	±	-	0	60
3	78	56	±	±	±	±	±	-	75
4	94	50	±	±	-	-	-	0	30
5	85	61	+	±	±	±	±	-	75
6	82	50	±	-	-	0	0	0	15
7	59	66	±	±	±	±	±	±	90
8	83	40	±	-	0	0	0	0	15
9	81	50	±	±	±	±	±	±	90
10	81	54	±	±	±	±	±	-	75
555 TEMPO MÉDIO									55,5
DESVIO PADRÃO									22,86

Tabela 11. – Vermelho Neutro Controle Água T48.

T 48									
VERMELHO NEUTRO - ÁGUA						12/12/2018			
ORGANISMOS	TEMPO								
	15	30	45	60	75	90	105	120	T
1	±	±	±	±	±	±	±	±	120
2	±	±	±	±	±	-	0	0	75
3	±	±	±	±	±	-	0	0	75
4	±	±	±	±	-	0	0	0	60
5	±	±	±	±	±	-	0	0	75
6	±	±	±	±	±	±	±	±	120
7	±	±	±	±	±	±	±	-	105
630 TEMPO MÉDIO									90,00
DESVIO PADRÃO									23,60

Tabela 13. – Vermelho Neutro Estaca T48.

T 48									
VERMELHO NEUTRO - ESTACAS SEM PINTURA								12/12/2018	
ORGANISMOS	TEMPO								
	15	30	45	60	75	90	105	120	T
1	±	±	±	±	-	0	0	0	60
2	±	±	±	±	±	±	-	0	90
3	±	±	±	±	±	-	0	0	75
4	±	±	±	±	-	0	0	0	60
5	±	±	±	±	±	-	0	0	75
6	±	±	-	0	0	0	0	0	30
7	±	±	±	±	±	±	-	0	90
480 TEMPO MÉDIO									68,57
DESVIO PADRÃO									16,69

Tabela 15. – Vermelho Neutro Weber T48.

T 48									
VERMELHO NEUTRO - ESTACA PINTADAS WEBER								12/12/2018	
ORGANISMOS	TEMPO								
	15	30	45	60	75	90	105	120	T
1	±	±	±	-	0	0	0	0	45
2	±	±	±	-	0	0	0	0	45
3	±	-	0	0	0	0	0	0	15
4	±	±	±	±	-	0	0	0	60
5	±	-	0	0	0	0	0	0	15
6	±	±	±	-	0	0	0	0	45
7	±	-	0	0	0	0	0	0	15
240 TEMPO MÉDIO									34,29
DESVIO PADRÃO									18,80